

École doctorale : Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

UMR 8207CNRS, Unité Matériaux Et Transformations

THESE

Présentée par

Basma MOUTAMENNI

Pour obtenir le grade de

Docteur en Physique

Spécialité : Milieux denses, matériaux et composants

**Apport de la méthode de chargement à l'état solide des matériaux
moléculaires au sein de matrices de silice mésoporeuses: de
l'application pharmaceutique à l'exploration des transformations
d'états physiques de la matière confinée**

Date de soutenance le 27/06/2024 devant le jury:

Pr. Stéphanie BRIANÇON	Université de Lyon 1	Rapporteur
Dr. Marie-Vanessa COULET	Université de Aix-Marseille	Rapporteur
Dr. Jean-Louis SAUVAJOL	Université de Montpellier	Examineur
Dr Guillaume DELAPLACE	Université de Lille	Président/Examineur
Pr. Alain HEDOUX	Université de Lille	Directeur de Thèse
Dr. Nicolas TABARY	Université de Lille	Co-directeur de Thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire UMET (Unité Matériaux Et Transformations) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Tout d'abord, j'aimerais remercier énormément le Pr. Alain HEDOUX et le Dr Nicolas TABARY, mes deux directeurs de thèse, qui m'ont donné la chance de faire cette thèse au sein de deux équipes (MMT et ISP) et qui m'ont beaucoup aidée et soutenue tout le long de cette formation et ce jusqu'à l'obtention du diplôme de Doctorat. Merci pour le temps que vous avez consacré à mon égard. Merci pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre écoute. Une page ne suffira pas pour exprimer tout le respect que je vous dois.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe MMT et ISP, notamment Yannick GUINET pour les discussions intéressantes que nous avons entretenues sur le Raman, Laurent PACCOU pour sa disponibilité, son aide et son soutien et tous les autres membres de l'équipe qui ont rendu ces trois années passées dans ce laboratoire un agréable séjour. Merci pour les moments conviviaux que nous avons passés ensemble notamment au « BBQ ».

Je remercie également les collaborateurs de ce travail qui ont beaucoup contribué à la réussite de ce projet. Je cite notamment, Jean-Philippe Dacquin, Jérémy Dhainaut, Carmen Ciotonea et Alexandre Mussi, avec qui j'ai beaucoup discuté et appris.

Je remercie chaleureusement les deux rapportrices de ma thèse Pr. Stéphanie BRIANÇON et Dr. Marie-Vanessa COULET. Merci également aux examinateurs, le Dr. Guillaume DELAPLACE et Dr Jean-Louis SAUVAJOL. Merci à vous d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci pour vos commentaires, vos remarques et vos questions qui ont été très utiles et pertinents.

Je tiens également à remercier mon Mari Dr. Anthony DUPONT, qui m'a beaucoup soutenue, qui a su me redonner confiance en moi et qui a fait en sorte que cette épreuve se soit bien déroulée. Merci d'être là pour moi, merci pour tout le temps et l'amour que tu m'as donné et que tu continues

à me donner. Je remercie également mes grands-parents, mes parents, surtout mon Papa qui croit beaucoup en moi. Merci à mes frères, ma sœur mes tantes Meryem et Keltoum, mon oncle Hamid. Merci à toute ma famille !

Merci Simon, Nina, Charline, Valentin et Luisa pour ces belles années passées à vos côtés. Je n'oublie pas Tatiana et Benjamin qui étaient présents à plusieurs étapes importantes dans ma vie.

Merci

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la fenêtre thérapeutique ; a) les différents cas de figure, b) le cas 'idéal'	19
Figure 2: Représentation schématique bidimensionnelle d'un système ordonné (le cristal) et d'un autre désordonné (l'amorphe).....	26
Figure 3: Variation schématique de l'enthalpie libre G du cristal, du liquide et du verre en fonction de la température. La trempe rapide du liquide ou le broyage du cristal à une température inférieure à T_g permettent d'obtenir un verre.....	27
Figure 4: Diagramme Température-Temps-Transformation. q_1 , q_c et q_2 correspondent aux vitesses de refroidissement	28
Figure 5: Représentation schématique de l'évolution en fonction de la température de (a) l'enthalpie H et de (b) la chaleur spécifique C_p	29
Figure 6: Diagramme d'Angell pour quelques composés montrant la différence entre les liquides forts et les liquides fragiles	31
Figure 7: Variation d'énergie totale (vert), d'interface (rouge) et de volume (bleu) en fonction de la taille (r) du noyau.....	33
Figure 8: Représentation schématique de la vitesse de nucléation en fonction de la température. La courbe rouge montre l'évolution de la mobilité moléculaire, et la courbe en vert représente l'évolution de la barrière thermodynamique de nucléation en fonction de la température.	35
Figure 9: Représentation schématique des vitesses de nucléation et de croissance en fonction de la température. T_g est la température de transition vitreuse et T_m la température de fusion du cristal. La zone de recouvrement correspond au domaine de température favorable à la formation du cristal. ..	37
Figure 10: Schéma de la synthèse des MCM-41.	40
Figure 11: Représentation schématique des mésopores et micropores des SBA-15.	41

Figure 12: Schéma des différentes méthodes utilisées pour charger les principes actifs dans les matrices de silice mésoporeuses.	42
Figure 13: Schéma décrivant le principe du MAL «Milling-Assisted Loading», le chargement à l'état solide.	45
Figure 14 Analyses par microscopie électronique à transmission: (a) SBA-15 non-broyé, (b) SBA-15 broyé pendant 30 min à 30 Hz, et (c) Profils d'intensité des SBA-15 avant broyage (ligne noire) et après broyage (ligne grise). Les bandes rouges correspondent aux zones sélectionnées pour calculer les profils d'intensité.	46
Figure 15: Thermogramme DSC à une vitesse de chauffe de 1 °C/min pour (a) l'ibuprofène en bulk, (b) 40% d'ibuprofène co-broyé avec 60% des SBA-15[9nm] et (c) 35% d'ibuprofène co-broyé avec 65% des SBA-15[9nm]. (Référence ²⁷)	48
Figure 16: Profils de dissolution de l'ibuprofène cristallin, et de l'ibuprofène confiné montrant l'impact de la taille des pores sur la libération. (Référence ⁴⁹)	50
Figure 17: (A). Profils de libération de l'ibuprofène chargé dans des SBA -15 non fonctionnalisés (SBA-15, SBA-15(SY)) et fonctionnalisés (SBA-15-NH ₂). (B) Schéma des interactions de l'ibuprofène avec la matrice fonctionnalisée (Référence ⁶⁶)	51
Figure 18: Profil de libération de la doxorubicine en fonction du pH du milieu.	52
<i>Figure 19: Représentation schématique d'un exemple d'acide aminé: La méthionine.</i>	<i>54</i>
<i>Figure 20: Organisation structurale d'une protéine.</i>	<i>55</i>
Figure 21: Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés. <i>R_i</i> représente la chaîne latérale de l'acide aminé <i>i</i>	56
Figure 22 : Paysage énergétique des configurations possibles que peut explorer la protéine en partant de l'état déplié jusqu'à l'état plié.	59

Figure 23: Courbe de stabilité d'une protéine. La température de dénaturation froide TD_c et la température de dénaturation chaude TD_h définissent l'intervalle de stabilité de la protéine. La température T_{ms} correspond au maximum de la courbe de stabilité.	61
Figure 24: Diagramme Pression-Température du processus de la lyophilisation.....	62
Figure 25: Cinétique d'adsorption du Lysozyme dans les SBA-15 de différentes tailles de pore. ■13.2 nm, ●7.4 nm, ▲3.9nm.	64
Figure 26: Molécule d'ibuprofène	74
Figure 27: Molécule du L-Tryptophane	75
Figure 28: Description de la diffusion Stokes et anti-Stokes, la diffusion Rayleigh et de l'adsorption infrarouge. Le spectre montre que la diffusion Stokes est plus intense que la diffusion anti-Stokes.....	78
Figure 29: Représentation schématisée des éléments d'un spectromètre à gauche et le spectroscopie Invia de Renishaw à droite.....	79
Figure 30: Description des ouvertures numériques associées à des distances de travail différentes et leurs impacts sur le volume d'échantillon analysé.	80
Figure 31: Photo du spectromètre XY Dilor (en haut). Schématisation (en bas) des Miroirs (M1 et M2) des réseaux (G1, G2 et G3), des fentes (S1 et S3) et du détecteur CCD.....	82
Figure 32 : Le broyeur oscillant MM400 de chez Retsch. La fenêtre encadrée en rouge montre le mouvement de la bille à l'intérieur de la jarre.	85
Figure 33: Traitement des spectres à basses fréquences. a) Procédure d'ajustement effectuée sur un spectre à basses fréquences de l'ibuprofène en phase liquide (état désordonné). b) Susceptibilité Raman dont la composante relaxationnelle a été soustraite afin de ne représenter que la composante vibrationnelle	90
Figure 34: Procédure de calcul du degré de cristallinité des échantillons partiellement cristallisés.....	91

Figure 35: Chauffage de l'état vitreux de l'ibuprofène : a) Représentation en $I_r(\omega)$ des spectres Raman issus d'une chauffe à 1°C/min à partir de l'état vitreux de l'ibuprofène obtenu par trempe du liquide à -100 °C. b) Représentation en I_{QES} obtenue en intégrant les spectres $I_r(\omega)$ sur un domaine allant de 9 à 35 cm^{-1}	93
Figure 36: Dénaturation chaude du Lysozyme: Comparaison entre deux spectres du lysozyme à deux températures différentes montrant que l'état dénaturé se caractérise par un décalage de la bande amide A1 vers les hautes fréquences par rapport à l'état natif ³⁴	96
Figure 37: Physisorption des SBA-15. a) Isotherme d'adsorption-désorption de N ₂ . b) Distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH (Barret, Joyner et Halenda)	98
Figure 38: Courbe de calibration en absorbance de l'ibuprofène dans un milieu acide de solution acide chloridrique à 0.1 M	100
Figure 39: Analyse par microscopie électronique à balayage de: a) SBA-15, (b) SBA-15 après 30 min de broyage à 10 Hz, (c) SBA-15 après un broyage à 20 Hz et (d) SBA-15 après un broyage à 30 Hz.	108
Figure 40: Méthodologie d'estimation de la taille des particules a) Cliché MEB des SBA-15, (b) Résultat du traçage des particules manuel (c) isolement des particules tracées préalablement (d) Distribution de la taille des particules. .	109
Figure 41: Évolution de la distribution des tailles des particules en variant la fréquence de broyage.	110
Figure 42: Diagramme des rayons X aux petits angles (SAXS).	113
Figure 43: Vue du dessus des SBA-15. a est le paramètre de la maille hexagonale que forment les canaux cylindriques, d_p est le diamètre des pores et e est l'épaisseur des murs qui se trouvent entre les canaux.	114
Figure 44: Caractérisation des matrices de silice mésoporeuses. (a) Isotherme adsorption-désorption N ₂ des SBA-15, SBA-15 broyés à 30 Hz et des SBA-15 broyés à 10 Hz. (b) Distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH (Barrett, Joyner et Halenda).	117

Figure 45: Intensité Raman de l'ibuprofène cristallin en bulk comparé à l'intensité Raman des SBA-15.....	119
Figure 46: Influence du broyage sur l'état physique de l'ibuprofène. a) Comparaison entre les spectres de l'ibuprofène, de l'ibuprofène broyé à 10 Hz et de l'ibuprofène broyé à 30 Hz. b) Les courbes IQES en fonction de la température des trois échantillons.	120
Figure 47: Susceptibilité Raman a) de l'ibuprofène dans sa forme cristalline et l'ibuprofène dans sa forme amorphe. b) des composites broyés à différentes fréquences de broyage.	122
Figure 48 : Spectres Raman à basses fréquences de 35%IBP:SBA-15 co-broyé à 10 Hz collectés lors d'une chauffe à 1 °C /min. (a) Première chauffe allant de la température ambiante jusqu'à 100 °C. (b) Deuxième chauffe allant de -100 jusqu'à 80°C.	124
Figure 49 : Courbes <i>IQES(T)</i> de l'ibuprofène vitreux obtenu par trempe de l'état liquide lors de la seconde chauffe, et du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) lors de la première puis seconde chauffe. Les lignes en pointillées indiquent les températures de la transition vitreuse.	125
Figure 50: Spectres Raman aux moyennes fréquences de l'ibuprofène à l'état cristallin en noir et de l'ibuprofène sous-refroidi (amorphe) en rouge.....	128
Figure 51: Analyse de la cartographie Raman à moyennes fréquences du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz). a) image obtenue avec un traitement DCLS b) spectre correspondant à la zone rouge à haut degré de cristallinité c) spectre correspondant à la zone bleue à faible degré de cristallinité et d) spectre correspondant à la zone verte à un degré de cristallinité intermédiaire	129
Figure 52: Spectres Raman de la seconde chauffe des composites (a) 42%IBP:SBA-15(10Hz) et (b) 43%IBP:SBA-15(10Hz).....	132
Figure 53: Courbes ATG des SBA-15 (en noir) et des SBA-15-NH ₂ (en rouge)	139
Figure 54: Caractérisation des matrices de silice mésoporeuses. (a) Isotherme d'adsorption désorption N ₂ des SBA-15 et des SBA-15-NH ₂ . (b)	

Distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH (Barett, Joyner et Halenda)	141
Figure 55: Spectres Raman à basses fréquences des composites 35%IBP:SBA-15 et 35%IBP:SBA-15-NH ₂ . Les deux composites ont été fraîchement préparés avec un broyage à 30 Hz.....	143
Figure 56: Spectres Raman à basses fréquences de 35%IBP:SBA-15-NH ₂ broyé à 30 Hz collectés lors des deux chauffe à 1 °C/min. (a) Première chauffe allant de la température ambiante jusqu'à 90 °C. (b) Deuxième chauffe allant de -100 jusqu'à 90°C	145
Figure 57: Analyse par la méthode «DCLS» de la cartographie Raman à moyennes fréquences du composite 35%IBP:SBA-15-NH ₂	148
Figure 58: Spectre Raman à moyennes fréquences du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz) en comparaison avec le spectre de l'ibuprofène amorphe en bulk.....	149
Figure 59: Comparaison des spectres Raman à moyennes fréquences des composites 35%IBP:SBA-15 et 35%IBP:SBA-15-NH ₂ lorsque (a) L'ibuprofène dans les SBA-15-NH ₂ est partiellement cristallisé, et l'ibuprofène dans les SBA-15 est dans un état amorphe. Et (b) Lorsque les deux échantillons ont le même état physique (amorphe)	151
Figure 60: Comparaison des spectres Raman à moyennes fréquences des composites 20%IBP:SBA-NH ₂ et 25%IBP:SBA-15-NH ₂	152
Figure 61: Isothermes d'adsorption-désorption des SBA-15-NH ₂ (courbe en noir) et du composite 35%IBP:SBA-15-NH ₂ broyé à 10 Hz (courbe en bleu).	154
Figure 62: Spectres Raman à basses fréquences des composites 35%IBP:SBA-15-NH ₂ broyés à 30 Hz (courbe en noire) et à 10 Hz (courbe en rouge).	155
Figure 63: Spectres Raman à basses fréquences de 35%IBP:SBA-15-NH ₂ broyé à 10 Hz collectés lors des deux chauffe à 1 °C/min. (a) Première chauffe	

allant de la température ambiante jusqu'à 90 °C. (b) Deuxième chauffe allant de -100 jusqu'à 90°C 156

Figure 64: Profil de libération du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz). Moyenne $\pm$ écart type, n=3. « Burst effect » correspond à la libération rapide de l'ibuprofène en contact avec le solvant. 163

Figure 65: Profils de libération des composites 35%IBP:SBA-15(30Hz) et 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz) 164

Figure 66: Effet de la fréquence de broyage sur la libération. a) Profils de libération des deux composites 35%IBP:SBA-15(30Hz) et 35%IBP:SBA-15(10Hz) et b) Profils de libération des deux composites 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz) et 35%IBP:SBA-15-NH₂(10Hz). La ligne en pointillée à 80% de libération met en évidence la libération prolongée pour les composites broyés à 10 Hz. 166

Figure 67: Schéma présentant l'effet de la fréquence de broyage sur la taille des canaux des SBA-15 et montrant l'état de l'ibuprofène confiné ainsi que sa libération. 167

Figure 68: Spectres Raman basse-fréquence collectés dans les composites immédiatement après chargement à l'état solide pour différentes concentrations d'ibuprofène. 175

Figure 69: Évolution temporelle du spectre Raman basse-fréquence collecté à température ambiante dans les composites contenant a) 20%, b) 25%, c) 30% et d) 35% d'ibuprofène 176

Figure 70 : Spectres Raman à basses fréquences du composite 20%IBP:SBA-15(10Hz) à t_0 (courbe en noire) et à t_0+20H (courbe en rouge) 177

Figure 71: Spectres Raman à basses fréquences du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) à t_0 et à t_0+20H 178

Figure 72: Thermogramme du composite 20%IBP:SBA-15(10Hz) à la température ambiante, collecté pendant 25 heures (Courbe verte). Taux de dissolution obtenu en normalisant l'aire sous le pic endothermique à un instant

t par l'aire totale du pic endothermique (Courbe bleue). Une procédure d'ajustement du taux de dissolution a été effectuée à partir de l'équation Noyes & Whitney ¹³ (Courbe rouge)	179
Figure 73: Cinétiques de 24 heures sur des composites avec des concentrations d'ibuprofène allant de 20 à 35% exprimées en fonction de $I_{QES}(t)$. La loi de Noyes & Whitney ¹³ a été intégrée puis ajustée aux courbes expérimentales.	181
Figure 74: Spectres Raman à basse fréquence collectés lors d'une cinétique du composite 35%IBP:MCM-41(10Hz)	183
Figure 75: Comparaison des spectres à basse fréquence des composites 35%IBP:SBA-15(10Hz) et 35%IBP:MCM-41(10Hz) à a) $t=t_0$ et à b) $t=t_f$	184
Figure 76: Comparaison des cinétiques de dissolution des nanocristaux des deux composites 35%IBP:MCM-41(10Hz) et 35%IBP:SBA-15(10Hz)	185
Figure 77: Intensité diffusée par SBA-15 broyé à 30 Hz et 30%IBP:SBA-15 préparé par cobroyage à 30 Hz.	187
Figure 78: Intensité diffusée par l'ibuprofène liquide sous-refroidi obtenue après soustraction de l'intensité diffusée par le capillaire de l'intensité diffusée par le capillaire contenant l'ibuprofène	188
Figure 79: Cinétique de 20 heures du composite 30%IBP:SBA-15 cobroyé à 10 Hz. Diagramme de diffraction des rayons X aux petits angles. L'étoile indique la signature du Kapton utilisé pour fixer l'échantillon sur le porte échantillon.	189
Figure 80: Comparaison des profils d'intensité diffusée par le composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) à t_0 et à t_0+20h	190
Figure 81: Comparaison des profils d'intensité diffusée des composites 30%IBP:SBA-15(30Hz) et 30%IBP:SBA-15(10Hz) après dissolution des nanocristaux. Le rectangle rouge montre que le pic diffus à $0.175 \text{ \AA}^{-1}$ est mieux résolu dans le cas d'un broyage à 10 Hz.	192
Figure 82: Différences de l'intensité diffusée entre un instant t et l'instant t_0	193

Figure 83: Comparaison des états physique du L-trp à partir des spectres Raman basse fréquence a) Comparaison des spectres Raman du L-Trp dans sa forme commerciale et dans sa forme amorphe. b) Spectres Raman du L-Trp broyé et du L-Trp cobroyé avec l'aérosil en comparaison avec le spectre Raman du L-trp commercial	196
Figure 84: Analyse de la stabilité de L-trp cristallin a) Thermogramme DSC et b) Courbe ATG.	197
Figure 85: Susceptibilités Raman à température ambiante des composites L-Trp:MCM-41(30Hz) tracés pour 30, 35, 40, 45 et 50% massique du L-Tryptophane.	199
Figure 86: Comparaison des susceptibilités Raman des composites 40, 45 et 50%L-Trp :MCM-41 avec les susceptibilités Raman des L-Trp commercial et L-Trp cryobroyé pour définir une limite de chargement.	200
Figure 87: Spectres Raman à moyennes fréquences du L-trp commercial, L-Trp broyé à 30 Hz et L-Trp cryobroyé. a) dans la région spectrale allant de 800 à 1640 cm^{-1} et b) dans la région spectrale de 1500 à 1640 cm^{-1} . Les ellipses indiquent avec un code couleur les groupements impliqués dans les vibrations.	202
Figure 88: Comparaison entre le spectre du composite 40% L-Trp:MCM-41 et le spectre du L-Trp cryobroyé (amorphe). a) dans la région spectrale allant de 800 à 1500 cm^{-1} et (b) dans la région spectrale allant de 1500 à 1640 cm^{-1} . La flèche horizontale permet de montrer le décalage vers les basses fréquences de l'étirement C=O dans le spectre du composite.	203
Figure 89: Susceptibilités Raman du L-Trp commercial, du L-trp cobroyé dans un tube en plastique (eppendorf) et du L-Trp cobroyé dans une jarre en acier.	205
Figure 90: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial et du lysozyme broyé à 30 Hz	207
Figure 91: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial et du lysozyme broyé à 10 Hz.	208

Figure 92: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial, du lysozyme broyé à 30 Hz et du composite 35%Lys:SBA-15 cobroyé à 30 Hz	210
Figure 93: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial, du lysozyme broyé à 10 Hz et du composite 35%Lys:SBA-15 cobroyé à 10 Hz.	211
Figure 94: N ₂ adsorption-désorption des SBA-15, des SBA-15 broyés à 10 Hz et du composite 35%Lys:SBA-15(10Hz)	212
Figure 95: Volume poreux cumulatif en fonction de la taille des pores, des SBA-15 commerciaux, et des SBA-15 mis en solution à pH=10.5 pendant 4 jours. Ces résultats sont issus des expériences de physisorption.....	214

SOMMAIRE

Introduction générale	19
Chapitre I : Contexte et synthèse bibliographique sur les matériaux moléculaires et biomoléculaires	25
I.1 Molécules d'intérêt thérapeutique, de faible poids moléculaire	25
I.1.1 Dualité Cristal-Amorphe	26
I.1.2 Processus de vitrification et cristallisation	27
I.1.2.1 Vitrification et transition vitreuse	27
I.1.2.2 Processus de cristallisation	31
I.1.3. Matrices de silice mésoporeuses et confinement	38
I.1.3.1 Matrices de silice mésoporeuses	39
I.1.3.2 Méthodes de chargement.....	42
I.1.4 Prolongement et control de libération	49
I.1.4.1 Prolonger la libération via les matrices de silice mésoporeuses	49
I.1.4.2 Cibler la libération via les matrices de silice mésoporeuses.....	51
I.2 Les systèmes biomoléculaires.....	53
I.2.1 Protéines	53
I.2.1.1 Structure des protéines	53
I.2.1.2 Repliement des protéines.....	58
I.2.1.3 Stabilité thermodynamique des protéines	59
I.2.1.4 Lyophilisation des protéines	61
I.2.2 Confinement des protéines	63
Chapitre II : Matériaux et méthodes	73
II.1 Matériaux	73
II.1.1 Ibuprofène	73
II.1.2 L-Tryptophane	74

II.1.3 Lysozyme	75
II.1.4 Matrices de silice mésoporeuses.....	75
II.1.4.1 MCM-41	75
II.1.4.2 SBA-15.....	76
II.2 Techniques d'analyse	76
II.2.1 Spectroscopie Raman	76
II.2.1.1 Description de la technique	76
II.2.1.2 Les spectromètres Raman	78
II.2.2 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	83
II.2.3 Analyse thermogravimétrique (ATG)	83
II.2.4 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)	84
II.3 Méthodes	84
II.3.1 Méthodes de chargement à l'état solide.....	84
II.3.2 Méthode de fonctionnalisation	85
II.3.3 Méthodes d'analyse des matériaux moléculaires par la spectroscopie Raman.....	86
II.3.3.1 Traitement des spectres à basses fréquences.....	88
II.3.3.2 Traitement des spectres à moyennes fréquences	94
II.3.4 Physisorption	96
II.3.5 Libération de l'ibuprofène	99
Chapitre III : Analyse des paramètres opératoires du chargement assisté par broyage mécanique : influence de la fréquence de broyage sur l'état physique de la matrice mésoporeuse et celui de la matière confinée	105
III.1 Effet de la fréquence de broyage sur les SBA-15.....	106
III.1.1 Impact du broyage sur la taille des particules	106
III.1.2 Impact du broyage sur la structure hexagonale des SBA-15.....	112

III.1.3 Manipulation de l'état physique de l'ibuprofène confiné par variation de la fréquence de broyage.....	118
III.1.4 Taux de chargement optimal	130
III.2. Conclusion.....	133
Chapitre IV. : Fonctionnalisation des SBA-15 et étude du confinement de l'ibuprofène par broyage à 30 et à 10 Hz.....	137
IV.1 Synthèse et caractérisation de la matrice mésoporeuse fonctionnalisée : SBA-15-NH ₂	138
IV.2 Etude de l'état physique de l'ibuprofène confiné dans les SBA-15-NH ₂ par la méthode MAL à deux fréquences de broyage : 30 et 10 Hz.....	142
IV.2.1 Broyage à 30 Hz	142
IV.2.2 Broyage à 10 Hz	153
IV.3 Conclusion.....	157
Chapitre V : Étude des profils de libération de l'ibuprofène confiné	161
V.1 Conditions expérimentales	161
V.2 Libération de l'ibuprofène confiné à 30 Hz	162
V.2.1 Confinement dans les SBA-15	162
V.2.2 Confinement dans les SBA-15-NH ₂	163
V.3 Libération de l'ibuprofène confiné à 10 Hz	164
V.4 Conclusion.....	168
Chapitre VI : Apport de la méthode de chargement à l'état solide (MAL) des molécules et des biomolécules : Stabilité des nanocristaux confinés, confinement d'acides aminés hydrophobes et de protéines dans les matrices de silice mésoporeuses.....	173
VI.1 Stabilité des nanocristaux confinés.....	174
VI.2 Confinement du L-Tryptophane	195
VI.2.1 Caractérisation du L-Tryptophane.....	195

VI.2.2 Capacité de chargement et état physique du L-tryptophane confiné	198
VI.2.3 Étude des interactions du L-tryptophane confiné avec les MCM-41	200
VI.2.4 L'impact de la jarre de broyage sur l'état physique du L-Tryptophane confiné	204
VI.3 Confinement du Lysozyme	206
VI.3.1 L'impact de la fréquence de broyage sur le Lysozyme	206
VI.3.2 Chargement à l'état solide du lysozyme dans les SBA-15.....	208
VI.3.3 Avantages de la méthode de chargement des protéines par broyage	213
VI.4 Conclusion.....	215
Conclusion générale et perspectives	221

Introduction générale

La forme galénique d'un médicament est inhérente à la fois à son mode d'administration et aux barrières physiologiques que le principe actif doit franchir. La formulation pharmaceutique doit être optimisée de manière à pouvoir franchir différents types de barrière physiologique tout en préservant l'activité pharmaceutique du médicament. Les formulations pharmaceutiques à libération contrôlée ont pour but de préserver le principe actif à travers ces barrières physiologiques tout en maîtrisant les caractéristiques de sa libération (principalement vitesse et durée). Ce type de formulation doit donc être utilisé pour assurer une biodisponibilité optimale, ce qui consiste à avoir une quantité maîtrisée de principe actif dans un état physique inchangé qui atteigne la grande circulation sanguine. Ceci sous-entend d'abord la nécessité que la concentration plasmatique du principe actif rentre dans une fenêtre thérapeutique, comme le montre la Figure 1.

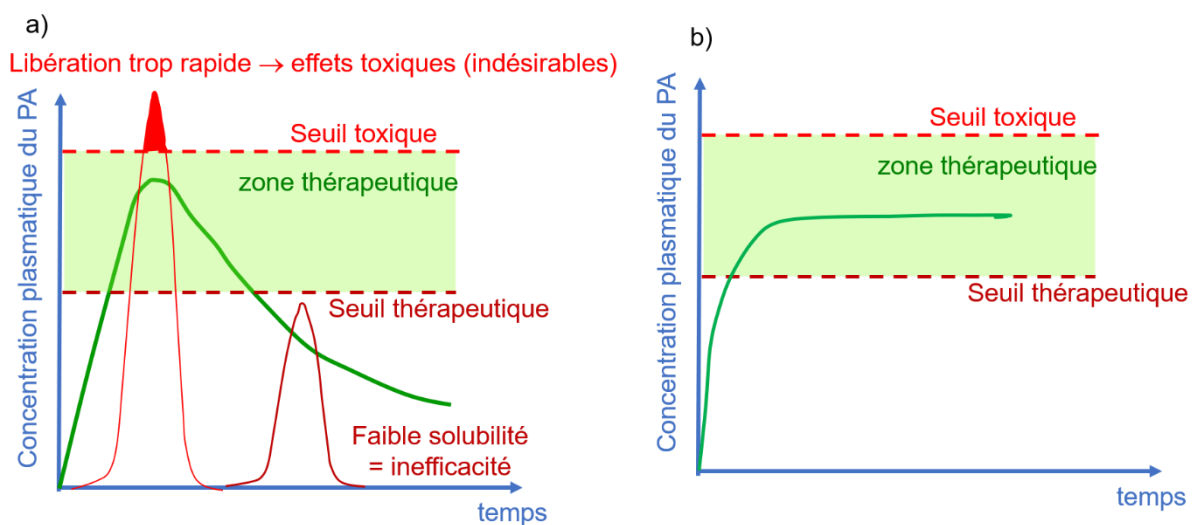


Figure 1 : Représentation de la fenêtre thérapeutique ; a) les différents cas de figure, b) le cas 'idéal'

La Figure 1.a montre un cas où le seuil toxique est atteint avec de possibles effets indésirables, et un cas où le seuil thérapeutique n'est pas atteint, ce qui rend le médicament totalement inefficace. Ce dernier cas résulte principalement de la trop faible solubilité du principe actif, d'où la nécessité d'utiliser le système

à libération contrôlée pour placer le principe actif dans un état physique le plus soluble possible en le maintenant stable.

Les matrices de silice mésoporeuse sont l'objet d'un nombre d'études croissant depuis le début des années 2000. Elles sont effectivement considérées comme des plateformes idéales pour la conception de nano systèmes multifonctionnels^{1,2} permettant différents types de nanothérapies, y compris celles contre le cancer^{3,4}. Les caractéristiques physiques de ces matrices à savoir, leur grand volume de pores ($0.6 - 1 \text{ cm}^3/\text{g}$), importante surface spécifique ($700 - 1000 \text{ m}^2/\text{g}$) et le large spectre de tailles de pores fournissent une plateforme versatile de systèmes d'administration de médicaments, de la 'petite molécule' à la protéine. Un autre avantage de ces systèmes est qu'ils permettent d'exacerber la *solubilité* **ET** la *stabilité* de molécules actives faiblement soluble à l'état cristallin. Il est reconnu que le confinement de ces molécules en solution basé sur le phénomène de capillarité permet de charger la matière active à l'état amorphe et de stabiliser cet état en inhibant le phénomène de nucléation, et de ce fait la cristallisation du matériau, en choisissant une taille de pores plus faible que le rayon critique des noyaux⁵. Malgré les avantages décrits ci-dessus, des inconvénients ont été recensés et considérés comme incompatibles avec une application thérapeutique. Il s'agit principalement de l'utilisation de solvants organiques toxiques nécessaires pour dissoudre le principe actif cristallin peu soluble dans l'eau. Ce dispositif d'administration est aussi considéré comme très peu chargé en molécule active, par rapport à d'autres systèmes multi-composants tels que les dispersions solides, les co-amorphes ou co-cristaux⁶. Une difficulté supplémentaire dans l'utilisation de ces matrices chargées à partir d'une solution, consiste à nettoyer le principe actif en interaction avec la matrice à l'extérieur des pores. Cette procédure de nettoyage a souvent pour conséquence de dissoudre une partie du principe actif confiné, ce qui rend difficilement quantifiable le dosage de principe actif confiné.

Une méthode de chargement des matériaux moléculaires à l'état solide a été récemment développée au sein de l'équipe MMT de l'UMET. Elle consiste à co-broyer la matrice de silice avec le principe actif. Il a été montré^{5,7} qu'il était possible de charger environ 40% en masse de principe actif par rapport à la matrice sans avoir à utiliser de procédure de nettoyage. Ce moyen d'administration d'un médicament dans un état physique exacerbant sa biodisponibilité (à l'état amorphe ou nanocristallin) évite l'utilisation de matériaux polymères issus de la pétrochimie. La méthode de chargement à l'état solide sans solvant permet de lever des verrous technologiques sur une application thérapeutique du confinement de principes actifs au sein de matrices de silice mésoporeuse.

Au-delà de l'application thérapeutique, l'étude des matériaux sous confinement (à l'échelle nanométrique) suscitent des études fondamentales sur les matériaux moléculaires formateurs de verre⁸. L'utilisation de la méthode de chargement assisté par broyage mécanique permet d'élargir l'exploration d'états physiques inaccessibles sur des grands volumes, dans la mesure où la matière est confinée à l'état solide. Il a ainsi été possible d'explorer de nouveaux états physiques de la caféine⁹ et de l'indométacine¹⁰, ainsi que des transformations induites par la géométrie de confinement.

Le travail de cette thèse a consisté à analyser l'influence des paramètres opératoires de la technique de chargement, principalement l'intensité de broyage, à la fois sur la matière confinée et sur la matrice de silice mésoporeuse. Il a été réalisé avec le double objectif de confiner différents types de matériaux qui présentent des difficultés pour être chargés au sein des matrices par les méthodes classiques, tels que les acides aminés hydrophobes, puis les protéines, et celui d'explorer de nouveaux états physiques et d'analyser leurs transformations induites par la géométrie de confinement.

Il a aussi été entrepris de modifier la chimie de surface afin d'étudier l'influence des interactions du matériau confiné avec la surface interne sur l'état physique du principe actif et sa libération.

Le principal outil de cette thèse a été la spectroscopie Raman. Celle-ci, utilisée dans une large gamme de fréquence ($5 - 3800 \text{ cm}^{-1}$) permet de sonder l'organisation de la matière condensée, de la structure de la molécule, jusqu'à l'ordre à longue portée des molécules via l'ordre à très courte portée entre premières voisines. La possibilité d'analyser simultanément la dynamique mono-moléculaire (ou d'une partie de la molécule) à très basse fréquence et la dynamique des mouvements collectifs est un moyen unique de décrypter les mécanismes de transformation de phase.

Ce mémoire est divisé en six chapitres.

L'état de l'art sur l'utilisation des matrices de silice poreuse comme dispositifs d'administration de médicaments, ainsi que sur les méthodes de chargement utilisées pour confiner les matériaux au sein de ces matrices est présenté dans **le chapitre I**.

Dans **le chapitre II**, les matériaux, les méthodes et techniques d'analyse utilisés dans le cadre de ce travail seront décrits.

Le chapitre III présente l'étude des paramètres opératoires de la méthode de chargement à l'état solide, en particulier la fréquence de broyage et son effet sur l'état physique du principe actif confiné et sur les matrices de silice mésoporeuses.

Dans **le chapitre IV**, une étude sur la fonctionnalisation des matrices de silice mésoporeuses sera présentée.

Le **chapitre V** est consacré à l'étude des profils de libération des systèmes confinés.

Et enfin, l'apport de la méthode de chargement à l'état solide des molécules et des biomolécules sera présenté dans **le chapitre VI**.

Références

1. Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I, Manzano M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. *Molecules*. 2018;23(1):47. doi:10.3390/molecules23010047
2. Prestidge CA, Barnes TJ, Lau CH, Barnett C, Loni A, Canham L. Mesoporous silicon: a platform for the delivery of therapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery*. Published online March 1, 2007. Accessed April 23, 2024. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.4.2.101>
3. Tang F, Li L, Chen D. ChemInform Abstract: Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)*. 2012;24:1504-1534. doi:10.1002/adma.201104763
4. Castillo RR, Colilla M, Vallet-Regí M. Advances in mesoporous silica-based nanocarriers for co-delivery and combination therapy against cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2017;14(2):229-243. doi:10.1080/17425247.2016.1211637
5. Malfait B, Correia NT, Mussi A, Paccou L, Guinet Y, Hédoux A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;277:203-207. doi:10.1016/j.micromeso.2018.10.022
6. Dengale SJ, Grohgan H, Rades T, Löbmann K. Recent advances in co-amorphous drug formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;100:116-125. doi:10.1016/j.addr.2015.12.009
7. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques*. These de doctorat. Université de Lille (2018-2021); 2019. Accessed September 18, 2023. <https://theses.fr/2019LILUR051>
8. Alba-Simionesco C, Coasne B, Dosseh G, et al. Effects of confinement on freezing and melting. *J Phys: Condens Matter*. 2006;18(6):R15. doi:10.1088/0953-8984/18/6/R01
9. Guinet Y, Paccou L, Danède F, Hédoux A. Confinement of molecular materials using a solid-state loading method: a route for exploring new physical states and their subsequent transformation highlighted by caffeine confined to SBA-15 pores. *RSC Adv*. 2021;11(55):34564-34571. doi:10.1039/D1RA05757J
10. Malfait B, Paccou L, Correia NT, Guinet Y, Hedoux A. Identification of an amorphous-amorphous two-step transformation in indomethacin embedded within mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2021;328:111502. doi:10.1016/j.micromeso.2021.111502

Chapitre I : Contexte et synthèse bibliographique sur les matériaux moléculaires et biomoléculaires

Le confinement des matériaux moléculaires thérapeutiques à l'échelle nanométrique fait partie des stratégies existantes qui visent à optimiser l'efficacité du médicament en améliorant les propriétés de libération. Il a également suscité l'intérêt de plusieurs études en vue de stabiliser des biomolécules telles que les protéines¹⁻⁵.

Ce premier chapitre est divisé en deux grandes parties :

La première, concerne les connaissances acquises sur les matériaux moléculaires en général, et sur leurs propriétés physiques à l'état confiné en particulier.

La deuxième partie de ce chapitre, est consacrée à des rappels bibliographiques sur les systèmes biomoléculaires comprenant des notions de base sur leurs caractéristiques structurales et leur stabilité thermodynamique.

I.1 Molécules d'intérêt thérapeutique, de faible poids moléculaire

Les matériaux moléculaires ont des caractéristiques physiques spécifiques au contraste important entre forces intra moléculaires (liaisons covalentes) et inter moléculaires (Van der Waals, liaisons hydrogène), telles que polymorphisme riche, grande aptitude à la vitrification, sensibilité aux perturbations extérieures (température, pression, humidité).... Les techniques de formulations industrielles telles que le broyage mécanique, le séchage (lyophilisation, spray-drying), l'extrusion, soumettent ce type de composés à des contraintes spécifiques qui permettent d'explorer de nouveaux états physiques inaccessibles par simple variation de température ou pression, et ouvrent ainsi

de nouveaux champs de physique fondamentale qui inspirent et orientent aussi une partie des activités de l'équipe Matériaux Moléculaires et Thérapeutiques (MMT) de l'UMET. Les études fondamentales développées au sein de l'équipe MMT sur les transformations de phases des matériaux moléculaires présentent un intérêt potentiel à l'interface avec la pharmacie, la chimie agroalimentaire et des cosmétiques.

I.1.1 Dualité Cristal-Amorphe

Un matériau à l'état solide peut exister sous deux états physiques : l'état cristallin et l'état amorphe. Le type d'organisation des molécules qui constituent le matériau détermine l'état physique de celui-ci. Dans le cas d'un cristal, les atomes, ions ou molécules forment le motif de base répété d'une manière périodique dans les trois directions de l'espace. L'environnement moléculaire est donc est donc identique en tout point du cristal et définit un ordre à longue portée. De nombreux matériaux peuvent posséder d'autres formes cristallines que l'on appelle *des polymorphes*. À l'inverse, un amorphe qui peut être solide (verre) ou liquide est caractérisé par une désorganisation structurale et par une absence de périodicité. Ces deux états (cristallin et amorphe) sont schématisés sur la Figure 2.

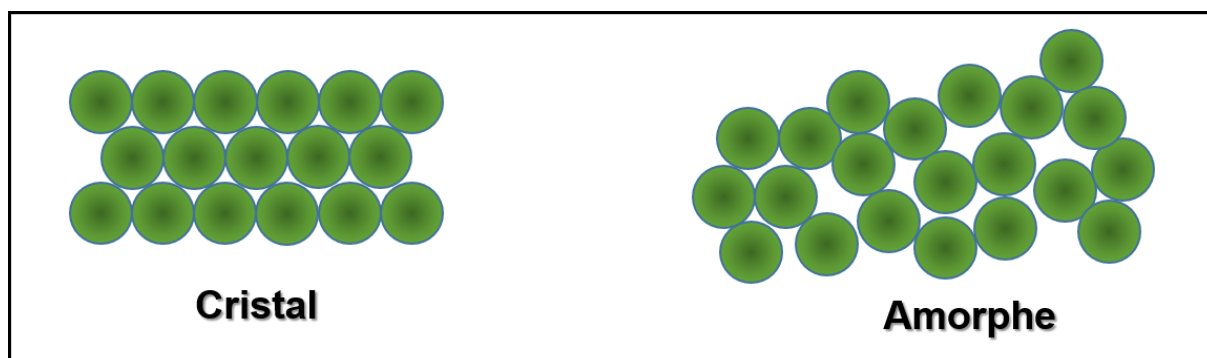


Figure 2: Représentation schématique bidimensionnelle d'un système ordonné (le cristal) et d'un autre désordonné (l'amorphe).

L'état amorphe et l'état cristallin sont deux états de niveaux énergétiques différents. Le niveau d'enthalpie libre ($G = H - T.S$, où H est l'enthalpie du

système et S son entropie) définit la stabilité des états physiques (amorphe et cristallin). L'état le plus stable, à une température donnée, est celui qui présente l'énergie libre la plus faible. La Figure 3 présente le diagramme d'état de Gibbs qui schématise les différents domaines des états physiques d'un matériau donné et met en évidence les variations de pente $\frac{dG(T)}{dT}$ dans chaque état qui correspondent à l'entropie ($-S$) du système. Ces variations de pente rendent compte de ce fait du caractère plus ou moins ordonné du matériau suivant l'état dans lequel il se trouve.

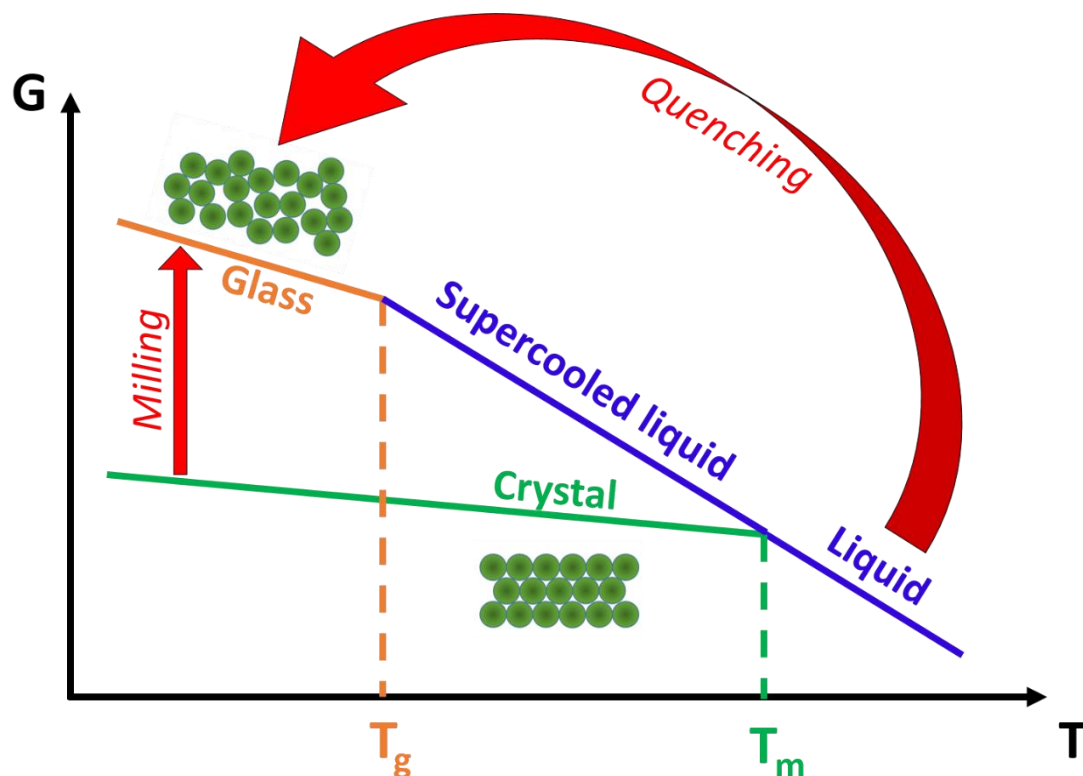


Figure 3: Variation schématique de l'enthalpie libre G du cristal, du liquide et du verre en fonction de la température. La trempe rapide du liquide ou le broyage du cristal à une température inférieure à T_g permettent d'obtenir un verre.

I.1.2 Processus de vitrification et cristallisation

I.1.2.1 Vitrification et transition vitreuse

La vitrification par abaissement de la température est généralement décrite à partir d'un diagramme TTT (Temps, Température, Transformation). Ce diagramme montre que pour une vitesse de refroidissement suffisamment

rapide, le nez de cristallisation peut être évité. Si cette vitesse est accessible expérimentalement, l'état vitreux peut être atteint.

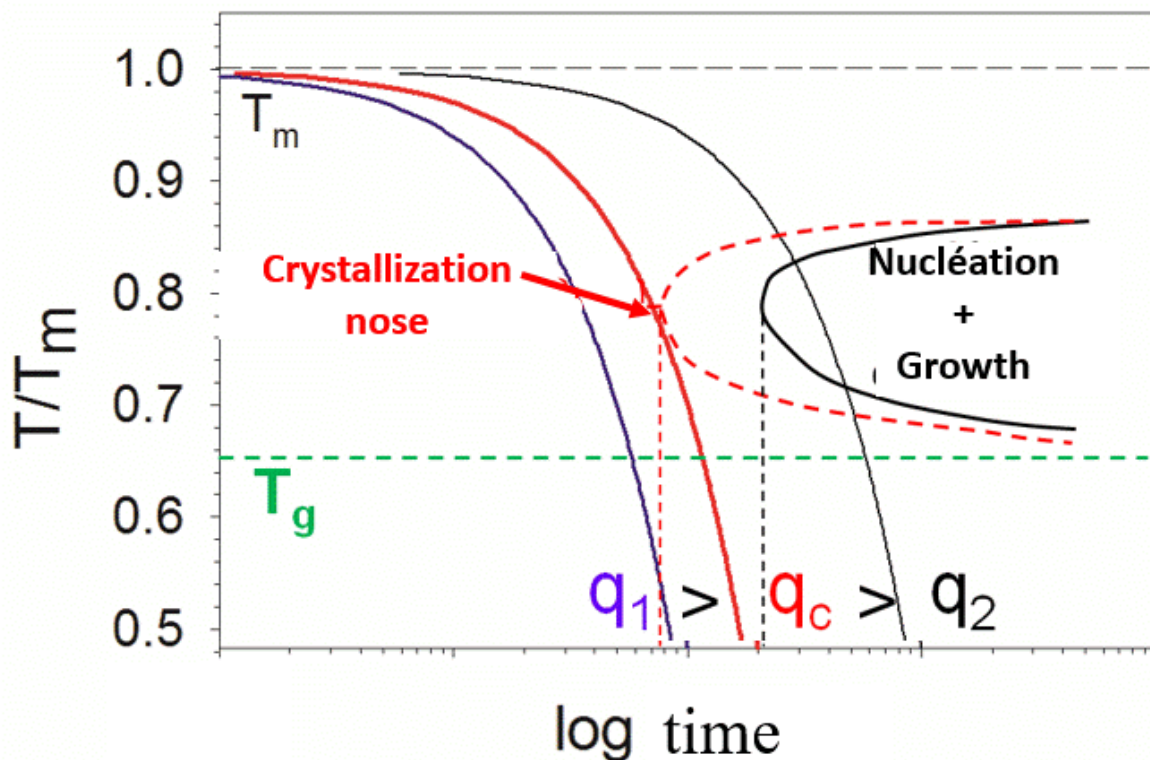


Figure 4: Diagramme Température-Temps-Transformation. q_1 , q_c et q_2 correspondent aux vitesses de refroidissement

Le verre est généralement obtenu suite à une trempe (refroidissement rapide) du liquide. La baisse rapide de la température entraîne des modifications des grandeurs thermodynamiques, telles que l'enthalpie, l'entropie, la chaleur spécifique C_p et le volume molaire V , et dynamiques telles que la viscosité (η) et la mobilité moléculaire. En effet, le refroidissement rapide d'un liquide conduit à une forte diminution de la mobilité moléculaire et par conséquent à une augmentation de sa viscosité. À partir d'une certaine température notée T_g et appelée *température de transition vitreuse*, le système se fige et devient donc un solide amorphe, un verre. Étant donné le temps relaxationnel très long à basse température par rapport à l'échelle des temps expérimentaux définie par la vitesse de refroidissement, les grandeurs thermodynamiques s'écartent de leurs valeurs d'équilibre. En conséquence, on peut définir le verre comme étant

un état instable de la matière. Le basculement d'un système entre un liquide sous-refroidi et un verre à la température de transition vitreuse T_g s'accompagne d'un changement de pente de l'enthalpie H , ce qui implique une diminution de la chaleur spécifique C_p du matériau comme le montre la Figure 5.

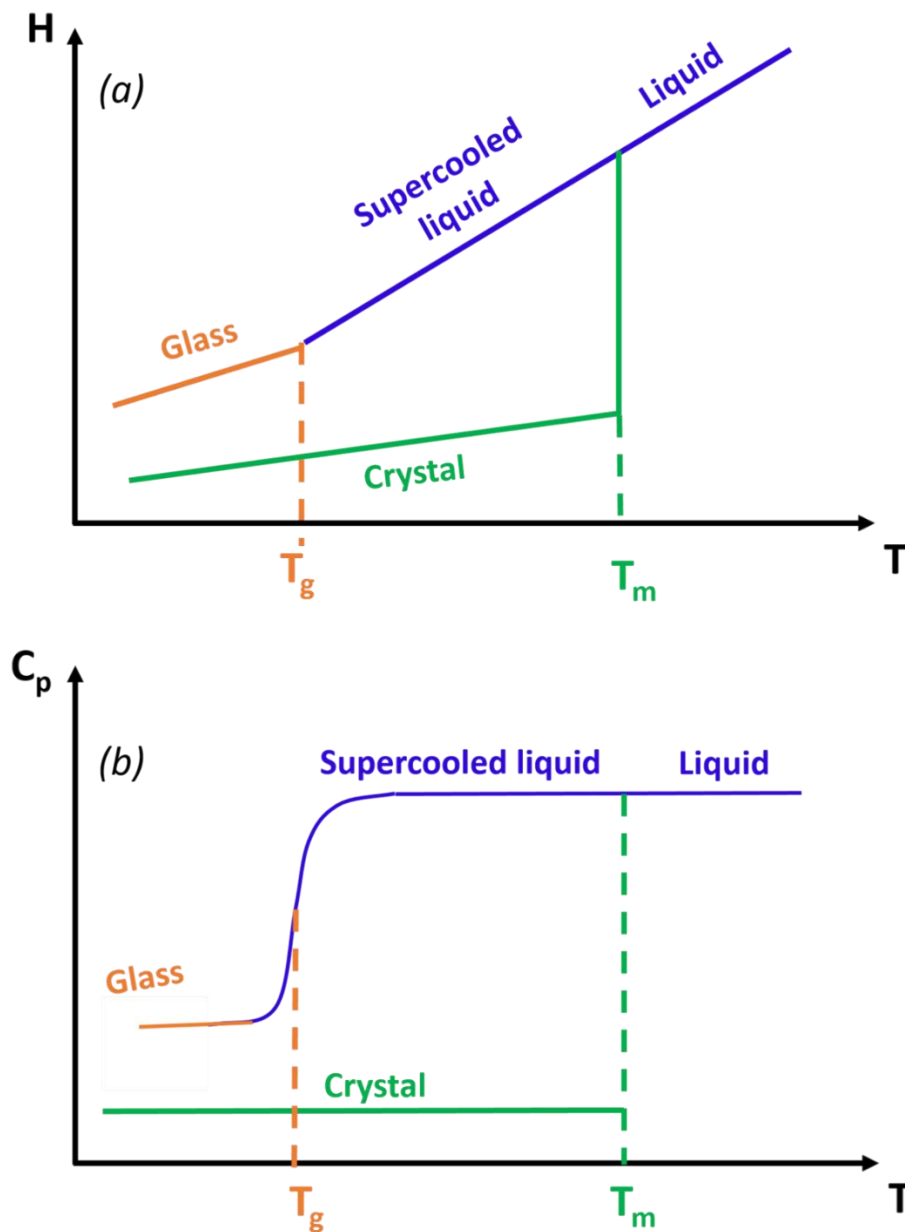


Figure 5: Représentation schématique de l'évolution en fonction de la température de (a) l'enthalpie H et de (b) la chaleur spécifique C_p .

On rappelle ici (1) que la chaleur spécifique est la dérivée par rapport à la température de l'enthalpie H du système.

$$c_p = \frac{dH}{dT}$$

1

Il est à noter que la transition vitreuse est une transition de phase du second ordre, qui n'est accompagnée d'aucun changement structural. Il s'agit d'un phénomène purement cinétique mettant en compétition l'échelle de temps expérimentale et l'échelle de temps de la relaxation structurale du matériau étudié.

Il est notable que les matériaux moléculaires ont un comportement spécifique à l'approche de la transition vitreuse généralement visualisé sur un diagramme d'Angell⁶ par un comportement non-arrhénien de la mobilité moléculaire. L'écart par rapport au comportement arrhénien définit un degré de fragilité du liquide.

Les matériaux moléculaires sont généralement classifiés comme des liquides fragiles, par opposition aux verres d'oxides qui se comportent comme des liquides forts.

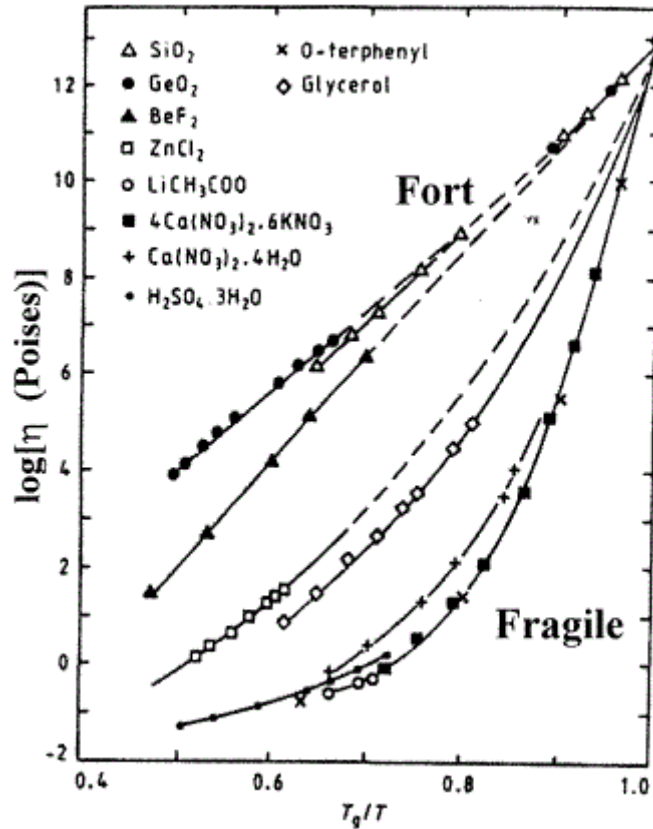


Figure 6: Diagramme d'Angell pour quelques composés montrant la différence entre les liquides forts et les liquides fragiles

Une autre manière qui permet d'obtenir un verre sans variation de température est le broyage mécanique du matériau à une température inférieure à la température de transition vitreuse du liquide correspondant, comme dans le cas du lactose⁷, du sulindac⁸, de l'indométhacine⁹ et du tréhalose¹⁰. Ces deux méthodes d'amorphisation sont illustrées sur la Figure 3. Cette méthode est très intéressante pour amorphiser les matériaux qui ont une température de fusion élevée, évitant ainsi toute dégradation de liaisons chimiques lors de la chauffe du cristal pour accéder à l'état liquide. C'est le cas de nombreux sucres qui présentent une dégradation (réaction Maillard) observée via un effet de brunissement du matériau.

I.1.2.2 Processus de cristallisation

En dessous de sa température de fusion T_m , le matériau est sous forme d'un liquide sous-refroidi, un état métastable par rapport à l'état cristallin, comme le

montre la Figure 3. Il a tendance donc à se transformer vers un état de niveau énergétique plus faible, le passage d'un état amorphe à un état cristallin permet au système de minimiser son énergie (G) et cette diminution ΔG représente la *force motrice* pour la cristallisation. Il s'agit d'un phénomène complexe impliquant à la fois une étape de nucléation qui correspond à la formation spontanée stochastique de germes (ou noyaux) dans le liquide, et une étape de croissance qui correspond au grossissement des noyaux préalablement formés lors de l'étape de nucléation¹¹.

Processus de nucléation

La nucléation est un mécanisme qui a été décrit par plusieurs théories. Cependant, la plus connue est la théorie classique de la nucléation. Ce modèle décrit le mécanisme de la nucléation comme étant la compétition entre un terme défavorable correspondant à la création d'une interface séparant le liquide du cristal et un terme favorable lié à la force motrice de transformation, c'est-à-dire à la différence d'énergie libre entre les deux phases. Plus la température est inférieure à la température de fusion plus la force motrice est importante comme le montre la Figure 3.

L'énergie de Gibbs associée à la formation d'un noyau supposé sphérique de rayon r , peut être exprimée de la manière suivante:

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi \cdot r^3 \cdot \Delta G_v + 4\pi \cdot r^2 \cdot \sigma$$

2

Où σ est l'enthalpie libre de l'interface entre le liquide et le cristal par unité de surface et ΔG_v est la différence d'énergie par unité de volume entre les deux phases.

$$\Delta G_v = G_v^L - G_v^C = \Delta H_v - T \cdot \Delta S_v$$

3

Il en résulte de cette théorie un rayon appelé *rayon critique de nucléation* et noté r^* pour lequel l'énergie du système ΔG^* est maximale. Ce maximum d'énergie

correspond à la barrière énergétique à franchir pour former un germe cristallin stable. L'évolution de l'énergie libre totale du système en fonction de r est présentée sur la Figure 7.

Deux évolutions du noyau formé sont donc possibles en fonction de son rayon r :

Pour un rayon r inférieur au rayon critique r^* , une diminution de r induit une diminution de ΔG , le noyau va ainsi disparaître.

À l'inverse, si r est supérieur au rayon critique r^* : le noyau va croître de façon à minimiser l'énergie du système.

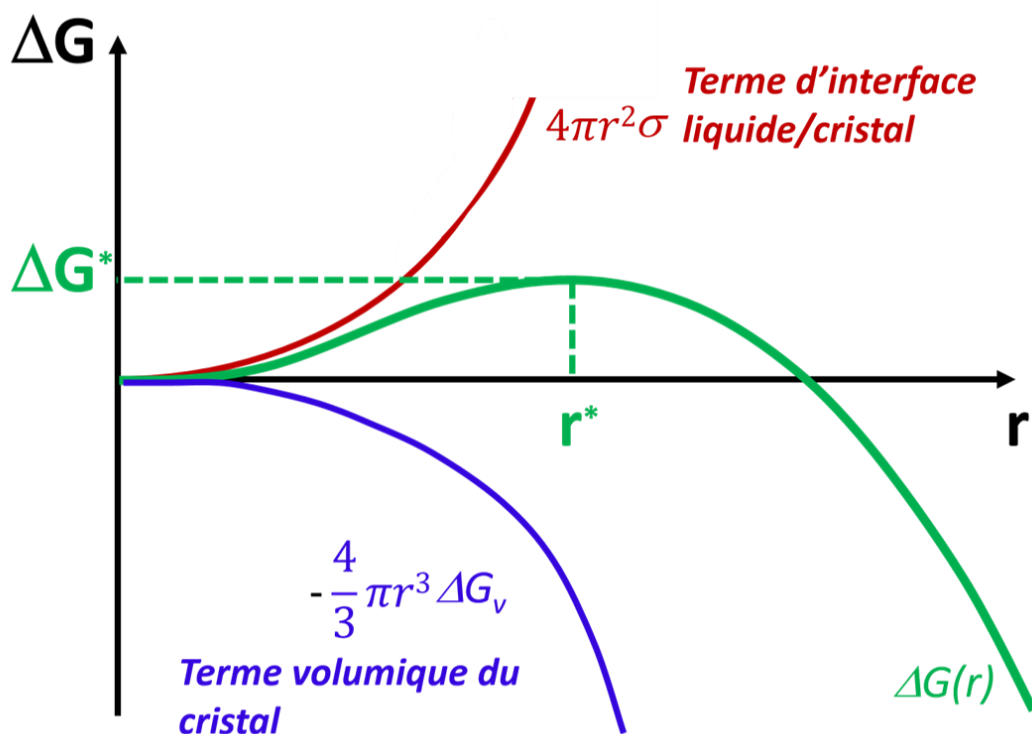


Figure 7: Variation d'énergie totale (vert), d'interface (rouge) et de volume (bleu) en fonction de la taille (r) du noyau.

Ces grandeurs critiques peuvent être exprimées comme étant¹² :

$$r^* = \frac{2 \cdot \sigma}{\Delta G_v} \quad \text{et} \quad \Delta G^* = \frac{16\pi \cdot \sigma^3}{3 \cdot \Delta G_v^2}$$

À la température de fusion T_m , l'enthalpie libre du cristal est égale à celle du liquide. Donc,

$$\Delta G_v^{T_m} = \Delta H_v^{T_m} - T_m \cdot \Delta S_v^{T_m} = 0 \quad \text{et} \quad \Delta S_v^{T_m} = \frac{\Delta H_v^{T_m}}{T_m}$$

5

On peut alors en déduire l'expression suivante :

$$\Delta G_v = \Delta H_v^{T_m} - T \cdot \frac{\Delta H_v^{T_m}}{T_m}$$

$$\Delta G_v = \Delta H_v^{T_m} \cdot \left(\frac{\Delta T}{T_m} \right)$$

6

Cette égalité (6) est vraie en tenant compte de l'hypothèse que pour un faible degré de sous-refroidissement ($\Delta T = T_m - T$), la chaleur spécifique, l'enthalpie ainsi que l'entropie du système varient très peu en fonction de la température. Par conséquent, les grandeurs critiques peuvent être exprimées comme étant:

$$r^* = \frac{2 \cdot \sigma \cdot T_m}{\Delta H_v^{T_m} \cdot \Delta T} \quad \text{et} \quad \Delta G^* = \frac{16\pi \cdot \sigma^3 \cdot T_m^2}{3 \cdot (\Delta H_v^{T_m})^2 \cdot \Delta T^2}$$

7

Le modèle classique de nucléation prédit la vitesse de nucléation $\dot{N}(T)$ sous la forme d'un produit de deux termes associés à des processus thermiquement activés¹².

$$\dot{N}(T) \propto \exp\left(-\frac{Q_d}{k \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k \cdot T}\right)$$

8

Où

Q_d : Le coefficient de diffusion.

k : La constante de Boltzmann.

ΔG^* : La force motrice de transformation.

Les deux termes de l'équation : $\exp\left(-\frac{Q_d}{k.T}\right)$ et $\exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k.T}\right)$ évoluent de manière antagoniste en fonction de la température et mènent donc à l'obtention d'une dépendance en forme de gaussienne de la vitesse de nucléation présentée sur la Figure 8.

La vitesse de nucléation présente un maximum à une température pour laquelle la barrière énergétique est suffisamment petite pour former un germe cristallin stable et le facteur de diffusion est suffisamment important pour que les molécules issues du liquide s'ajoutent au cristal stable à travers l'interface cristal/liquide.

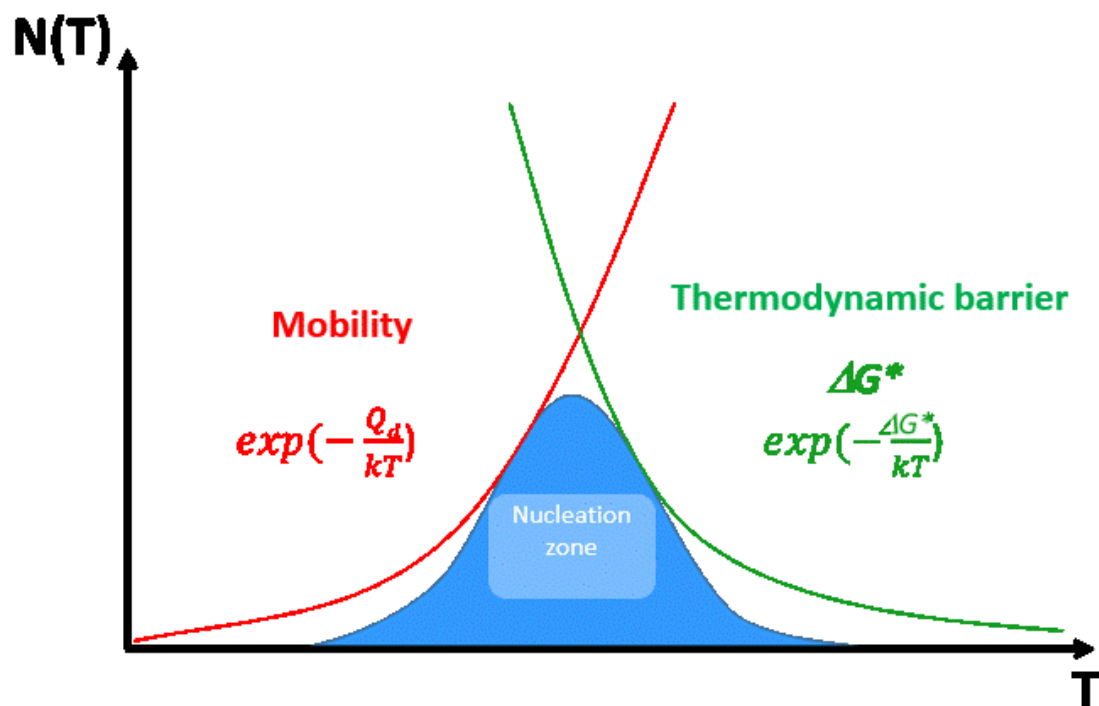


Figure 8: Représentation schématique de la vitesse de nucléation en fonction de la température. La courbe rouge montre l'évolution de la mobilité moléculaire, et la courbe en vert représente l'évolution de la barrière thermodynamique de nucléation en fonction de la température.

Processus de croissance

La croissance est une étape qui fait suite à l'étape de la nucléation. En effet, lorsque les noyaux formés sont stables, c'est-à-dire que leurs rayons sont

supérieurs au rayon critique r^* , ils continuent à croître par agrégation de nouvelles molécules, pendant que d'autres quittent les noyaux. Comme pour la vitesse de nucléation, la théorie classique de nucléation-croissance décrit cette étape par des considérations à la fois thermodynamiques et cinétiques, la vitesse de croissance est fixée par la différence des vitesses de gain et de perte des molécules. Celle-ci peut ainsi être exprimée de la manière suivante :

$$c(T) \propto \exp\left(-\frac{A}{k.T}\right) \times \left[1 - \exp\left(-\frac{V.\Delta G_v}{k.T}\right)\right]$$

9

Où A est la barrière énergétique impliquée dans les phénomènes de diffusion et V le volume molaire.

Cette équation (9) décrit l'évolution de la vitesse de croissance en fonction de la température. À basse température, la mobilité moléculaire diminue, ce qui entraîne une diminution de la vitesse de croissance. À une température proche de la température de fusion du cristal T_m , la croissance ralentit aussi en raison de la diminution de la force motrice de cristallisation. Ces caractéristiques induisent le passage de la vitesse de croissance, schématisée en rouge sur la Figure 9, par un maximum.

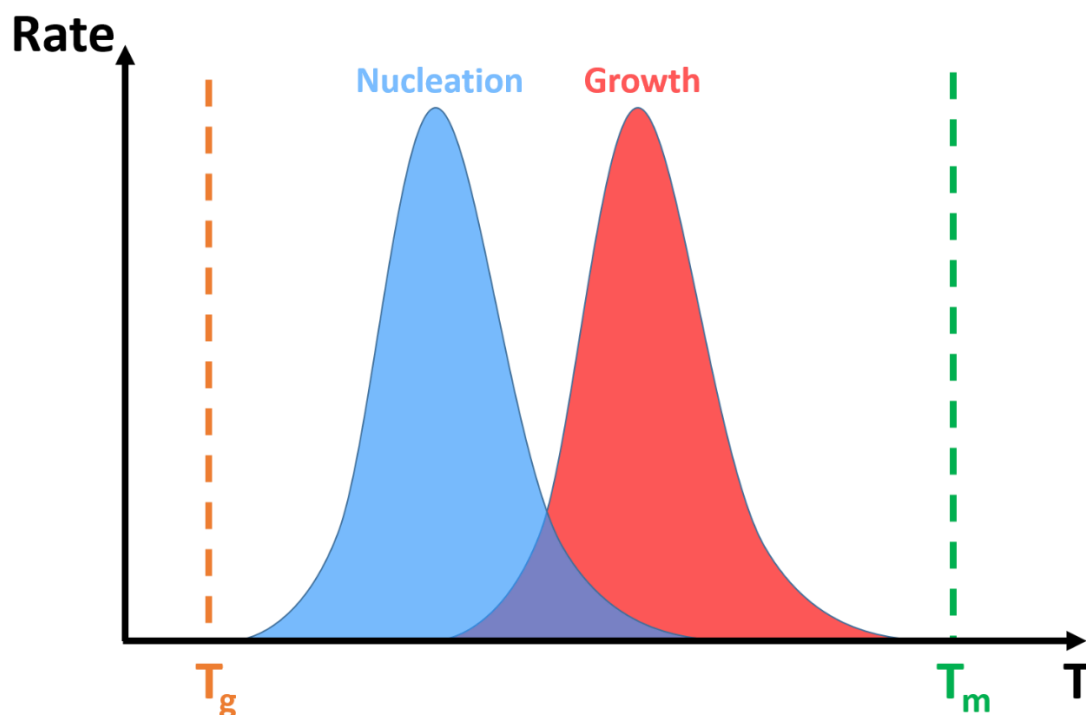


Figure 9: Représentation schématique des vitesses de nucléation et de croissance en fonction de la température. T_g est la température de transition vitreuse et T_m la température de fusion du cristal. La zone de recouvrement correspond au domaine de température favorable à la formation du cristal.

D'une manière générale, les maximums des courbes de la vitesse de nucléation et de la vitesse de croissance présentent un écart en température plus ou moins important ce qui impacte directement la capacité à vitrifier un liquide¹³. Ainsi, un matériau est caractérisé comme bon formateur de verre lorsque les deux domaines sont très séparés. À l'inverse, la zone de recouvrement des deux courbes correspond au domaine dans lequel la formation du cristal est très favorable car il y a à la fois nucléation et croissance.

Les limitations pharmaceutiques de la majorité des médicaments dues essentiellement à l'insolubilité des formes cristallines des principes actifs dans l'eau nécessitent le développement des systèmes visant à améliorer la biodisponibilité des médicaments administrés et à contrôler la quantité du principe actif (PA) libéré dans le temps. Dans cette optique, plusieurs approches sont utilisées visant à la fois à accroître la surface spécifique et la solubilité¹⁴.

On peut citer notamment : l'utilisation des matrices polymères pour disperser à l'échelle moléculaire le principe actif de manière à obtenir une dispersion moléculaire amorphe^{15,16}. Cette approche présente quelques inconvénients liés à la recristallisation potentielle du principe actif vers la forme la plus stable mais aussi à la distribution hétérogène et non-uniforme du principe actif au sein de la matrice polymère ce qui implique une difficulté à contrôler la quantité libérée. Une autre stratégie qui a également été largement développée consiste à former un sel à partir d'un principe actif ionisable¹⁷⁻¹⁹. Cette approche présente quelques limitations quant à la conversion potentielle du sel vers les formes acides et basiques de la substance active qui peut se produire *in vitro* mais aussi *in vivo* alternant ainsi la cinétique de dissolution. D'autres stratégies reposent sur la formation des co-cristaux et co-amorphes à partir d'un principe actif et d'un co-formeur. Cependant les caractéristiques attrayantes des matrices de silice mésoporeuses (MSMs) font d'elles des bons candidats pour d'une part améliorer la solubilité, mais aussi de prolonger et sous certaines conditions cibler la libération des principes actifs. Une des stratégies pour cibler la libération du principe actif a été de conceptualiser un enrobage du composite (PA + MSMs) par une matrice polymère qui puisse répondre à un stimuli de pH et déclencher ainsi la libération selon le pH du milieu^{20,21}.

I.1.3. Matrices de silice mésoporeuses et confinement

D'une manière générale, les matériaux poreux à l'échelle nanométrique et leurs propriétés suscitent un intérêt croissant auprès de la communauté scientifique dans plusieurs domaines et pour diverses applications telles que : le stockage de gaz^{22,23}, le raffinement d'huile^{24,25}, mais aussi dans le domaine pharmaceutique^{26,27}.

Ces matériaux poreux ont été classés par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) en trois catégories selon la taille des pores:

Les matériaux **macroporeux** dont le diamètre des pores est supérieur à 50 nm. Ces matériaux sont utilisés notamment pour la filtration des fluides²⁸.

Les matériaux **microporeux** possédant un diamètre de pores inférieur à 2 nm tels que les zéolithes et les Metal Organic Frameworks (MOFs). Ils sont largement utilisés dans le stockage et libération de gaz²².

Enfin, les matériaux **mésoporeux** qui ont un diamètre des pores compris entre 2 nm et 50 nm, on peut citer notamment l'alumine mésoporeuse utilisée dans diverses applications telles que la catalyse²⁹ mais aussi la silice mésoporeuse qui va être décrite dans le paragraphe suivant.

I.1.3.1 Matrices de silice mésoporeuses

Les matrices de silice mésoporeuses sont des structures poreuses composées de silice. Elles ont suscité un intérêt croissant en raison de leurs propriétés texturales. En effet, ces matrices de silice mésoporeuses possèdent une grande surface spécifique et une capacité d'encapsulation des molécules importante, faisant d'elles des matériaux prometteurs pour des applications pharmaceutiques.

Les matrices de silice mésoporeuses qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail, sont les MCM-41 et les SBA-15. Ce sont des matrices ordonnées qui présentent une structure bidimensionnelle hexagonale. Cet aspect est important dans la mesure où l'arrangement ordonné des canaux favorisera la détection des nanocristaux.

- MCM-41 (Mobil Composition of Matter n°41)

Ces matériaux mésoporeux ont été décrits pour la première fois par Kresge et al. en 1992 qui a suggéré que les MCM-41 sont formés par un mécanisme de liquid crystal templating (LCT)³⁰ avec des micelles cylindriques agissant en tant qu'agents directeurs de la structure lors de la formation du matériau mésoporeux.

La Figure 10 présente d'une manière schématique les différentes étapes conduisant à la formation des MCM-41. Tout d'abord, les surfactants ioniques forment des micelles en forme de bâtonnets, ces bâtonnets vont s'organiser pour former un réseau hexagonal, ensuite, le précurseur de la silice (TEOS :

tetraethylorthosilicate) est ajouté à la solution pour permettre à cet élément de recouvrir le réseau créé par les canaux cylindriques. Enfin la dernière étape qui consiste en le vieillissement et la calcination du composite résultant permet d'éliminer la matrice organique.

Les propriétés texturales et notamment la taille des pores du produit final (qui varie pour ce type de matériau entre 1.5 et 10 nm) dépend de la taille des micelles^{30,31}. Par conséquent, et afin d'ajuster la taille des pores, une des voies est d'adapter le système micellaire. En plus, il a été montré que la modification du ratio molaire entre le surfactant et le précurseur de la silice permet d'explorer un nouvel arrangement des canaux cylindriques³². En effet, un rapport de 1 engendre un réseau hexagonal tandis qu'un rapport de 0.6 induit une structuration cubique, ces matrices mésoporeuses de structure cubique sont appelées « MCM-48 ».

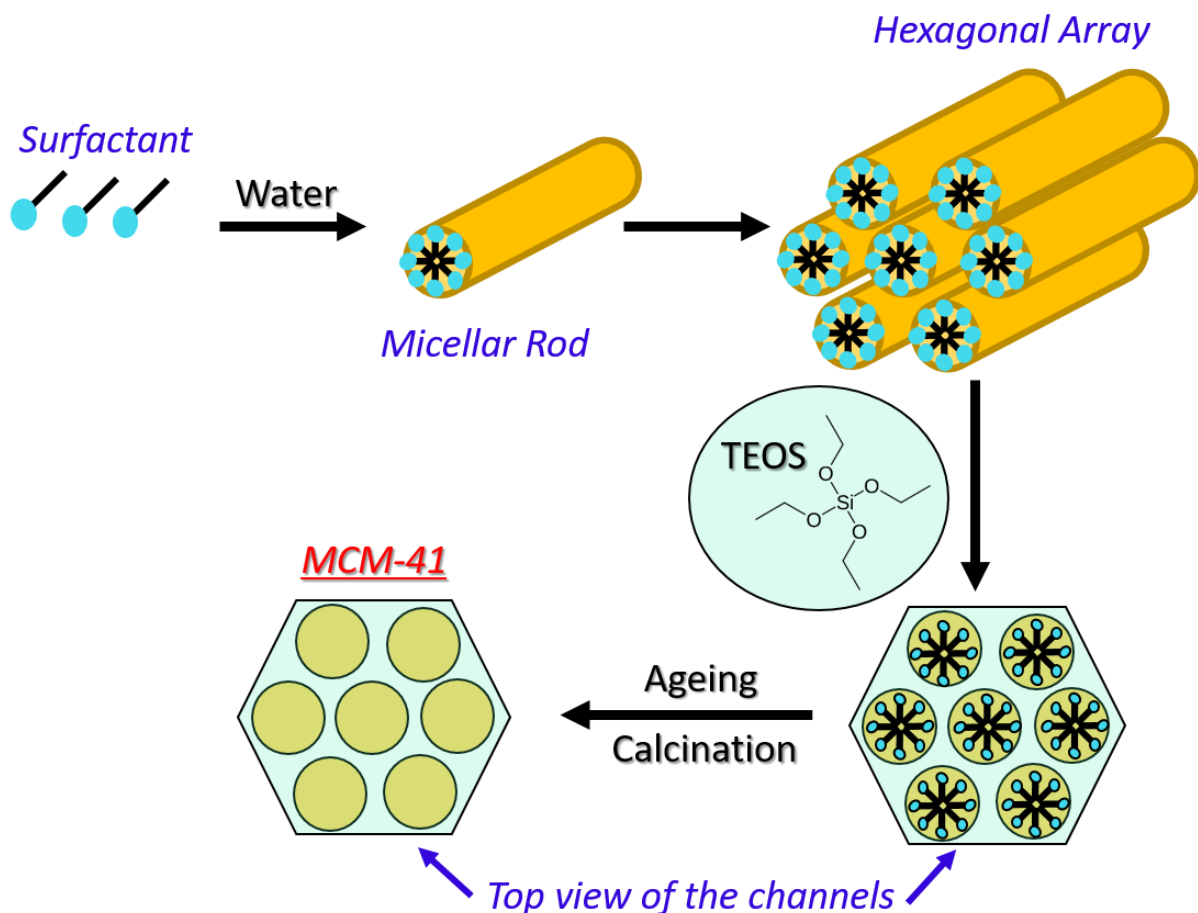


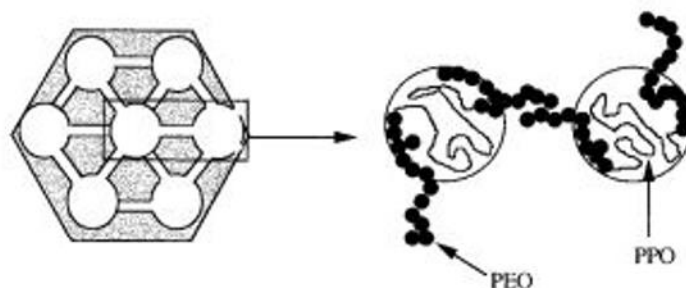
Figure 10: Schéma de la synthèse des MCM-41.

- SBA-15 (Santa Barbara Amorphous n°15)

Les SBA-15 font partie des variétés des matrices de silice mésoporeuses, elles ont été synthétisées pour la première fois en 1998 par Zhao et al ^{33,34}. Contrairement aux MCM-41, leur synthèse repose sur l'utilisation des surfactants non ioniques tels que les triblocs copolymères agissant comme étant l'élément directeur de la structure mésoporeuse, ces copolymères sont composés de trois blocs, un central de l'oxyde de propylène (PO) et deux blocs externes de l'éthylène glycol (EO). Le copolymère utilisé lors de la synthèse des SBA-15 est le Pluronic P123 : $(EO_{20}PO_{70}EO_{20})$. À l'instar des MCM-41, les étapes de synthèse des SBA-15 comprennent la dissolution du surfactant dans un premier temps, l'introduction de la source de silice dans un second temps, et finalement le vieillissement et la calcination.

Comme pour les MCM-41, la structure mésoporeuse des SBA-15 est hexagonale³⁵. En effet un faible ratio EO:PO engendre une structure des pores hexagonale, tandis qu'un ratio important favorise plutôt la structure cubique typiquement l'utilisation du copolymère Pluronic F127 $(EO_{106}PO_{70}EO_{106})$ permet de former les SBA-16 connus pour leur périodicité cubique³⁶.

Une particularité qui concerne les SBA-15 est la présence de la microporosité en plus de la mésoporosité³⁷. Ces micropores (qui peuvent former jusqu'à 30% du volume poreux total³⁸) sont générés perpendiculairement à l'axe des canaux comme le montre la *Figure 11*, et sont dus principalement à des interactions entre les groupements dans la direction radiale de la micelle.



*Figure 11: Représentation schématique des mésopores et micropores des SBA-15.
(Référence ³⁹)*

La température de synthèse est le paramètre essentiel qui permet la modification de la taille des pores des SBA-15^{39,40}. Celles-ci varient entre 5 et 30 nm. La surface spécifique de ces matrices mésoporeuses sont généralement comprises entre 690 et 1040 m²/g et l'épaisseur des murs est de l'ordre de 3 à 6 nm contre seulement 1 nm pour les MCM-41^{40,41}.

I.1.3.2 Méthodes de chargement

Il existe de nombreuses techniques classées sur la Figure 12 permettant de charger un principe actif au sein d'une matrice de silice mésoporeuse.

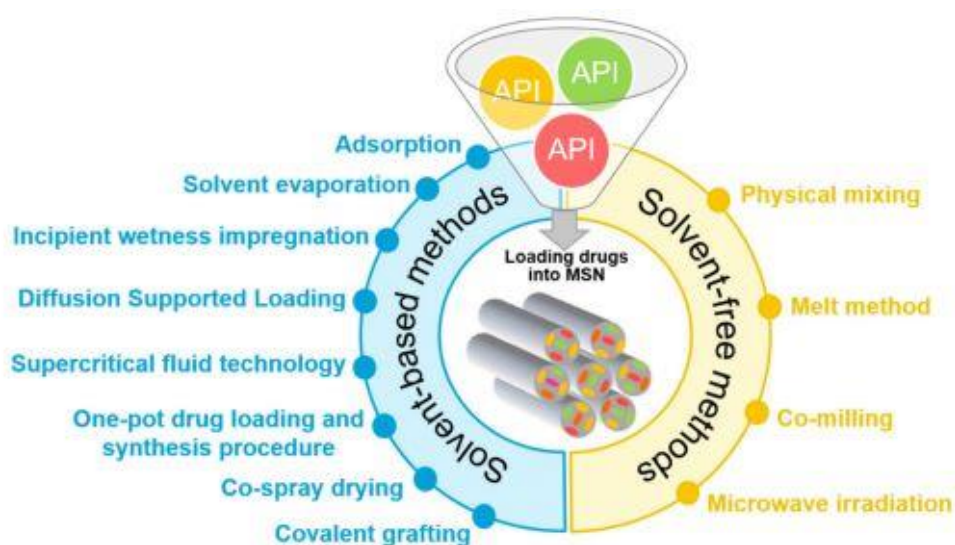


Figure 12: Schéma des différentes méthodes utilisées pour charger les principes actifs dans les matrices de silice mésoporeuses.
(Référence⁴²)

Parmi les plus connues, on peut citer : le chargement en solution^{43,44}, le chargement par fusion^{43,45} et le chargement par spray-drying^{45,46}, ces méthodes présentent quelques inconvénients liés à l'utilisation des solvants parfois toxiques ou encore la dégradation chimique lors de la fusion des principes actifs. Cependant, Malfait et al. ont développé tout récemment une méthode de chargement par broyage à l'état solide^{27,47} pour contourner les obstacles inhérents aux méthodes citées précédemment.

Le chargement en solution

Il s'agit d'une méthode de chargement qui nécessite l'utilisation des solvants pour dissoudre dans un premier temps le principe actif, pour pouvoir ensuite l'incorporer dans la matrice mésoporeuse par capillarité, et en dernière étape évaporer le solvant pour ne garder que le principe actif piégé dans la matrice poreuse. Étant donné la solubilité très faible des principes actifs dans l'eau, nous avons parfois recours à l'utilisation des solvants organiques non-biocompatibles, non seulement pour dissoudre le principe actif mais également pour augmenter la capacité de chargement. Dans ce contexte, Charnay et al.⁴⁸ ont étudié l'impact des solvants sur la quantité d'ibuprofène confiné. Ils ont montré que les solvants à haut degré de polarité tels que le DMSO (diméthylsulfoxyde), DMF (diméthylformamide) et le DMA (diméthylacétamide) permettent d'avoir une faible quantité d'ibuprofène confiné contrairement à l'éthanol et l'hexane, ils ont montré également que comparé à l'éthanol, la quantité d'ibuprofène confiné est triplée lors de l'utilisation de l'hexane.

Les inconvénients majeurs de cette méthode sont l'utilisation des solvants parfois très toxiques mais aussi l'adsorption des molécules du principe actif sur la surface externe des matrices poreuses qui nécessite une étape de lavage du composite résultant, provoquant ainsi la perte des molécules qui se trouvent à l'intérieur des pores.

Le chargement par fusion

Cette méthode de chargement nécessite la chauffe du principe actif jusqu'à sa température de fusion. Cette caractéristique rend la technique très délicate et surtout non adaptée aux matériaux pharmaceutiques dans la mesure où les températures très élevées peuvent dans certains cas dégrader chimiquement le principe actif et de ce fait, causer une perte d'une partie ou de la totalité de ses fonctions thérapeutiques.

Le chargement par spray-drying

Cette technique est largement répertoriée dans la littérature pour charger les matériaux pharmaceutiques^{46,49-51}. Tout comme le chargement en solution, cette méthode consiste en l'utilisation d'un solvant dans lequel le principe actif est dissous, puis les matrices de silice mésoporeuses sont ajoutées au mélange. La solution résultante est pulvérisée en fines gouttelettes dans une chambre au contact d'air chaud ce qui permet d'évaporer le solvant en créant une grande surface de contact entre la solution et l'air. La poudre est enfin collectée par un système de filtration.

Le chargement par broyage « Milling-Assisted Loading »

Principe de la méthode

Cette méthode de chargement, dont le principe est illustré sur la Figure 13, a été développée récemment au sein de l'équipe MMT de l'UMET par Malfait et al.⁴⁷ et a été appelée MAL pour «Milling-Assisted Loading». Elle consiste à co-broyer le principe actif avec la matrice de silice mésoporeuse. En effet, les investigations menées par Malfait et al. ont montré que le co-broyage du principe actif avec la matrice de silice mésoporeuse pendant 30 minutes en utilisant un broyeur oscillant à 30 Hz permet de charger une quantité non-négligeable du principe actif pouvant aller jusqu'à 37% tout en préservant la structure hexagonale de la matrice poreuse⁴⁷. C'est une technique qui présente des avantages significatifs principalement par rapport aux méthodes de chargement par capillarité en vue d'applications thérapeutiques.

- Il n'y a pas d'utilisation de solvants organiques souvent toxiques et donc incompatibles avec l'application thérapeutique, ni risque de dégradation chimique du principe actif amené au-dessus de sa température de fusion
- Il y a possibilité de charger une quantité significative à l'intérieur des pores
- Il est possible de quantifier le dosage exact de principe actif chargé à l'intérieur des pores si inférieur au remplissage maximum préalablement déterminé (< 35% de la masse de silice mésoporeuse), ce qui est compatible avec des traitements personnalisés

- Il n'y a pas nécessité de nettoyage pour enlever le principe actif qui n'est pas chargé à l'intérieur des canaux
- La matrice inorganique protège le principe actif des attaques physiologiques

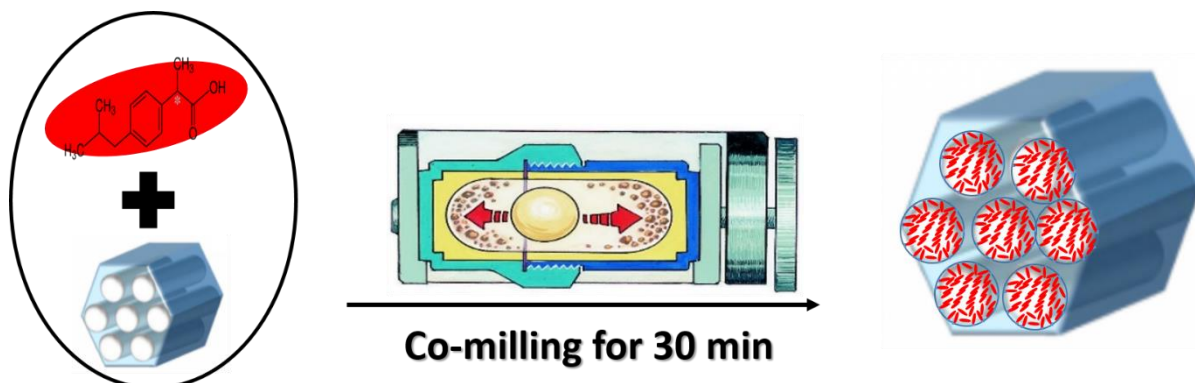


Figure 13: Schéma décrivant le principe du MAL «Milling-Assisted Loading», le chargement à l'état solide.

Effet du broyage (à 30 Hz) sur les matrices mésoporeuses

Connaître l'impact du broyage sur la structure mésoporeuse des matrices de silice est d'une importance fondamentale. Dans une étude précédente⁴⁷, Malfait et al. ont effectué des investigations par physisorption et par microscopie électronique à transmission (TEM) pour évaluer cet impact. La Figure 14 montre des analyses en TEM de deux exemples des SBA-15, avant (Figure 14.a) et après broyage (Figure 14.b). Les profils d'intensité correspondant (Figure 14.c) permettent d'évaluer la taille moyenne des pores qui est de l'ordre de 7.9 nm pour les SBA-15 avant broyage et de 7.2 nm pour les SBA-15 après broyage. Cette analyse a permis de conclure que l'effet du broyage sur la taille des pores est visiblement très négligeable. En plus du diamètre des pores qui est conservé, la structure périodique des canaux cylindrique est également préservée.

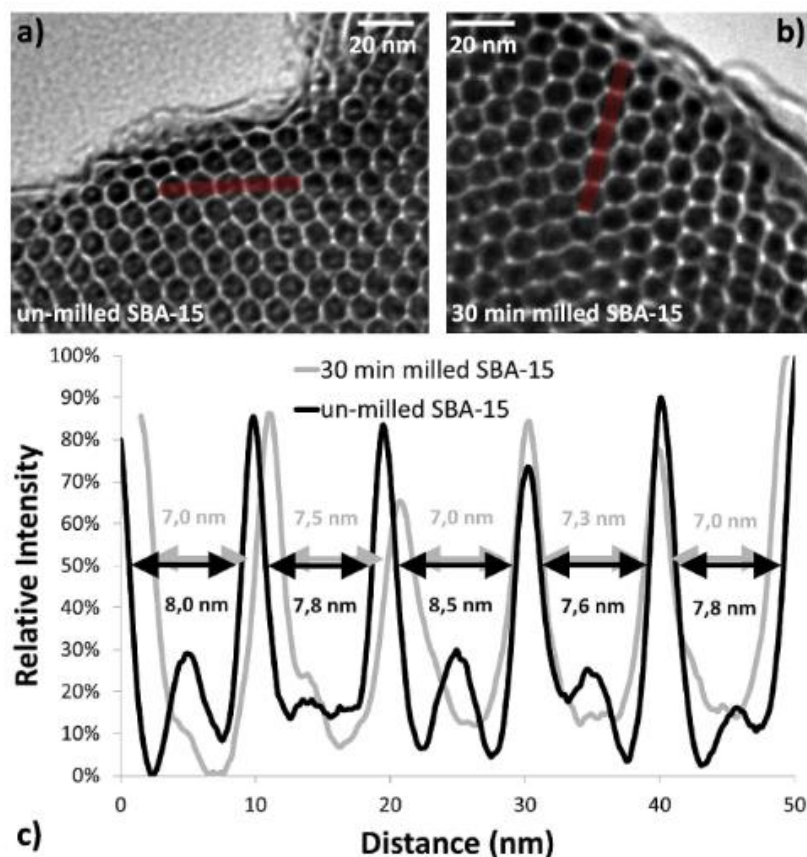


Figure 14 Analyses par microscopie électronique à transmission: (a) SBA-15 non-broyé, (b) SBA-15 broyé pendant 30 min à 30 Hz, et (c) Profils d'intensité des SBA-15 avant broyage (ligne noire) et après broyage (ligne grise). Les bandes rouges correspondent aux zones sélectionnées pour calculer les profils d'intensité. (Référence⁴⁷)

L'état physique des principes actifs confinés par broyage

La méthode de chargement à l'état solide est considérée comme étant la seule technique qui permet de manipuler l'état physique du principe actif confiné en jouant sur certains paramètres géométriques de la matrice mésoporeuse^{27,52}. Cette technique de chargement a été répertoriée dans la littérature et a montré ses preuves sur plusieurs principes actifs, l'ibuprofène^{27,47,53}, l'indométhacine⁵² et la caféine⁵⁴. En effet, la première étude⁴⁷ effectuée par Malfait et al. en 2019 a montré qu'un broyage à 30 Hz pendant 30 minutes de l'ibuprofène avec les matrices de silice mésoporeuses SBA-15 dont la taille des pores est à peu près égale à 7 nm permet de confiner et stabiliser jusqu'à 37% en masse

d'ibuprofène dans un état amorphe au sein des SBA-15. L'amorphisation de l'ibuprofène par broyage mécanique n'étant possible qu'à des températures bien inférieures à sa température de transition vitreuse ($T_g = -50\text{ °C}$)⁵⁵, une signature amorphe suite à un broyage à la température ambiante a servi d'indicateur du confinement de la matière.

Une étude suivante²⁷, réalisée par le même groupe en 2020 a mis en évidence par spectroscopie Raman, par DSC (Differential Scanning Calorimetry) et par diffraction des rayons X, l'impact de la taille des pores sur l'état physique de l'ibuprofène confiné. D'après cette étude, le co-broyage pendant 30 minutes à 30 Hz de 35% en masse d'ibuprofène avec les matrices de silice mésoporeuses de diamètre de pore égal à 9 nm {SBA-15 [9nm]} permet de confiner le principe actif dans un état mixte constitué de matière amorphe et nanocristallisée. La présence des nanocristaux a nécessité des investigations supplémentaires pour montrer qu'ils sont bien à l'intérieur des pores, pour cela, l'analyse du comportement du composite à la première et seconde chauffe a été effectuée (Figure 15). Dans la mesure où le confinement dans les matrices de silice mésoporeuses inhibe le phénomène de nucléation précurseur de la recristallisation de l'ibuprofène, la détection d'une recristallisation lors de la seconde chauffe du composite indiquerait la présence de l'ibuprofène à l'extérieur des pores. Cette étude a montré la possibilité de charger l'ibuprofène à l'état nanocristallin, impossible à réaliser par capillarité. La limite de chargement par broyage de l'ibuprofène dans les SBA-15 [9nm] a été déterminée entre 35% et 40%.

Plus tard en 2021, le chargement à l'état solide de l'indométhacine ($T_g = 42\text{ °C}$) dans les MCM-41, dont le diamètre des pores est de l'ordre de 3 nm, a permis de mettre en évidence un comportement inhabituel de la matière confinée⁵². En particulier, une transformation amorphe – amorphe via une cristallisation partielle a été observée en effectuant une isotherme à la température ambiante ou lors d'une chauffe dans une gamme de température allant de 30 à 100 °C.

Les mécanismes qui régissent ce phénomène sont différents selon la voie expérimentale choisie (isotherme ou non-isotherme).

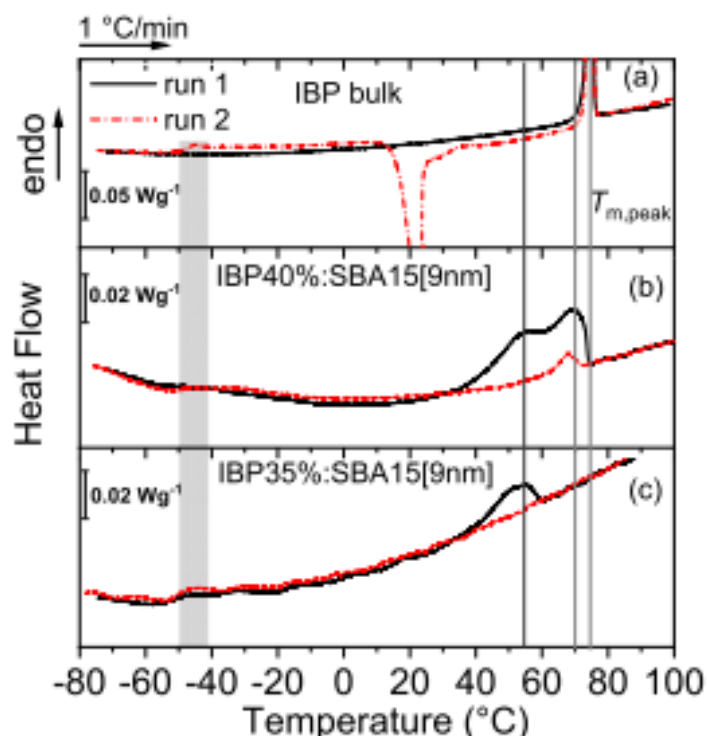


Figure 15: Thermogramme DSC à une vitesse de chauffe de 1 °C/min pour (a) l'ibuprofène en bulk, (b) 40% d'ibuprofène co-broyé avec 60% des SBA-15[9nm] et (c) 35% d'ibuprofène co-broyé avec 65% des SBA-15[9nm]. (Référence ²⁷)

Lors de la chauffe du composite, les nanocristaux deviennent instables et fondent avec l'augmentation de la température. Cependant, lors du vieillissement du composite à température ambiante, l'instabilité des nanocristaux est plutôt due à un mécanisme suivant lequel les clusters volumineux des nanocristaux se dissolvent en transférant leurs masses à des clusters plus petits⁵².

La méthode de chargement par broyage a été également testée sur la caféine⁵⁴, qui possède deux formes polymorphiques, notées CAF-I et CAF-II. Cette étude montre deux résultats intéressants. Tout d'abord, elle met en valeur cette méthode de confinement par rapport à la méthode de chargement par capillarité, dans la mesure où le chargement à l'état solide de la caféine permet de confiner la forme polymorphique souhaitée. Mais aussi, elle met en évidence l'existence, uniquement sous confinement, d'une autre forme de la caféine

notée CAF-I' ⁵⁴. Cette forme se place à la frontière entre un état amorphe et un état nanocristallin présentant un désordre orientationnel et est stable dans une large gamme de température allant de la température ambiante jusqu'à 150 °C. Les différentes études menées sur le confinement de principes actifs par broyage mécanique, ont montré que cette méthode de chargement permet de mettre en évidence la présence de noyaux au sein de la matière amorphe confinée, via l'observation de phénomène de cristallisation à l'intérieur de canaux de diamètre inférieur à 10 nm. Il est ainsi possible d'obtenir des nanocristaux confinés dans la forme cristalline désirée. Il a été observé la recristallisation de l'indométhcine dans les formes alpha et gamma suivant que le chargement était réalisé par co-broyage de l'état alpha ou gamma⁵⁶.

I.1.4 Prolongement et control de libération

I.1.4.1 Prolonger la libération via les matrices de silice mésoporeuses

Les matrices de silice mésoporeuses possèdent des propriétés attrayantes telles qu'une grande surface spécifique, une distribution uniforme de taille des pores, une structure hexagonale ou cubique selon les modèles mais aussi une chimie de surface particulièrement facile à contrôler. Ces caractéristiques ont une influence directe sur les profils de libération. En effet la taille des pores et la chimie de surface constituent deux paramètres clés pour moduler la libération. La Figure 16 issue des travaux de Shen et al. met en évidence le ralentissement de la libération dû à la diminution de la taille des pores⁴⁹. Plus le diamètre des pores est grand, plus la libération est rapide. Cela peut être interprété par un mécanisme purement diffusif^{57,58}, dans lequel une interaction compétitive a lieu entre les molécules de solvants. Ces dernières se déplacent pour interagir avec la surface hydrophile des pores et vont ainsi déplacer les molécules du principe actif vers l'extérieur. Ceci est d'autant plus facile quand la taille des pores est grande impliquant ainsi une diffusion moléculaire plus rapide.

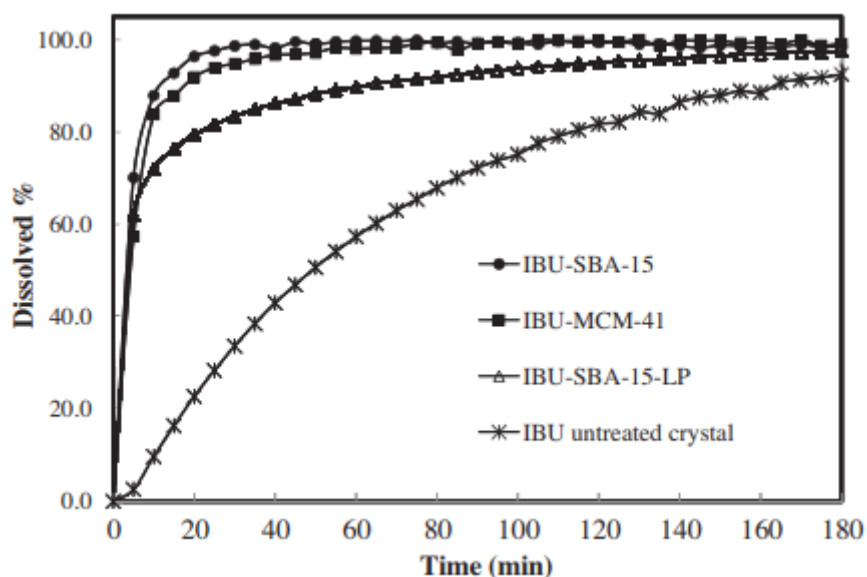


Figure 16: Profils de dissolution de l'ibuprofène cristallin, et de l'ibuprofène confiné montrant l'impact de la taille des pores sur la libération. (Référence ⁴⁹)

Modifier les profils de libération en favorisant les interactions du principe actif avec les groupements de la surface interne des canaux a été largement étudié^{44,59–62}. L'idée ici est de greffer des groupements différents que les silanols (...-Si-OH) sur la surface interne des matrices de silice mésoporeuses pour renforcer les interactions du principe actif avec la matrice hôte. Ces groupements peuvent être des acides ou des bases faibles, tels que les acides carboxyliques^{63,64} ou des amines^{60,65}. Ahmadi et al. ont effectué une fonctionnalisation de la surface des SBA-15 par un groupement amine (-NH₂) et ont montré l'impact de celle-ci sur la libération⁶⁶. La Figure 17.A met en évidence l'effet de la fonctionnalisation sur la libération. En effet, une libération moins rapide de l'ibuprofène confiné dans des SBA-15 fonctionnalisées a été observée, ceci est dû aux interactions principe actif/matrice qui deviennent plus fortes après la modification chimique de la surface. Ces interactions sont schématisées sur la Figure 17.B.

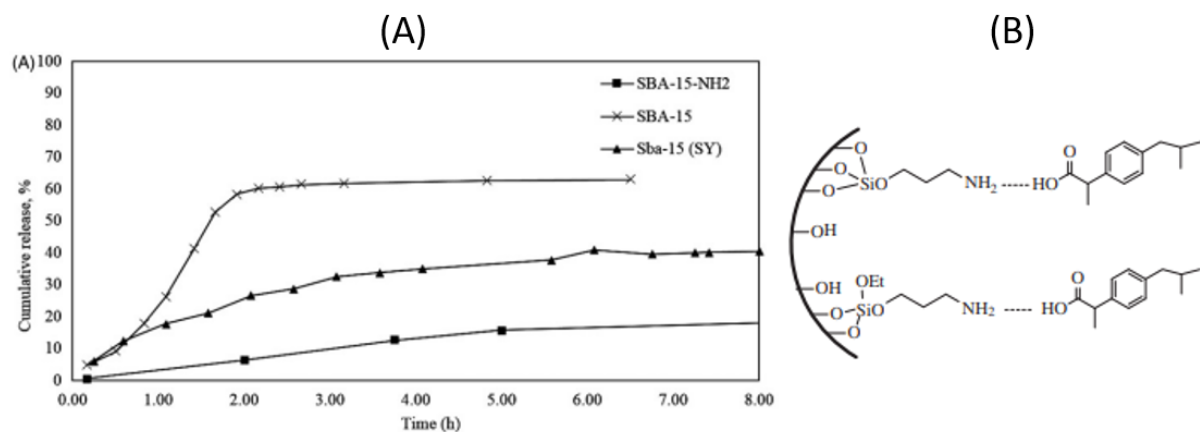


Figure 17: (A). Profils de libération de l'ibuprofène chargé dans des SBA -15 non fonctionnalisés (SBA-15, SBA-15(SY)) et fonctionnalisés (SBA-15-NH₂). (B) Schéma des interactions de l'ibuprofène avec la matrice fonctionnalisée (Référence ⁶⁶)

I.1.4.2 Cibler la libération via les matrices de silice mésoporeuses

La conception d'un système dit « intelligent » qui puisse répondre à un stimuli de pH est une approche qui permet de cibler la libération d'un principe actif. Cette approche repose sur l'enrobage des matrices de silice mésoporeuses dans lesquelles le principe actif sera confiné par un polymère qui assurera le déclenchement de la libération en fonction de ses propriétés physico-chimiques. Tian et al. ont étudié l'impact d'un enrobage des SBA-15 par l'acide polyacrylique sur la libération du doxorubicine en fonction du pH du milieu²⁰. La Figure 18 montre le comportement de la doxorubicine dans un milieu acide (pH=2) puis basique (pH=7.6). Les résultats montrent une faible quantité libérée environ 15% dans un environnement acide, contre ~64% à pH=7.6. La dépendance de la libération au pH du milieu peut être expliquée de la manière suivante: quand l'environnement est acide les chaînes polymériques se replient en raison de la formation des liaisons hydrogène entre les groupes COOH du polymère, ce qui implique une obstruction des pores. Par conséquent la diffusion du principe actif vers l'extérieur est entravée. À l'inverse, quand le milieu est basique la plupart des groupements COOH du polymère sont ionisés en COO⁻, ces groupements COO⁻ négativement chargés se repoussent entre

eux, créant ainsi de l'espace pour libérer le principe actif comme le montre le schéma de la Figure 18.

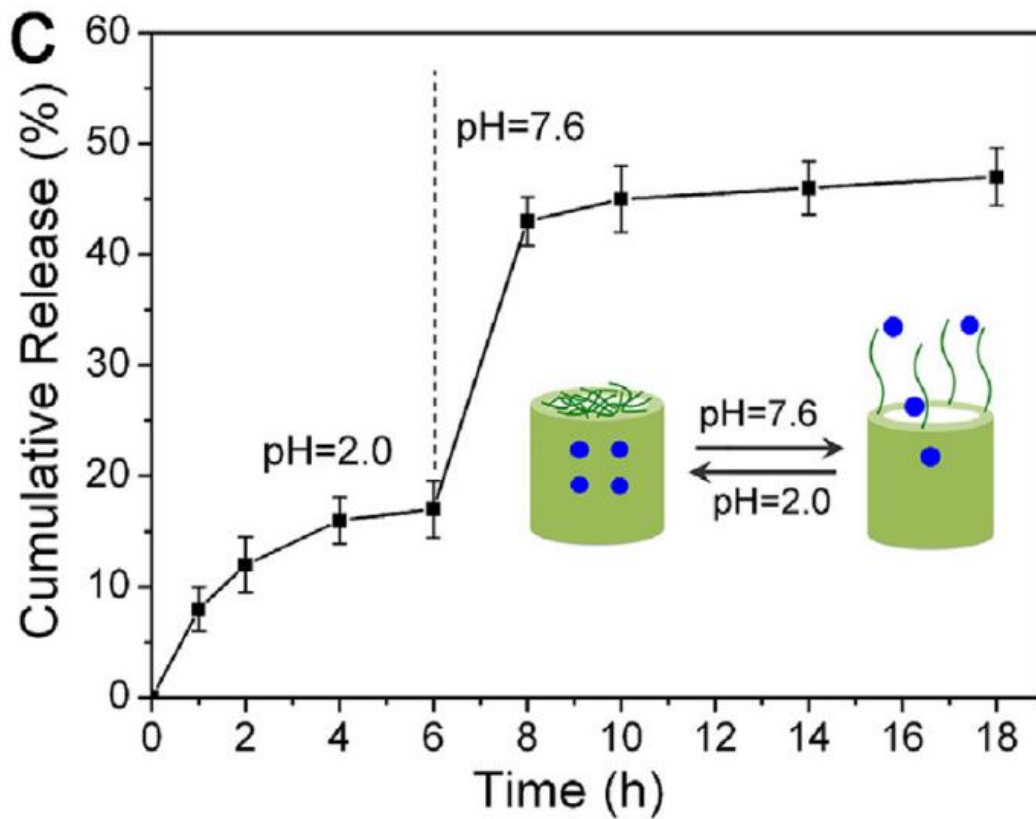


Figure 18: Profil de libération de la doxorubicine en fonction du pH du milieu.
(Référence ²⁰)

I.2 Les systèmes biomoléculaires

Les organismes vivants possèdent naturellement des molécules que l'on appelle *les biomolécules*. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme et les processus biologiques. Parmi ces biomolécules, on peut citer les plus connues telles que : les glucides, les lipides, les acides nucléiques et les protéines. Une attention particulière sera portée sur les protéines dans les paragraphes suivants afin de décrire leurs structures et les mécanismes responsables de leur stabilité et de leur dénaturation.

I.2.1 Protéines

Les protéines sont des biomolécules synthétisées à l'état déplié et se replient pour adopter les conformations respectives qui leur permettent d'exercer leurs fonctions biologiques, cet état est appelé *l'état natif*. Les fonctions assurées par les protéines au sein de l'organisme vivant sont nombreuses⁶⁷, on peut citer notamment les fonctions enzymatiques qui peuvent être assurées par la trypsine par exemple, les fonctions de structure que peut jouer le collagène, et d'autres fonctions responsables du conditionnement de l'ADN.

Formées à partir d'une séquence linéaire d'acides aminés dont la formule générale peut s'écrire comme suit « $NH_2C_\alpha RHC(=O)OH$ », les protéines vont avoir différents niveaux d'organisation allant de la structure primaire à la structure quaternaire décrits dans la partie suivante.

I.2.1.1 Structure des protéines

Les acides aminés, dont un exemple est illustré sur la Figure 19, présentent les éléments constitutifs de base des protéines. Ils possèdent un groupement carboxylique (-COOH), un groupement amide (-NH₂), et une chaîne latérale R qui offre aux acides aminés des propriétés physico-chimiques différentes permettant de les distinguer et de les classer selon les 3 catégories suivantes :

- Les acides aminés chargés : la charge de ces acides aminés dépend de la capacité des chaînes latérales à être protonables dans le cas d'une charge

positive ou à être déprotonables dans le cas inverse. On peut citer notamment l'arginine, la lysine, l'acide aspartique etc...

- Les acides aminés non chargés: les chaînes latérales de ces acides aminés ont la capacité de former des liaisons hydrogène. Parmi ces acides aminés, on trouve l'asparagine la cystéine, la sérine, la tyrosine etc...
- Les acides aminés hydrophobes: les groupements qui composent les chaînes latérales de cette variété sont incapables de former des liaisons hydrogène, tels que : la méthionine, l'alanine la glycine et le tryptophane.

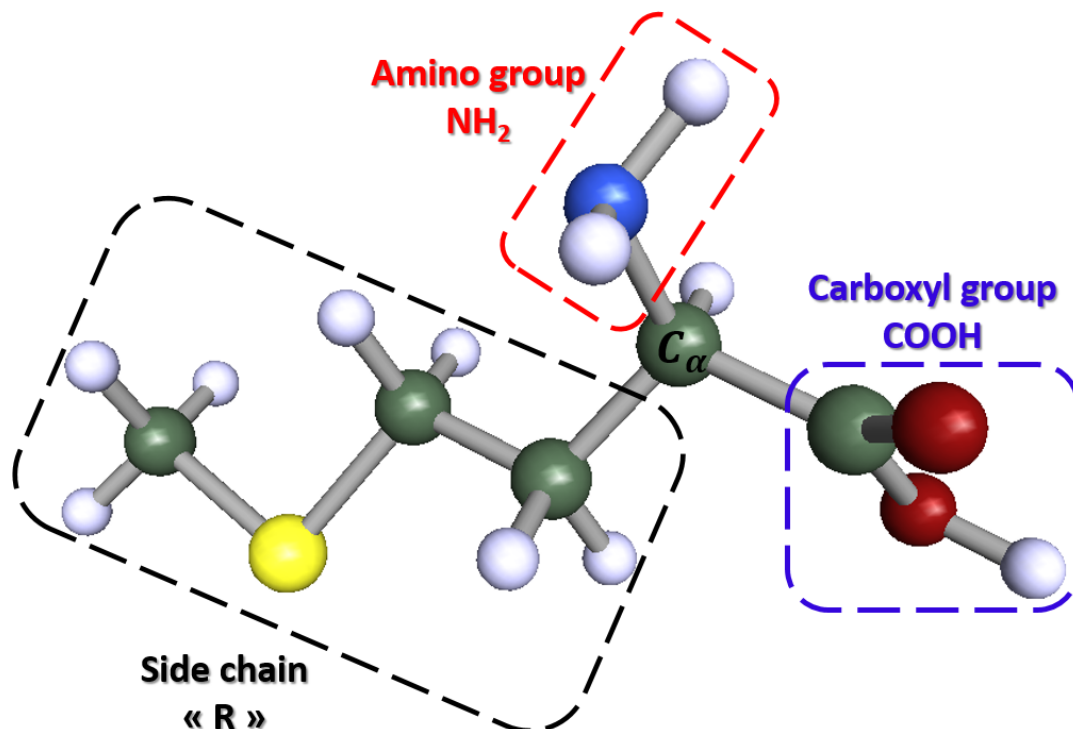


Figure 19: Représentation schématique d'un exemple d'acide aminé: La méthionine. Les sphères en rouge, en bleu, en jaune, en vert et en blanc représentent respectivement les atomes O, N, S, C et H, et les cadres pointillés en noir, en rouge et en bleu représentent respectivement la chaîne latérale R, le groupement amine NH_2 et le groupement acide COOH . (Molécule générée sur le logiciel TmoleX).

Les protéines possèdent trois (ou dans certains cas quatre) niveaux d'organisation structurale allant de la structure primaire à la structure tertiaire (ou quaternaire). Ces niveaux d'organisation sont schématisés sur la Figure 20.

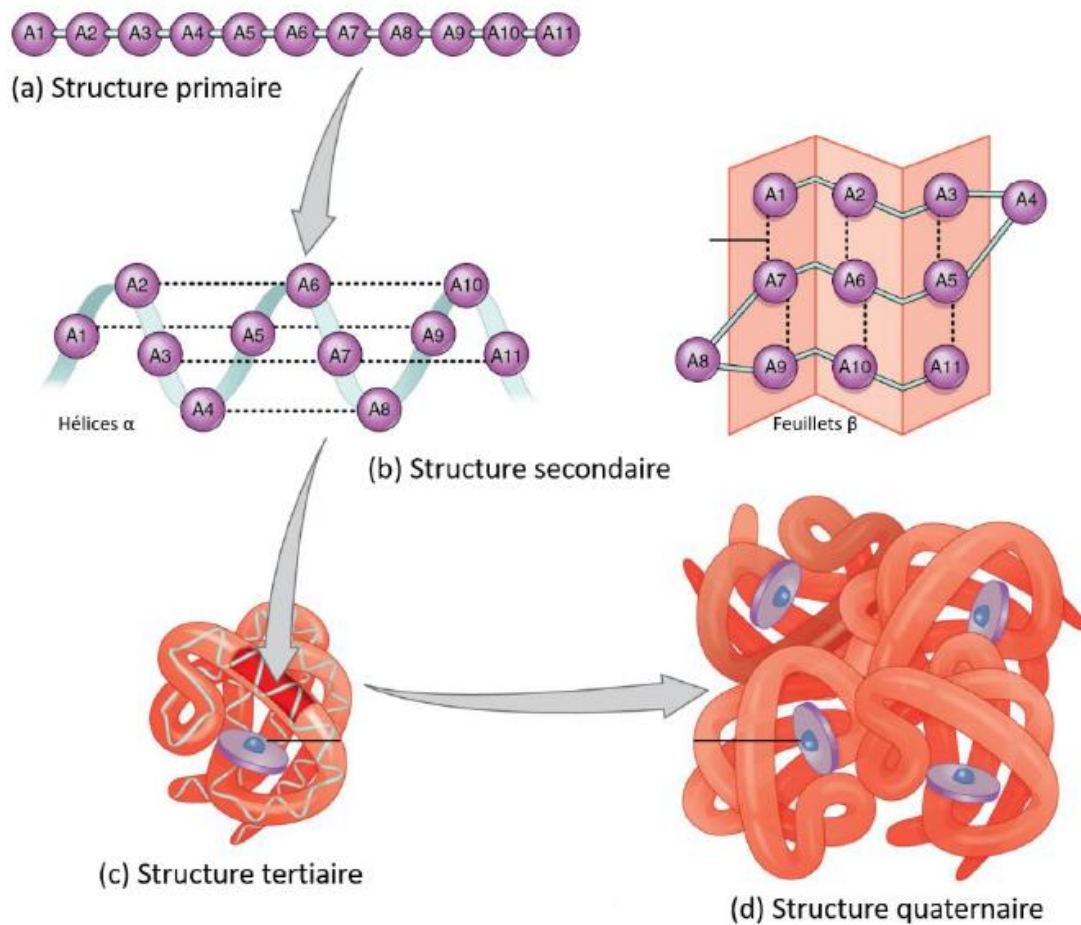


Figure 20: Organisation structurale d'une protéine.
(Référence ⁶⁸)

La *structure primaire*, qui correspond à la séquence des acides aminés constituant la protéine, résulte de la réaction chimique décrite sur la Figure 21. En effet, l'association entre deux acides aminés et la formation d'une liaison peptidique résultent de l'interaction entre le groupement carboxylique de l'un et le groupement amine de l'autre. Il en découle donc la production d'une molécule d'eau et la formation d'un dipeptide via la création d'une liaison dite *liaison peptidique*. Cette liaison est assez forte et n'est pas facilement rompue par les changements environnementaux de la protéine, ce qui confère à la structure principale une stabilité notable.

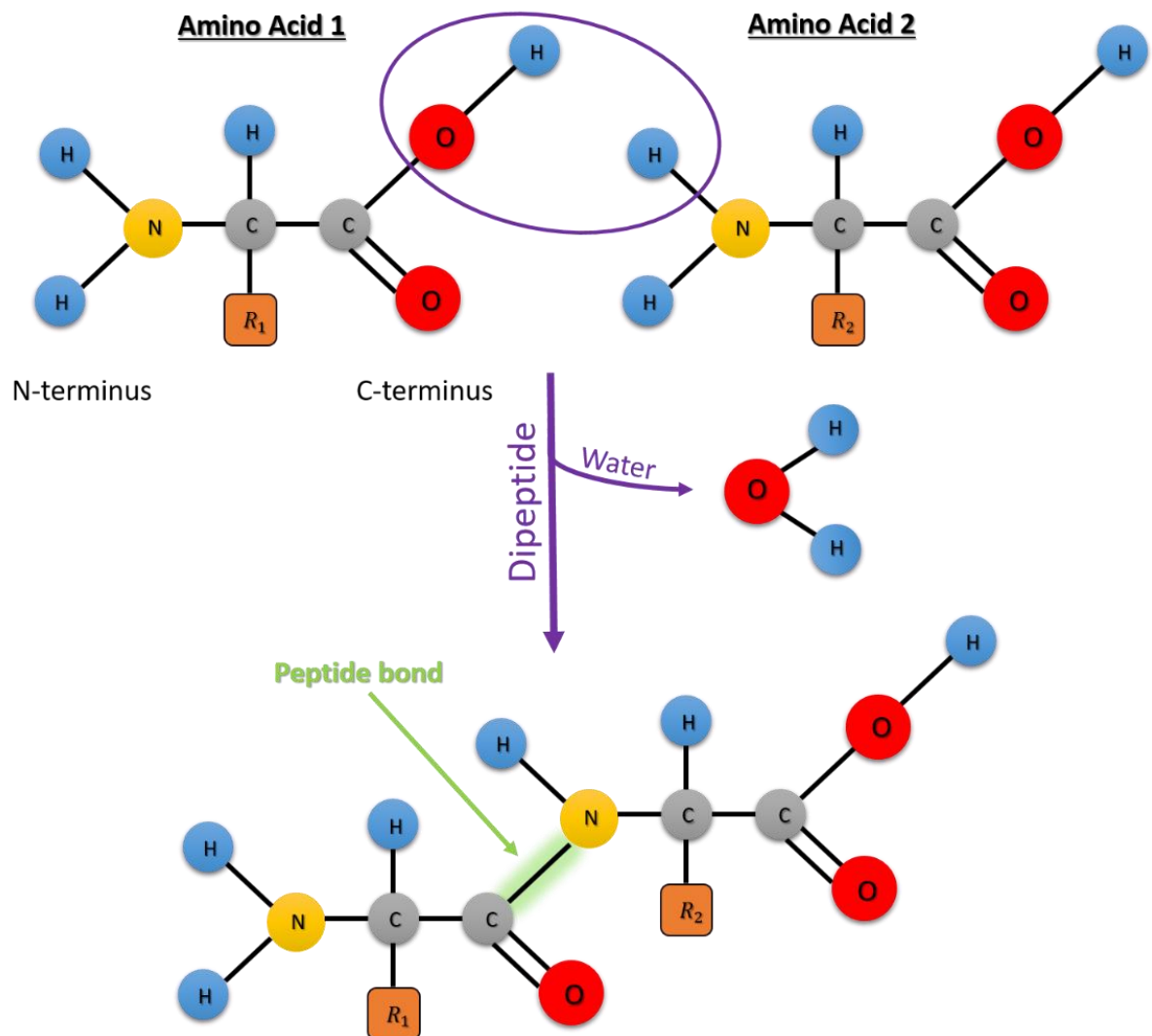


Figure 21: Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés. R_i représente la chaîne latérale de l'acide aminé i .

La *structure secondaire* est formée à partir du repliement local provoqué par l'effondrement hydrophobe puis par formation des liaisons hydrogène dans lesquels les groupes NH et CO de la chaîne principale (ou squelette) de la protéine sont impliqués.

On peut lister parmi ces structures les hélices α et les feuillets β . Les hélices α sont stabilisées par les liaisons hydrogène établies entre l'oxygène du groupement carbonyle d'un résidu n et l'hydrogène du groupement amide du résidu $n+4$ comme le montre la Figure 20.b. Ces liaisons hydrogène sont orientées quasi-parallèlement à l'hélice, ce qui permet de stabiliser cette structure. Sous l'effet d'une augmentation de la température ces liaisons

cassent et provoquent le dépliement de la structure secondaire, considéré comme la dénaturation de la protéine. Les feuillets β , quant à elles, résultent des liaisons hydrogène formées à partir des acides aminés éloignés dans la structure primaire mais alignés dans l'espace (Figure 20.b). Les interactions entre feuillets β sont souvent considérées comme précurseurs du phénomène d'agrégation.

Les éléments de la structure secondaire peuvent interagir mutuellement pour former un niveau supérieur d'organisation tridimensionnelle que l'on appelle *structure tertiaire*. L'arrangement en trois dimensions des structures secondaires décrit la forme finale que va adopter la protéine qui peut être globulaire telle que les enzymes ou fibreuse dont les configurations sont allongées. La structure tertiaire est assurée par différentes interactions entre les atomes des résidus de la protéine. Celles-ci peuvent être des liaisons covalentes (ponts disulfure), des liaisons ioniques (interactions électrostatiques), interaction de Van der Waals ou des liaisons hydrogène. Il est important de noter que l'ensemble des liaisons qui gouvernent la formation de la structure tertiaire joue un rôle déterminant dans la structure finale de la protéine, nécessaire à son activité biologique.

Dans certains cas, plusieurs sous-unités protéiques se rassemblent pour former un niveau supplémentaire d'organisation appelé *la structure quaternaire*. Ces sous-unités protéiques peuvent être identiques comme dans le cas des collagènes ou différentes dans le cas de l'hémoglobine.

Il est important de préciser qu'il existe une relation étroite et directe entre les niveaux d'organisation de la protéine et son activité biologique⁶⁹. En effet, une simple perturbation sur un niveau de structure se répercutant sur le niveau inférieur peut causer la perte partielle ou totale de l'activité biologique. Cette sensibilité impose un travail sérieux quant à l'utilisation et le stockage des protéines tout en préservant ses fonctions.

I.2.1.2 Repliement des protéines

Synthétisée à l'état déplié sous forme de longues chaînes d'acides aminés, la protéine se replie et adopte une organisation tridimensionnelle responsable de son activité biologique. Cet état est appelé *état natif* et est généralement considéré comme étant l'état le plus stable thermodynamiquement. Il est important de noter qu'il est très difficile de prédire cet état à partir de la séquence linéaire des acides aminés qui composent la protéine. Ce problème a été interprété par Levinthal dans les années 1970, il montre qu'une protéine ne se replie pas en explorant toutes les conformations qui lui sont accessibles. En effet, en raison de l'infinité des configurations possibles entre l'état déplié et l'état natif, il faudrait à la protéine une durée supérieure à l'âge de l'univers pour explorer toutes ces configurations. Statistiquement, l'état natif d'une protéine est fort improbable. À ce titre, un paysage énergétique en forme d'entonnoir a été proposé par Bryngelson et al.⁷⁰ et a été développé par Wolynes et al.⁷¹ dans les années 1995, il est schématisé sur la Figure 22. Ce schéma décrit les configurations selon deux axes, et reporte leurs énergies respectives selon le troisième axe. Les conformations dépliées de la protéine sont de hautes énergies et se situent donc en haut de l'entonnoir, ces conformations sont nombreuses et se positionnent dans la partie la plus évasée de l'entonnoir. Au fond de l'entonnoir on peut trouver le minimum d'énergie correspondant à l'état natif de la protéine, c'est-à-dire à l'état le plus stable. Entre l'état déplié et l'état natif, on trouve des multitudes d'états intermédiaires correspondant à des minimas locaux qui sont éventuellement peuplés lors du repliement de la protéine.

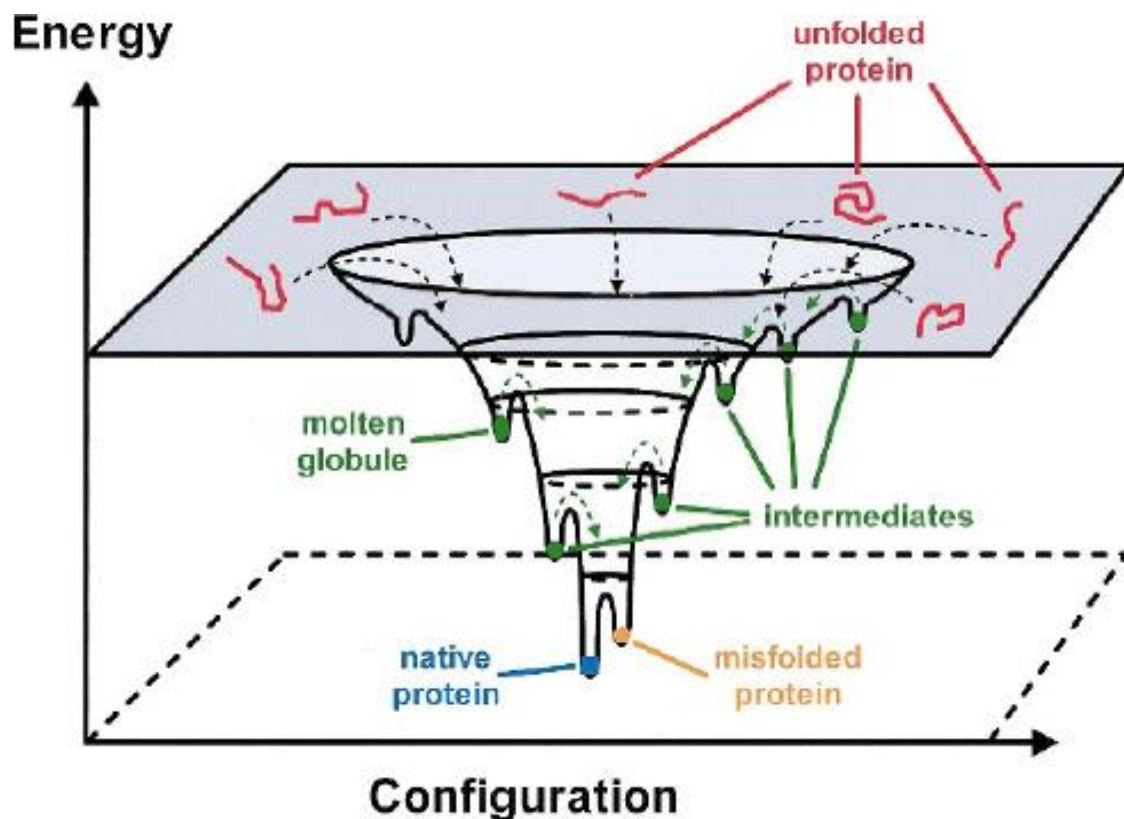


Figure 22 : Paysage énergétique des configurations possibles que peut explorer la protéine en partant de l'état déplié jusqu'à l'état plié. (Référence ⁷²).

Aujourd'hui, il est admis que les mécanismes qui pilotent le repliement des protéines sont essentiellement dus aux effets hydrophobes des résidus qui ont tendance à éviter le contact avec l'eau et à un degré moindre aux interactions électrostatiques et liaison hydrogène⁷³. Ces facteurs physico-chimiques permettent d'éliminer un nombre considérable de conformations, et restreindre ainsi le paysage énergétique de la protéine.

I.2.1.3 Stabilité thermodynamique des protéines

Les protéines sont marginalement stables en solution, compte tenu de l'écart, faible en énergie, qui existe entre l'état natif noté « N » et l'état déplié noté « U » (pour Unfolded state). Cet écart d'énergie est de l'ordre de 5 à 15 kCal/mol⁷⁴. Les conformations que peut adopter une protéine au niveau moléculaire peuvent être classées selon trois principales catégories d'états : un état natif « N », un état déplié « U » et des états intermédiaires dénaturés « D » explorés

par la protéine suite à l'exposition à des facteurs de dénaturation. Ces facteurs peuvent être la variation de la température⁷⁵, de la pression^{76,77} ou du pH⁷⁸ mais également l'ajout des agents chimiques dénaturants^{79,80}. La transition entre les deux états N et D est décrite par la différence de leurs énergies libres de Gibbs respectives G_N et G_D . Cette différence d'énergie est notée $\Delta G_{N,D}$ et s'écrit de la façon suivante:

$$\Delta G_{N,D} = G_D - G_N = \Delta H_{N,D} - T \cdot \Delta S_{N,D}$$

10

Où T est la température de la transition, $\Delta H_{N,D}$ son enthalpie et $\Delta S_{N,D}$ son entropie.

La courbe de $\Delta G_{N,D}$ en fonction de la température, appelée *courbe de stabilité*, est tracée sur la Figure 23. Elle montre le domaine de stabilité en température de la protéine, ce domaine est délimité par les deux températures T_{Dh} et T_{Dc} qui sont associées aux dénaturations chaudes et froides respectivement.

La dénaturation chaude est facile à observer lors de la chauffe de la protéine mise en solution tandis que la dénaturation froide est difficilement mise en évidence expérimentalement dans la mesure où elle peut être masquée par la cristallisation de l'eau de la solution à des températures inférieures à 0°C. Pour éviter ce problème, une solution est d'ajouter un agent chimique dénaturant qui permet de déstabiliser la protéine et par conséquent d'augmenter la température de sa dénaturation froide^{81,82}. L'application d'une très forte pression hydrostatique a été également utilisée en tant qu'outil efficace pour abaisser la température de cristallisation de l'eau pour pouvoir observer la dénaturation froide^{77,83,84}.

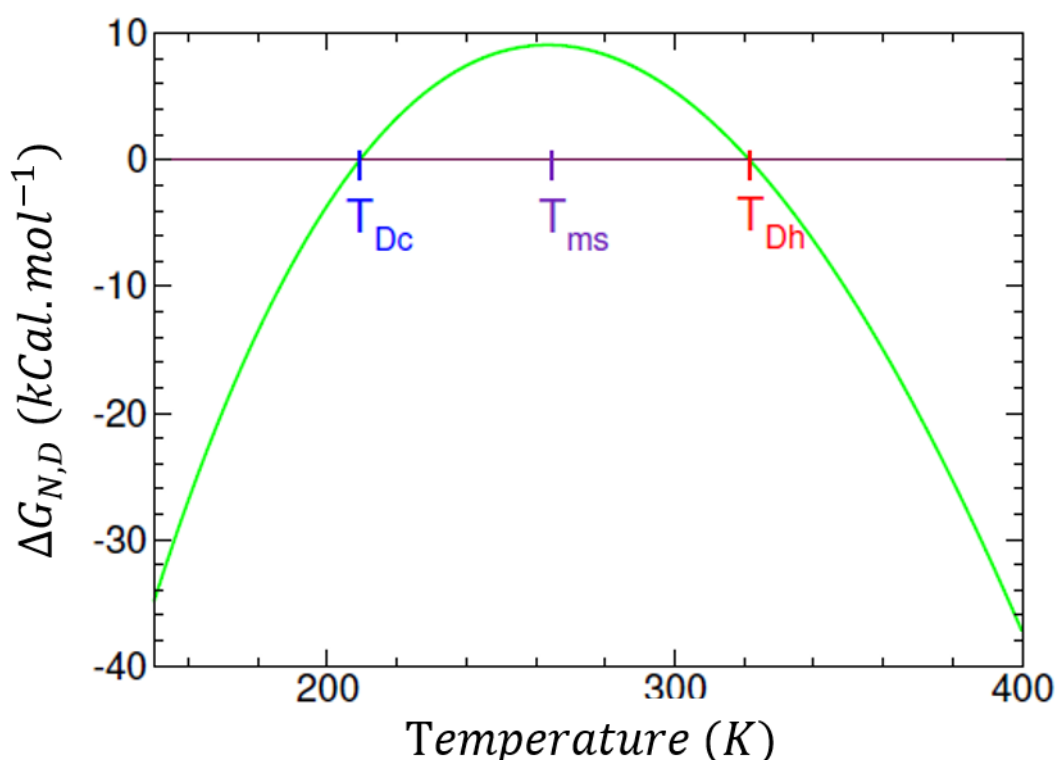


Figure 23: Courbe de stabilité d'une protéine. La température de dénaturation froide T_{Dc} et la température de dénaturation chaude T_{Dh} définissent l'intervalle de stabilité de la protéine. La température T_{ms} correspond au maximum de la courbe de stabilité.

En raison de la stabilité marginale de la protéine en solution sur une gamme de température restreinte (Figure 23), il est nécessaire de convertir la solution de protéine à l'état sec généralement immobilisée dans une matrice vitreuse qui lui assure une plus forte stabilité. L'une des approches les plus couramment utilisées dans le domaine pharmaceutique afin de stabiliser les protéines à usage thérapeutique est la lyophilisation.

1.2.1.4 Lyophilisation des protéines

La lyophilisation⁸⁵ est un processus qui repose sur trois étapes fondamentales basées sur les transformations de l'eau⁸⁶, ces étapes sont représentées sur la Figure 24.

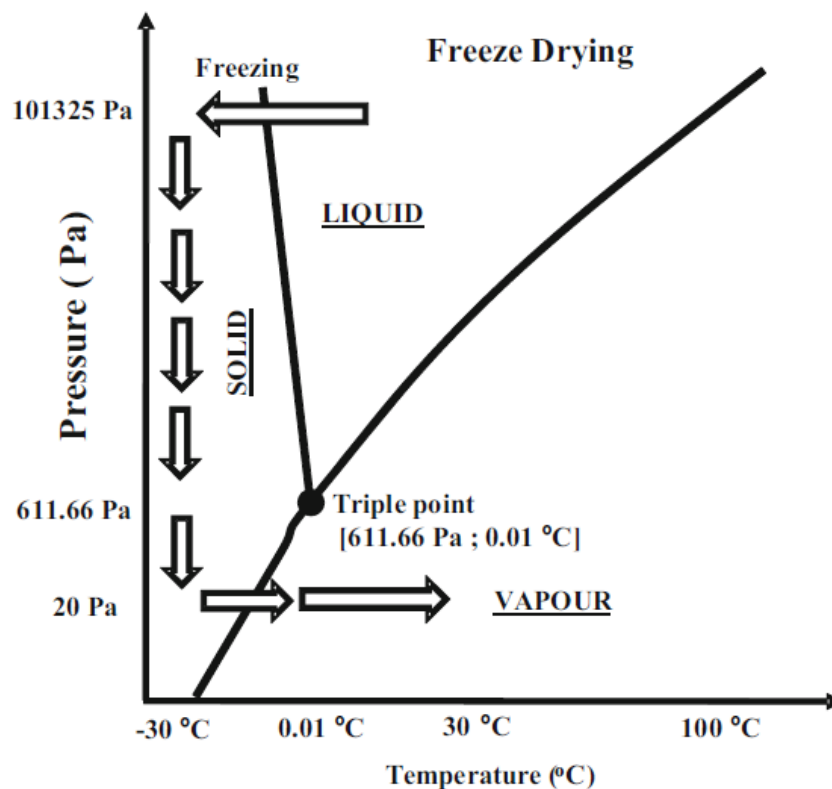


Figure 24: Diagramme Pression-Température du processus de la lyophilisation
(Référence⁸⁶).

La première étape correspond à la *congélation* de la solution, en effet, la baisse rapide de la température permet de cristalliser une grande partie du solvant (l'eau) sous forme de cristaux de glace, pendant qu'une autre partie non congelée demeure liée à la protéine mais également à des co-solvants utilisés principalement dans le but de stabiliser l'état natif. La deuxième étape, appelée *séchage primaire*, intervient dans ce processus afin de sublimer la glace préalablement formée. Il s'agit de l'étape la plus longue et onéreuse du cycle de lyophilisation pendant laquelle la majeure partie de l'eau non liée à la protéine et aux excipients est éliminée par la transformation de la glace en vapeur d'eau. La troisième étape nommée *séchage secondaire* consiste en la désorption de l'eau résiduelle qui n'a pas été congelée lors de la première étape. Ces trois étapes sont sources de stress et donc de dénaturation de la protéine. Des excipients (agents bioprotecteurs) sont ajoutés à la formulation qui ont pour objectif de stabiliser la protéine au cours de la lyophilisation, mais aussi pour

constituer une matrice vitreuse qui va inhiber la dynamique de la protéine et donc la stabiliser durant son stockage à l'état sec.

Pour des applications médicales, les protéines d'intérêt thérapeutique sont aussi sujettes à de nombreux stress dus à la variation de pH et/ou de la température in-vivo et nécessitent une attention particulière pour une administration efficace. Le confinement de ces macromolécules dans les matériaux poreux a été largement étudié à cet effet⁸⁷⁻⁹⁰.

1.2.2 Confinement des protéines

Les matériaux de silice mésoporeux décrits dans le paragraphe 0 ont suscité beaucoup d'attention en tant que hôtes dans lesquelles la protéine est immobilisée. Le but principal de ce confinement est d'une part d'assurer une stabilisation thermique des enzymes^{87,90,91}, et d'autre part de concevoir un système de libération⁹²⁻⁹⁴ en protégeant la protéine de l'environnement physiologique. L'adsorption des protéines sur la surface de silice a été assurée, jusqu'à l'heure d'aujourd'hui, essentiellement par des interactions électrostatiques qui ont lieu entre la matrice mésoporeuse et la protéine. Par conséquent, connaître les points isoélectriques (pI) de la protéine et de la matrice de silice mésoporeuse respectifs pour lesquels ces derniers sont neutres est important, dans la mesure où le choix du pH de la solution va dépendre des charges électrostatiques des deux composants. À titre d'exemple, il a été montré que le maximum du Lysozyme (protéine globulaire) adsorbé sur la surface des SBA-15 a été atteint à un pH égal à 10.5⁹⁵. Ceci peut être expliqué par la charge négative des pores (pI=3.4)⁹⁶ et la charge positive de la protéine (pI=11)⁹⁷ dans ces conditions expérimentales. Ce qui permet ainsi de favoriser les interactions électrostatiques entre les deux composants.

La quantité de protéine confinée est également liée à la taille des pores⁹⁸. Une étude précédente a montré que plus le diamètre des pores est grand, plus la quantité adsorbée est importante comme le montre la Figure 25.

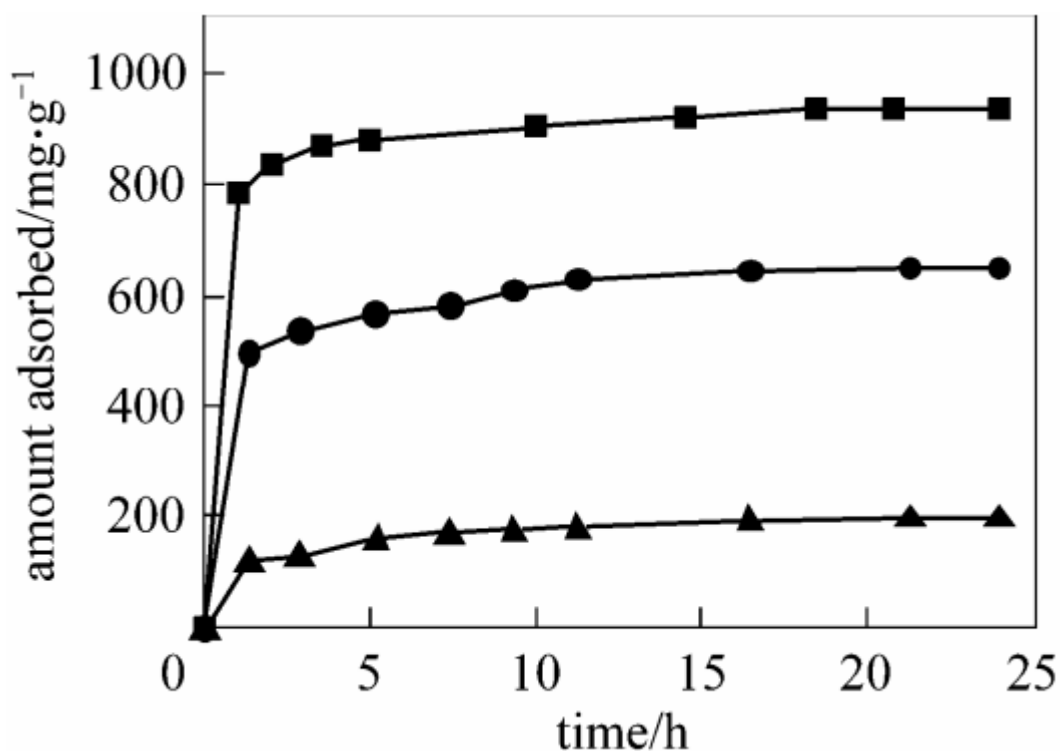


Figure 25: Cinétique d'adsorption du Lysozyme dans les SBA-15 de différentes tailles de pore. ■ 13.2 nm, ● 7.4 nm, ▲ 3.9nm.
(Référence⁹⁸)

Les travaux de cette thèse concernent essentiellement l'analyse de trois systèmes confinés à savoir : l'ibuprofène (principe actif), le L-tryptophane (acide aminé) et le lysozyme(enzyme) dans les matrices de silice mésoporeuses : MCM-41 et/ou SBA-15. Dans le chapitre suivant, les matériaux utilisés, les méthodes mises en œuvre durant cette thèse et les techniques d'analyse employées seront présentés.

Références

1. Pandya PH, Jasra RV, Newalkar BL, Bhatt PN. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;77(1):67-77. doi:10.1016/j.micromeso.2004.08.018
2. Kahse M, Werner M, Zhao S, Hartmann M, Buntkowsky G, Winter R. Stability, Hydration, and Thermodynamic Properties of RNase A Confined in Surface-Functionalized SBA-15 Mesoporous Molecular Sieves. *J Phys Chem C*. 2014;118(37):21523-21531. doi:10.1021/jp506544n
3. Kim MI, Kim J, Lee J, et al. Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007;96(2):210-218. doi:10.1002/bit.21107
4. Lynch MM, Liu J, Nigra M, Coppens MO. Chaperonin-Inspired pH Protection by Mesoporous Silica SBA-15 on Myoglobin and Lysozyme. *Langmuir*. 2016;32(37):9604-9610. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02832
5. Villegas MR, Baeza A, Vallet-Regí M. Nanotechnological Strategies for Protein Delivery. *Molecules*. 2018;23(5):1008. doi:10.3390/molecules23051008
6. Angell CA. Relaxation in liquids, polymers and plastic crystals — strong/fragile patterns and problems. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1991;131-133:13-31. doi:10.1016/0022-3093(91)90266-9
7. Descamps M, Willart J f., Dudognon E, Caron V. Transformation of pharmaceutical compounds upon milling and comilling: The role of Tg. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;96(5):1398-1407. doi:10.1002/jps.20939
8. Latreche M, Willart JF, Guérain M, Hédoux A, Danède F. Using Milling to Explore Physical States: The Amorphous and Polymorphic Forms of Sulindac. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(8):2635-2642. doi:10.1016/j.xphs.2019.03.017
9. Hédoux A, Paccou L, Guinet Y, Willart JF, Descamps M. Using the low-frequency Raman spectroscopy to analyze the crystallization of amorphous indomethacin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;38(2):156-164. doi:10.1016/j.ejps.2009.06.007
10. Willart JF, De Gusseme A, Hemon S, Odou G, Danède F, Descamps M. Direct crystal to glass transformation of trehalose induced by ball milling. *Solid State Communications*. 2001;119(8-9):501-505. doi:10.1016/S0038-1098(01)00283-6
11. Descamps M, Dudognon E. Crystallization from the Amorphous State: Nucleation–Growth Decoupling, Polymorphism Interplay, and the Role of Interfaces. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(9):2615-2628. doi:10.1002/jps.24016
12. Yoreo JJD. 3 Principles of Crystal Nucleation and Growth.

13. Baird JA, Van Eerdenbrugh B, Taylor LS. A Classification System to Assess the Crystallization Tendency of Organic Molecules from Undercooled Melts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(9):3787-3806. doi:10.1002/jps.22197
14. Van Hoogevest P, Liu X, Fahr A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011;8(11):1481-1500. doi:10.1517/17425247.2011.614228
15. Leuner C. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50(1):47-60. doi:10.1016/S0939-6411(00)00076-X
16. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*. 2007;12(23-24):1068-1075. doi:10.1016/j.drudis.2007.09.005
17. Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(7):603-616. doi:10.1016/j.addr.2007.05.010
18. Sarma B, Chen J, Hsi HY, Myerson AS. Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals. *Korean J Chem Eng*. 2011;28(2):315-322. doi:10.1007/s11814-010-0520-0
19. Berry DJ, Steed JW. Pharmaceutical cocrystals, salts and multicomponent systems; intermolecular interactions and property based design. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017;117:3-24. doi:10.1016/j.addr.2017.03.003
20. Tian B, Liu S, Wu S, et al. pH-responsive poly (acrylic acid)-gated mesoporous silica and its application in oral colon targeted drug delivery for doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;154:287-296. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.024
21. Tres F, Treacher K, Booth J, et al. Indomethacin-Kollidon VA64 Extrudates: A Mechanistic Study of pH-Dependent Controlled Release. *Mol Pharmaceutics*. 2016;13(3):1166-1175. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00979
22. Morris RE, Wheatley PS. Gas Storage in Nanoporous Materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008;47(27):4966-4981. doi:10.1002/anie.200703934
23. Liu J, Zou R, Zhao Y. Recent developments in porous materials for H₂ and CH₄ storage. *Tetrahedron Letters*. 2016;57(44):4873-4881. doi:10.1016/j.tetlet.2016.09.085
24. Lin J, Shang Y, Ding B, Yang J, Yu J, Al-Deyab SS. Nanoporous polystyrene fibers for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin*. 2012;64(2):347-352. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.11.002
25. Pourmand S, Abdouss M, Rashidi A. Fabrication of nanoporous graphene by chemical vapor deposition (CVD) and its application in oil spill removal as a recyclable nanosorbent. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015;22:8-18. doi:10.1016/j.jiec.2014.06.018
26. Wang S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009;117(1-2):1-9. doi:10.1016/j.micromeso.2008.07.002

27. Malfait B, Correia NT, Ciotonea C, et al. Manipulating the physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: Impact of the loading degree. *J Chem Phys*. 2020;153(15):154506. doi:10.1063/5.0020992
28. Nazarova EA, Alimova DS, Mikhaylov VI, Krivoschapkina EF, Krivoschapkin PV. Macroporous ceramic filters from mineral raw materials for machine oils filtration. *Ceramics International*. 2019;45(7):8767-8773. doi:10.1016/j.ceramint.2019.01.201
29. Čejka J. Organized mesoporous alumina: synthesis, structure and potential in catalysis. *Applied Catalysis A: General*. 2003;254(2):327-338. doi:10.1016/S0926-860X(03)00478-2
30. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992;359(6397):710-712. doi:10.1038/359710a0
31. Jana SK, Mochizuki A, Namba S. Progress in Pore-Size Control of Mesoporous MCM-41 Molecular Sieve Using Surfactant Having Different Alkyl Chain Lengths and Various Organic Auxiliary Chemicals. *Catalysis Surveys from Asia*. 2004;8(1):1-13. doi:10.1023/B:CATS.0000015110.85694.d9
32. Vartuli JC, Schmitt KD, Kresge CT, et al. Effect of Surfactant/Silica Molar Ratios on the Formation of Mesoporous Molecular Sieves: Inorganic Mimicry of Surfactant Liquid-Crystal Phases and Mechanistic Implications. *Chem Mater*. 1994;6(12):2317-2326. doi:10.1021/cm00048a018
33. Zhao D, Sun J, Li Q, Stucky GD. Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15. *Chem Mater*. 2000;12(2):275-279. doi:10.1021/cm9911363
34. Zhao D, Feng J, Huo Q, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science*. 1998;279(5350):548-552.
35. Zholobenko VL, Khodakov AY, Impéror-Clerc M, Durand D, Grillo I. Initial stages of SBA-15 synthesis: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2008;142(1-2):67-74. doi:10.1016/j.cis.2008.05.003
36. Chaudhary V, Sharma S. An overview of ordered mesoporous material SBA-15: synthesis, functionalization and application in oxidation reactions. *J Porous Mater*. 2017;24(3):741-749. doi:10.1007/s10934-016-0311-z
37. Impéror-Clerc M, Davidson P, Davidson A. Existence of a Microporous Corona around the Mesopores of Silica-Based SBA-15 Materials Templated by Triblock Copolymers. *J Am Chem Soc*. 2000;122(48):11925-11933. doi:10.1021/ja002245h
38. Ravikovitch PI, Neimark AV. Characterization of Micro- and Mesoporosity in SBA-15 Materials from Adsorption Data by the NLDFT Method. *J Phys Chem B*. 2001;105(29):6817-6823. doi:10.1021/jp010621u
39. Galarneau A, Cambon H, Di Renzo F, Fajula F. True Microporosity and Surface Area of Mesoporous SBA-15 Silicas as a Function of Synthesis Temperature. *Langmuir*. 2001;17(26):8328-8335. doi:10.1021/la0105477

40. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *J Am Chem Soc.* 1998;120(24):6024-6036. doi:10.1021/ja974025i
41. Chen CY, Li HX, Davis ME. Studies on mesoporous materials. *Microporous Materials.* 1993;2(1):17-26. doi:10.1016/0927-6513(93)80058-3
42. Trzeciak K, Chotera-Ouda A, Bak-Sypien II, Potrzebowski MJ. Mesoporous Silica Particles as Drug Delivery Systems—The State of the Art in Loading Methods and the Recent Progress in Analytical Techniques for Monitoring These Processes. *Pharmaceutics.* 2021;13(7):950. doi:10.3390/pharmaceutics13070950
43. Mellaerts R, Jammaer JAG, Van Speybroeck M, et al. Physical State of Poorly Water Soluble Therapeutic Molecules Loaded into SBA-15 Ordered Mesoporous Silica Carriers: A Case Study with Itraconazole and Ibuprofen. *Langmuir.* 2008;24(16):8651-8659. doi:10.1021/la801161g
44. Izquierdo-Barba I, Sousa E, Doadrio JC, et al. Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2009;50(3):421-429. doi:10.1007/s10971-009-1932-3
45. Shen SC, Ng WK, Hu J, Letchmanan K, Ng J, Tan RBH. Solvent-free direct formulation of poorly-soluble drugs to amorphous solid dispersion via melt-absorption. *Advanced Powder Technology.* 2017;28(5):1316-1324. doi:10.1016/j.appt.2017.02.020
46. Shen S, Ng WK, Chia L, Dong Y, Tan RBH. Stabilized Amorphous State of Ibuprofen by Co-Spray Drying With Mesoporous SBA-15 to Enhance Dissolution Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010;99(4):1997-2007. doi:10.1002/jps.21967
47. Malfait B, Correia NT, Mussi A, Paccou L, Guinet Y, Hédoux A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials.* 2019;277:203-207. doi:10.1016/j.micromeso.2018.10.022
48. Charnay C, Bégu S, Tourné-Péteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoisselle JM. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2004;57(3):533-540. doi:10.1016/j.ejpb.2003.12.007
49. Shen SC, Ng WK, Chia L, Hu J, Tan RBH. Physical state and dissolution of ibuprofen formulated by co-spray drying with mesoporous silica: Effect of pore and particle size. *International Journal of Pharmaceutics.* 2011;410(1-2):188-195. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.018
50. Li DX, Oh YK, Lim SJ, et al. Novel gelatin microcapsule with bioavailability enhancement of ibuprofen using spray-drying technique. *International Journal of Pharmaceutics.* 2008;355(1-2):277-284. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.12.020
51. Ruffel L, Soulié J, Coppel Y, et al. Ibuprofen loading into mesoporous silica nanoparticles using Co-Spray drying: A multi-scale study. *Microporous and*

- Mesoporous Materials.* 2020;291:109689. doi:10.1016/j.micromeso.2019.109689
52. Malfait B, Paccou L, Correia NT, Guinet Y, Hedoux A. Identification of an amorphous-amorphous two-step transformation in indomethacin embedded within mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials.* 2021;328:111502. doi:10.1016/j.micromeso.2021.111502
 53. Zarinwall A, Maurer V, Pierick J, et al. Amorphization and modified release of ibuprofen by post-synthetic and solvent-free loading into tailored silica aerogels. *Drug Delivery.* 2022;29(1):2086-2099. doi:10.1080/10717544.2022.2092237
 54. Guinet Y, Paccou L, Danède F, Hédoux A. Confinement of molecular materials using a solid-state loading method: a route for exploring new physical states and their subsequent transformation highlighted by caffeine confined to SBA-15 pores. *RSC Adv.* 2021;11(55):34564-34571. doi:10.1039/D1RA05757J
 55. Johari GP, Kim S, Shanker RM. Dielectric Relaxation and Crystallization of Ultraviscous Melt and Glassy States of Aspirin, Ibuprofen, Progesterone, and Quinidine. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2007;96(5):1159-1175. doi:10.1002/jps.20921
 56. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques.* These de doctorat. Université de Lille (2018-2021); 2019. Accessed September 18, 2023. <https://theses.fr/2019LILUR051>
 57. Bremmell KE, Prestidge CA. Enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs with mesoporous silica based systems: opportunities and challenges. *Drug Development & Industrial Pharmacy.* 2019;45(3):349-358. doi:10.1080/03639045.2018.1542709
 58. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2001;13(2):123-133. doi:10.1016/S0928-0987(01)00095-1
 59. Hwang DH, Lee D, Lee H, Choe D, Lee SH, Lee K. Surface functionalization of SBA-15 particles for ibuprofen delivery. *Korean J Chem Eng.* 2010;27(4):1087-1092. doi:10.1007/s11814-010-0225-4
 60. Song SW, Hidajat K, Kawi S. Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix–Drug Interactions. *Langmuir.* 2005;21(21):9568-9575. doi:10.1021/la051167e
 61. Szegedi A, Popova M, Goshev I, Mihály J. Effect of amine functionalization of spherical MCM-41 and SBA-15 on controlled drug release. *Journal of Solid State Chemistry.* 2011;184(5):1201-1207. doi:10.1016/j.jssc.2011.03.005
 62. Szewczyk A, Prokopowicz M, Sawicki W, Majda D, Walker G. Aminopropyl-functionalized mesoporous silica SBA-15 as drug carrier for cefazolin: adsorption profiles, release studies, and mineralization potential.

- Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;274:113-126. doi:10.1016/j.micromeso.2018.07.046
63. Barczak M. Functionalization of mesoporous silica surface with carboxylic groups by Meldrum's acid and its application for sorption of proteins. *J Porous Mater*. 2019;26(1):291-300. doi:10.1007/s10934-018-0655-7
 64. Tsai CH, Chang WC, Saikia D, Wu CE, Kao HM. Functionalization of cubic mesoporous silica SBA-16 with carboxylic acid via one-pot synthesis route for effective removal of cationic dyes. *Journal of Hazardous Materials*. 2016;309:236-248. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.08.051
 65. Manzano M, Aina V, Areán CO, et al. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization. *Chemical Engineering Journal*. 2008;137(1):30-37. doi:10.1016/j.cej.2007.07.078
 66. Ahmadi E, Dehghannejad N, Hashemikia S, Ghasemnejad M, Tabebordbar H. Synthesis and surface modification of mesoporous silica nanoparticles and its application as carriers for sustained drug delivery. *Drug Delivery*. 2014;21(3):164-172. doi:10.3109/10717544.2013.838715
 67. Whitford D. *Proteins: Structure and Function*. John Wiley & Sons; 2013.
 68. Starciuc T. *Apport de La Spectroscopie Raman à l'étude Des Mécanismes de Stabilisation Des Protéines Par Les Disaccharides et Cyclodextrines*. These de doctorat. Lille 1; 2017. Accessed June 14, 2023. <https://www.theses.fr/2017LIL10179>
 69. Elkordy AA, Forbes RT, Barry BW. Study of protein conformational stability and integrity using calorimetry and FT-Raman spectroscopy correlated with enzymatic activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;33(2):177-190. doi:10.1016/j.ejps.2007.11.002
 70. Bryngelson JD, Onuchic JN, Socci ND, Wolynes PG. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1995;21(3):167-195. doi:10.1002/prot.340210302
 71. Wolynes PG, Onuchic JN, Thirumalai D. Navigating the Folding Routes. *Science*. 1995;267(5204):1619-1620.
 72. Schultz CP. Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Mol Biol*. 2000;7(1):7-10. doi:10.1038/71197
 73. Lins L, Brasseur R. The hydrophobic effect in protein folding. *The FASEB Journal*. 1995;9(7):535-540. doi:10.1096/fasebj.9.7.7737462
 74. Janin J. Ångströms and calories. *Structure*. 1997;5(4):473-479. doi:10.1016/S0969-2126(97)00204-9
 75. Hédoux A, Ionov R, Willart JF, et al. Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation. *The Journal of Chemical Physics*. 2006;124(1):014703. doi:10.1063/1.2139087
 76. Balny C, Masson P. Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*. 1993;9(4):611-628. doi:10.1080/87559129309540980

77. Hédoux A, Guinet Y, Paccou L. Analysis of the Mechanism of Lysozyme Pressure Denaturation from Raman Spectroscopy Investigations, and Comparison with Thermal Denaturation. *J Phys Chem B*. 2011;115(20):6740-6748. doi:10.1021/jp2014836
78. Nikolaidis A, Andreadis M, Moschakis T. Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra. *Food Chemistry*. 2017;232:425-433. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.022
79. Camilloni C, Guerini Rocco A, Eberini I, Gianazza E, Broglia RA, Tiana G. Urea and Guanidinium Chloride Denature Protein L in Different Ways in Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal*. 2008;94(12):4654-4661. doi:10.1529/biophysj.107.125799
80. Timasheff SN, Xie G. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. *Biophysical Chemistry*. 2003;105(2-3):421-448. doi:10.1016/S0301-4622(03)00106-6
81. Hédoux A, Seo JA, Guinet Y, Paccou L. Analysis of cold denaturation mechanism of β -lactoglobulin and comparison with thermal denaturation from Raman spectroscopy investigations. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2012;43(1):16-23. doi:10.1002/jrs.3009
82. Wong KB, Freund SMV, Fersht AR. Cold Denaturation of Barstar:1H,15N and13C NMR Assignment and Characterisation of Residual Structure. *Journal of Molecular Biology*. 1996;259(4):805-818. doi:10.1006/jmbi.1996.0359
83. Zhou JM, Zhu L, Balny C, Perrett S. Pressure Denaturation of the Yeast Prion Protein Ure2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;287(1):147-152. doi:10.1006/bbrc.2001.5556
84. Kunugi S, Tanaka N. Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002;1595(1-2):329-344. doi:10.1016/S0167-4838(01)00354-5
85. Hedoux A. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. *Médicaments et produits pharmaceutiques*. Published online September 2013. doi:10.51257/a-v1-pha2026
86. G. S, Balakrishnan R. An experimental study of drying behavior in ice patterns formed during spin freezing and its influence on the freeze-drying process. *Heat and Mass Transfer*. 2019;55. doi:10.1007/s00231-019-02596-z
87. Kao KC, Lin TS, Mou CY. Enhanced Activity and Stability of Lysozyme by Immobilization in the Matching Nanochannels of Mesoporous Silica Nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2014;118(13):6734-6743. doi:10.1021/jp4112684
88. Caetano DLZ, Metzler R, Cherstvy AG, de Carvalho SJ. Adsorption of Lysozyme Into a Charged Confining Pore.
89. Huang S, Chen G, Ouyang G. Confining enzymes in porous organic frameworks: from synthetic strategy and characterization to healthcare

- applications. *Chem Soc Rev.* 2022;51(15):6824-6863. doi:10.1039/D1CS01011E
90. Siefker J, Biehl R, Kruteva M, Feoktystov A, Coppens MO. Confinement Facilitated Protein Stabilization As Investigated by Small-Angle Neutron Scattering. *J Am Chem Soc.* 2018;140(40):12720-12723. doi:10.1021/jacs.8b08454
 91. Eggers DK, Valentine JS. Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. *Protein Science.* 2001;10(2):250-261. doi:10.1110/ps.36201
 92. Bhattacharyya MS, Hiwale P, Piras M, et al. Lysozyme Adsorption and Release from Ordered Mesoporous Materials. *J Phys Chem C.* 2010;114(47):19928-19934. doi:10.1021/jp1078218
 93. Tu J, Boyle AL, Friedrich H, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles with Large Pores for the Encapsulation and Release of Proteins. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(47):32211-32219. doi:10.1021/acsami.6b11324
 94. Nairi V, Medda L, Monduzzi M, Salis A. Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2017;497:217-225. doi:10.1016/j.jcis.2017.03.021
 95. Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *J Phys Chem B.* 2004;108(22):7323-7330. doi:10.1021/jp037303a
 96. Essa H, Magner E, Cooney J, Hodnett BK. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2007;49(1-4):61-68. doi:10.1016/j.molcatb.2007.07.005
 97. Tomita S, Yoshikawa H, Shiraki K. Arginine controls heat-induced cluster-cluster aggregation of lysozyme at around the isoelectric point. *Biopolymers.* 2011;95(10):695-701. doi:10.1002/bip.21637
 98. DIAO X, WANG Y, ZHAO J, ZHU S. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. *Chinese journal of chemical engineering.* 2010;18(3):493-499. doi:10.1016/S1004-9541(10)60248-0

Chapitre II : Matériaux et méthodes

Ce deuxième chapitre sera consacré à la description, des matériaux et des matrices de silice mésoporeuses utilisées, de la méthode de chargement à l'état solide et des techniques d'analyse utilisées dans le cadre de ce travail.

II.1 Matériaux

Les matériaux qui ont été utilisés dans le cadre de cette thèse sont l'ibuprofène, le L-tryptophane, le lysozyme, les SBA-15 et les MCM-41.

II.1.1 Ibuprofène

L'acide 2-(4-(2-méthylpropyl)phényl)propanoïque, dont la formule brute est $C_{13}H_{18}O_2$, communément appelé *ibuprofène*, fait partie des principes actifs anti-inflammatoires non stéroïdiens, souvent abrégés en *AINS* qui possèdent des propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. La molécule d'ibuprofène, dont les dimensions sont $1\text{ nm} \times 0.6\text{ nm} \times 0.8\text{ nm}^{1,2}$ présentée sur Figure 26, est chirale car elle possède un carbone asymétrique. Cette chiralité lui permet d'exister sous deux formes énantiomères: S(+)-ibuprofène (la forme pharmacologiquement active) et R(-)-ibuprofène. L'ibuprofène RS est composée d'une population égale de formes R et S. À température ambiante, ce composé existe sous la forme d'une poudre cristalline blanche. Cette phase cristalline notée forme I est stable jusqu'à la température de fusion $T_{m,I} = 76\text{ °C}^3$, sa maille est monoclinique, de symétrie $P2_1/c^{4,5}$. Une autre phase cristalline notée forme II a été détectée lors de la chauffe du liquide trempée⁶. Sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X⁷. La maille a été déterminée monoclinique de même symétrie que la forme I, dans laquelle les molécules sont organisées en dimères différents par rapport à ceux de la forme I. Cependant l'analyse structurale à partir de données de diffraction X sur poudre n'a pas pris en compte l'état désordonné des dimères uniquement révélé par

spectroscopie Raman à basse-fréquence. Les critères d'observation et de stabilité de cette phase sont fortement dépendants du traitement thermique de l'échantillon. La forme II est généralement observée après trempe profonde à partir de l'état liquide. Lors d'une procédure de chauffage, elle est détectée au voisinage de 0°C (domaine de nucléation de la forme I) et fond au voisinage de la température ambiante. Elle peut aussi être préparée par cinétique isotherme au voisinage de 0°C et apparaît comme un palier dans la cinétique isotherme de la forme I. Dans ce cas il n'y a pas de fusion de la forme II. Celle-ci apparaît donc comme un état transitoire partiellement cristallisée dans la cinétique de cristallisation de la forme I. Cette forme II de l'ibuprofène est métastable et relativement désordonnée⁸ par rapport à la forme I et possède un point de fusion $T_{m,II} = 17\text{ °C}$ ⁶.

La température de transition vitreuse T_g de l'ibuprofène est environ à -50°C⁶

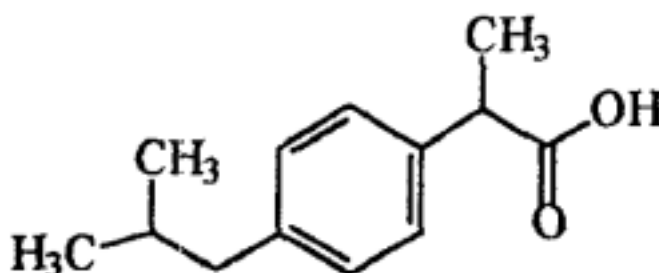


Figure 26: Molécule d'ibuprofène

II.1.2 L-Tryptophane

Le L-Tryptophane ($C_{11}H_{12}N_2O_2$), présenté sur la Figure 27 et souvent noté L-Trp, est l'acide aminé qui peut être considéré comme principal composant de l'édifice biomoléculaire du lysozyme. Il se présente à la température ambiante sous forme d'une phase cristalline dont la structure a été résolue et est triclinique, groupe spatial $P1$ ⁹. Cette phase cristalline possède un point de fusion T_m à environ 297 °C¹⁰. La température de transition vitreuse du L-Tryptophane est de l'ordre de 140 °C¹¹. Trois formes polymorphiques du L-tryptophane ont été reportées dans la littérature notées α ⁹, α' ¹² et β ¹². Cet acide aminé possède

plusieurs effets thérapeutiques notamment le soin de la dépression, les troubles de comportement, les troubles de sommeil et l'anxiété¹³⁻¹⁵

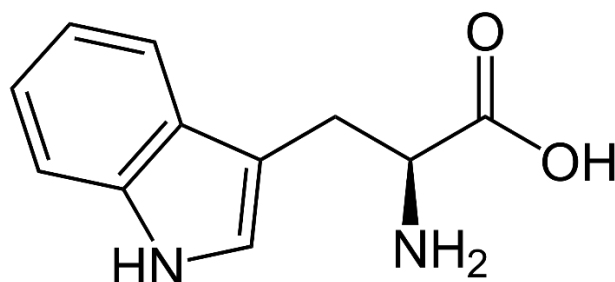


Figure 27: Molécule du L-Tryptophane

II.1.3 Lysozyme

Le Lysozyme est une enzyme que l'on peut trouver couramment à la fois dans le domaine alimentaire et dans le domaine pharmaceutique compte tenu de ses propriétés antibactériennes. La molécule de Lysozyme forme une ellipsoïde¹⁶⁻¹⁸ de dimensions sont 4.5 nm × 3.0 nm × 3.0 nm^{19,20}. Les dimensions de cette biomolécule permettent l'encapsulation de celle-ci dans une large gamme de structure poreuse^{16,17,21,22}. La structure primaire (Chapitre 1) du lysozyme est composée à partir de 129 acides aminés^{19,23} où des ponts disulfure sont formés entre les acides aminés cystéine offrant une grande stabilité thermique à cette enzyme¹⁹.

II.1.4 Matrices de silice mésoporeuses

II.1.4.1 MCM-41

Les matrices de silice mésoporeuses : MCM-41 sont composées des canaux cylindriques organisés dans un réseau hexagonal. Une analyse des isothermes d'adsorption et désorption a montré que la taille moyenne des pores est égale à 3.6 nm, le volume poreux V_p est de l'ordre de 1.18 cm³/g. Ces deux paramètres ont été déterminés par la méthode de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) appliquée à la branche de désorption. La surface spécifique S_{BET} a été calculée

à partir du modèle Brunauer, Emmett et Teller (méthode BET) et a été estimée à environ 1033 m²/g.

II.1.4.2 SBA-15

Les matrices de silice mésoporeuses : SBA-15 sont constituées des canaux cylindriques organisés dans un réseau hexagonal et interconnectés entre eux par des micropores. Ces interconnexions constituent une caractéristique propre à l'architecture des SBA-15, et n'existent pas dans les MCM-41. Une étude en physisorption a permis de calculer le volume poreux des micropores $V_{\text{microporeux}} = 0.12 \text{ cm}^3/\text{g}$. La taille moyenne des pores a été estimée à 7 nm et le volume poreux V_{poreux} à 0.73 cm³/g.

II.2 Techniques d'analyse

II.2.1 Spectroscopie Raman

II.2.1.1 Description de la technique

La spectroscopie Raman est une méthode d'analyse non-destructive d'observation et de caractérisation de la matière qui a largement été utilisée dans de nombreux domaines scientifiques et industriels dans le but de caractériser d'une manière instantanée des matériaux ou alors d'identifier des composants et des impuretés dans des mélanges. Cette technique d'analyse tire son nom du physicien Chandrashekhara Venkata Raman qui a observé en 1928 un phénomène appelé *l'effet Raman*. En effet, ce physicien a remarqué que lorsqu'un matériau est traversé par une lumière monochromatique, une partie infime de la lumière est diffusée de manière inélastique par rapport à la contribution principale diffusée élastiquement appelée *diffusion Rayleigh*. Ce glissement de fréquence directement relié aux potentiels d'interaction atome-atome aussi bien au sein d'une molécule qu'entre deux molécules proches voisines. De ce fait la spectroscopie Raman permet de sonder aussi bien la

structure moléculaire que la structure cristalline et bien sûr l'organisation moléculaire de l'état amorphe.

On distingue deux cas de figure :

- La longueur d'onde du rayonnement diffusé est supérieure à la longueur d'onde incidente, c'est la diffusion Stokes.

- La longueur d'onde du rayonnement diffusé est inférieure à la longueur d'onde incidente, c'est la diffusion anti-stokes.

La figure 3 montre d'abord la différence majeure entre la spectroscopie infrarouge correspondant à un phénomène d'absorption et la spectroscopie Raman correspondant à un phénomène de diffusion de la lumière. Elle montre également les difficultés technologiques pour obtenir un signal Raman dans la mesure où son intensité est environ un million de fois plus faible que celui diffusé élastiquement. Au cours des 30 dernières années, l'essor technologique a permis la miniaturisation des sources laser, le développement de détecteurs ultra sensibles et la conception de filtres qui sont à la base du développement de la spectroscopie Raman dans beaucoup de domaines industriels, où seule la spectroscopie infrarouge était utilisée. La figure 3 montre aussi que la diffusion Stokes est plus intense que la diffusion anti-Stokes, dans la mesure où la transition d'un niveau à un autre plus élevé via un état virtuel est un phénomène de probabilité plus importante que le phénomène inverse. C'est la raison pour laquelle la diffusion Stokes est généralement privilégiée.

L'intensité Stokes a pour expression :

$$I_{Raman}(\nu_0 - \nu_k) \propto NI_0[n(\nu) + 1](\nu_0 - \nu_k)^4 \left[\vec{e}_f \frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial q_k} \vec{e}_j \right]^2$$

Où N représente le nombre de molécules, $[n(\nu) + 1]$ le facteur de Bose Einstein, $\bar{\alpha}$ le tenseur de polarisation correspondant à la vibration (q_k, ν_k) et $\vec{e}_f, \vec{e}_j$ les vecteurs unitaires définissant les orientations du champ électrique incident et diffusé. Cette expression (11) de l'intensité Raman montre qu'elle dépend de manière significative, à la fois du domaine spectral mais aussi de la longueur d'onde de la source laser.

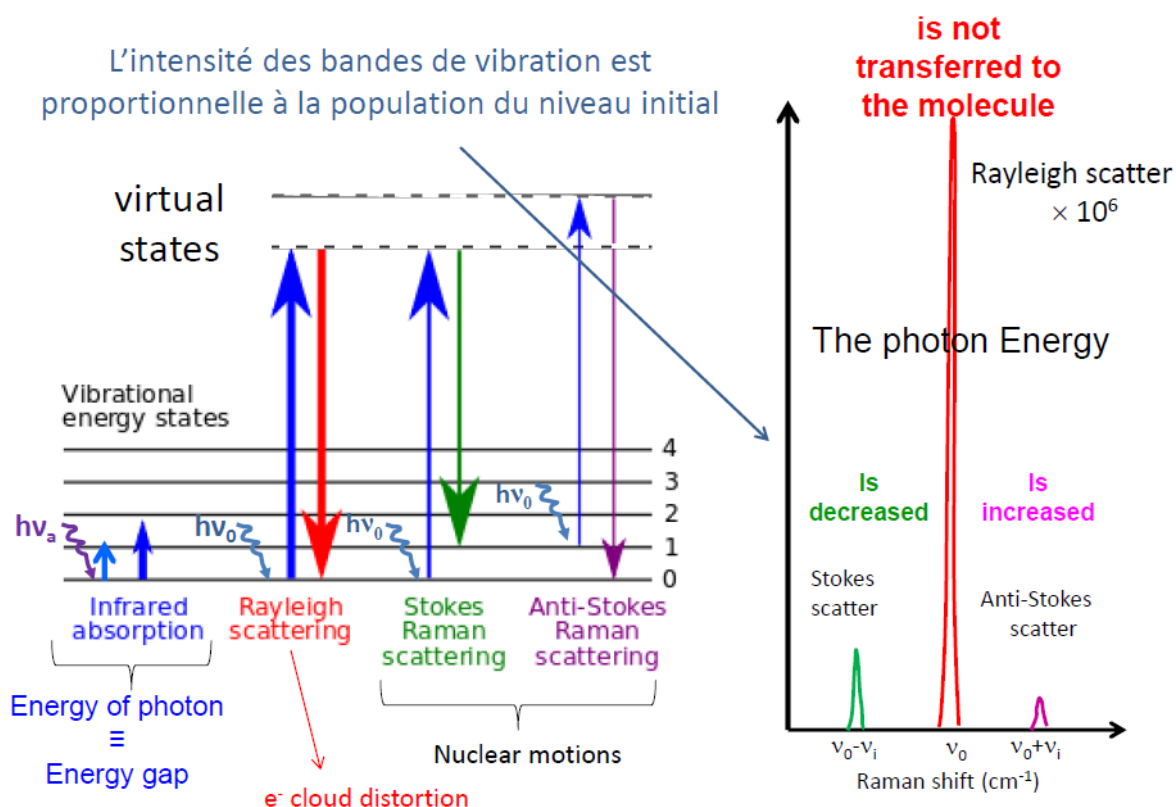


Figure 28: Description de la diffusion Stokes et anti-Stokes, la diffusion Rayleigh et de l'adsorption infrarouge. Le spectre montre que la diffusion Stokes est plus intense que la diffusion anti-Stokes

II.2.1.2 Les spectromètres Raman

Les spectromètres Raman utilisés dans le cadre de ce travail sont les modèles InVia de Renishaw, et XY de Dilor. Ce sont deux spectromètres de type dispersif, permettant des analyses à température, pression (basse et haute) et humidité variables. Le désavantage de ce type d'appareils est la

difficulté de contourner les phénomènes de fluorescence, même équipés de plusieurs sources laser.

Le modèle Invia de Renishaw, présenté sur la Figure 29 est équipé de deux sources de lumière incidente de longueur d'onde 514.5 nm et 785 nm associées respectivement à un réseau de 1800 et 1200 traits/mm, ceux-ci assurent une résolution d'environ 4 cm^{-1} . La distance focale du spectromètre est de 250 mm et la longueur d'onde utilisée dans nos analyses est de 785 nm.

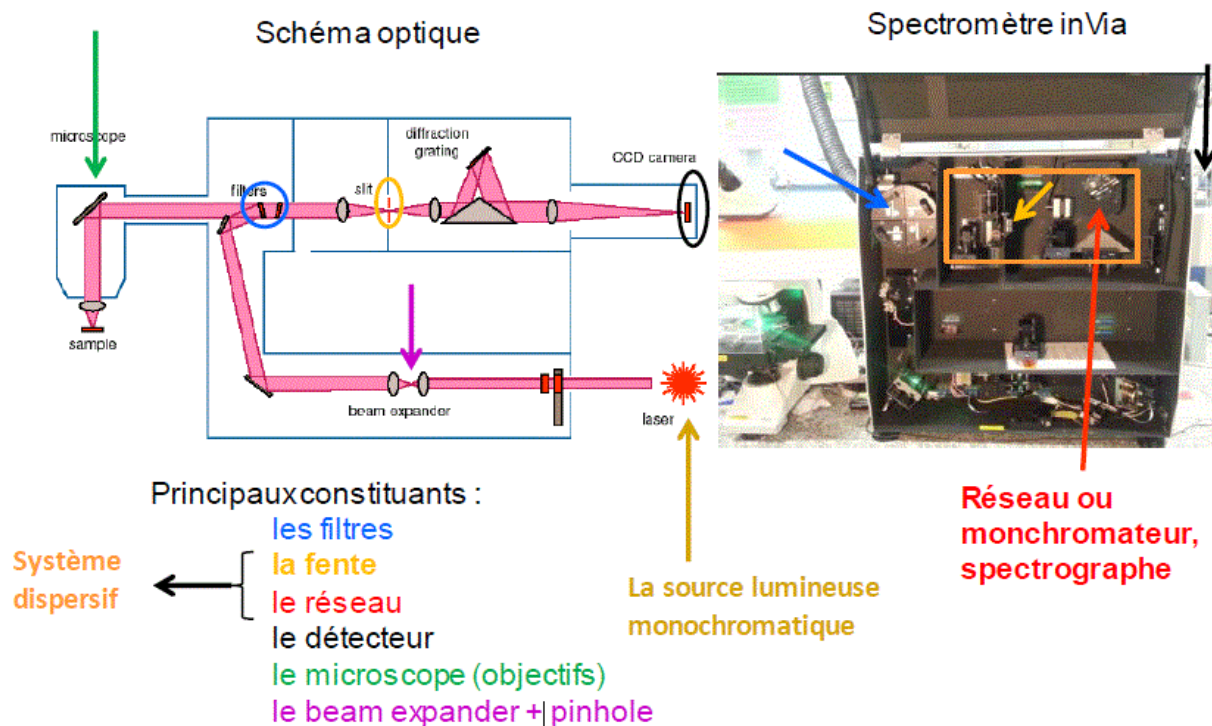


Figure 29: Représentation schématisée des éléments d'un spectromètre à gauche et le spectroscopomètre Invia de Renishaw à droite.

Le spectromètre associé à un microscope Leica est équipé de différents objectifs de grossissement et distances focales différentes. Le choix de l'objectif ainsi que de la longueur d'onde conditionnent le domaine spatial analysé. En effet, la taille du spot est définie par la formule $L = \frac{1.22 \times \lambda}{ON}$. ON étant l'ouverture numérique comme décrit sur la Figure 30. Il est important de préciser que la pénétration de la lumière H, et donc le volume d'intégration dépend fortement de la transparence de l'échantillon pour la longueur d'onde de la source laser

utilisée. De ce fait, l'expression de H n'est généralement pas très réaliste. Cette figure montre que le volume de l'échantillon analysé dépend à la fois de l'objectif utilisé et de la longueur d'onde. L'objectif utilisé durant cette thèse est un objectif Leica x50 (taille de spot est d'environ $2\ \mu\text{m}$, sa distance de travail est d'environ $8.1\ \text{mm}$ et l'ouverture numérique est de 0.5)

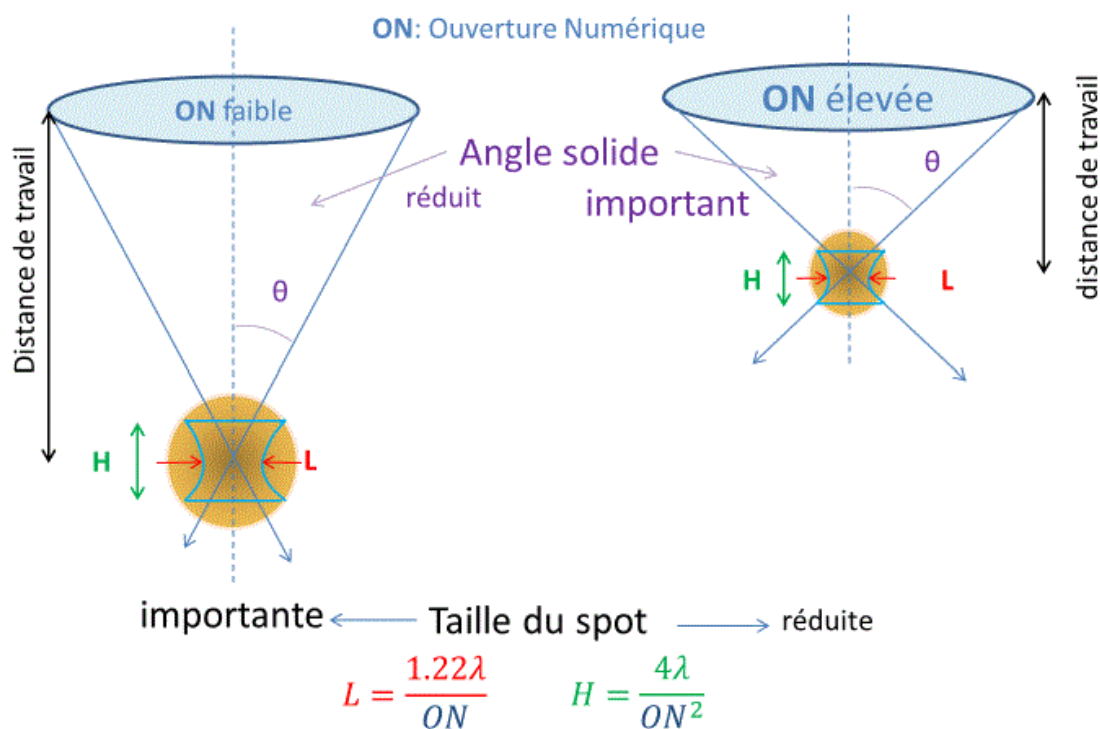


Figure 30: Description des ouvertures numériques associées à des distances de travail différentes et leurs impacts sur le volume d'échantillon analysé.

Parmi les éléments constitutifs du spectromètre, on trouve un filtre edge dont le rôle est de filtrer la lumière diffusée élastiquement par l'échantillon afin d'éviter d'éblouir et détériorer le détecteur. Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été effectuées à l'aide de l'objectif Leica, de grossissement x50 et d'ouverture numérique 0.5 . Cette configuration permet d'analyser un volume d'environ $150\ \mu\text{m}^3$. Le spectromètre est doté d'un détecteur à transfert de charges CCD (Charge Coupled Device) refroidi par effet pelletier et l'acquisition des spectres est réalisée au moyen du logiciel Wire (version 5.4).

Le spectromètre XY Dilor, représenté sur la Figure 31 est un spectromètre très dispersif en raison des trois monochromateurs (3 réseaux de 1800 traits/mm) qu'il possède. La configuration du système dispersif (réseaux, fentes, détecteur) permet d'obtenir une distance focale importante de 800 mm. Cette caractéristique est importante, car elle permet la réjection de la lumière diffusée élastiquement en jouant sur les positions relatives des réseaux sans utiliser de filtres. Il est donc possible de collecter un signal Raman très proche de l'excitatrice, ce qui permet d'obtenir des informations importantes sur la dynamique des systèmes étudiés. Les investigations menées dans le cadre de la thèse ont été réalisées avec une source laser émettant à 660 nm. Le réglage des fentes et des positions des réseaux ont permis la réjection de la lumière jusqu'à environ 5 cm^{-1} , et d'avoir une résolution spectrale de 1 cm^{-1} entre 5 et 200 cm^{-1} . En contrepartie de l'accès au domaine très basses fréquences, la forte dispersion de la lumière engendre une luminosité bien plus réduite que le spectromètre Renishaw InVia. De ce fait ce spectromètre est utilisé principalement pour les études du domaine basse fréquence. Le logiciel qui assure l'acquisition et la sauvegarde des spectres est LABSPEC. Il est possible d'effectuer des études en température entre -150 et 200 °C à l'aide d'une chambre Oxford à flux d'azote gazeux régulé en température de manière très stable ($\pm 0.1^\circ$).

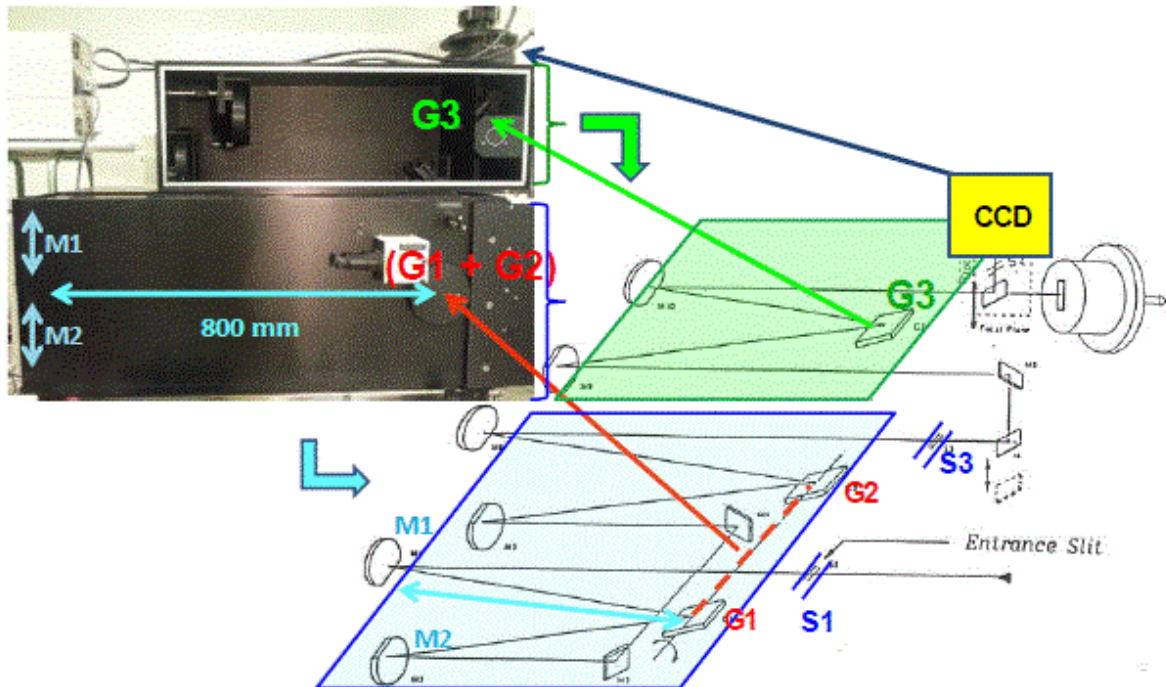
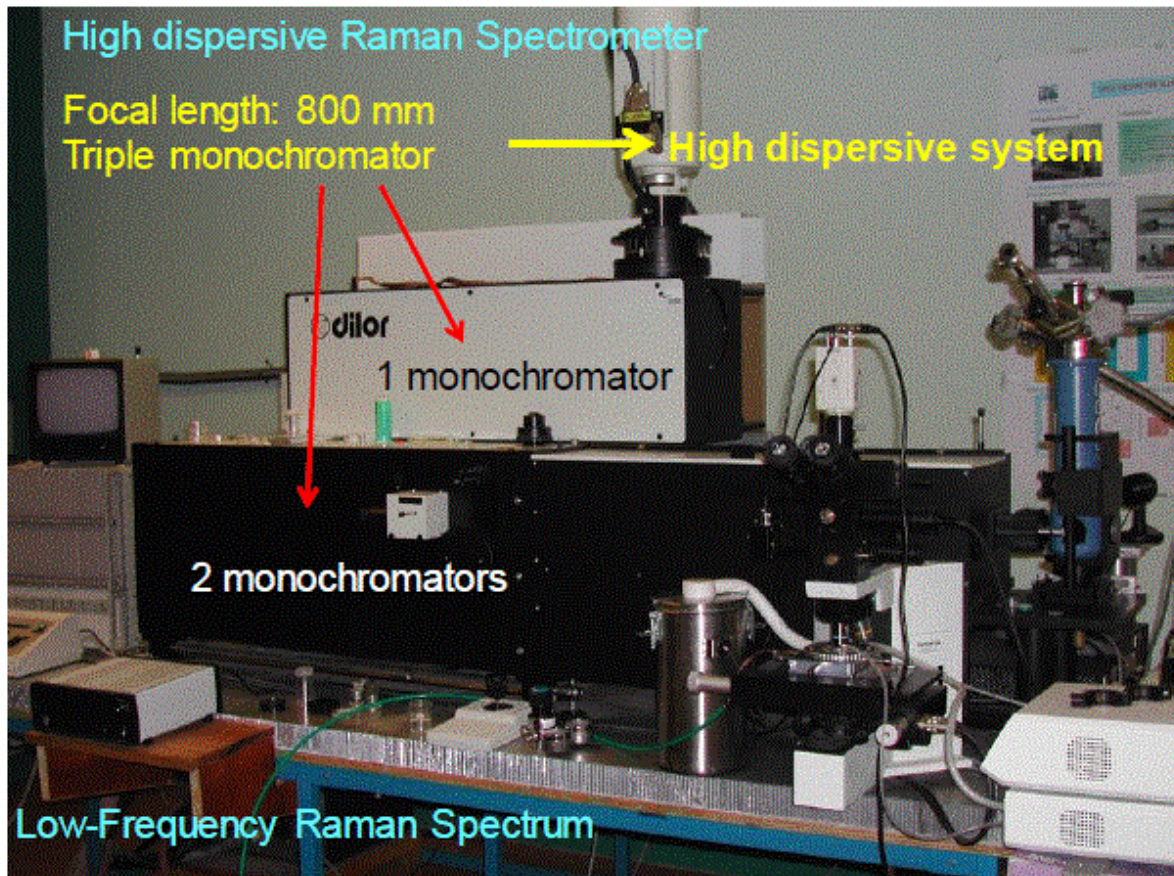


Figure 31: Photo du spectromètre XY Dilor (en haut). Schématisation (en bas) des Miroirs (M1 et M2) des réseaux (G1, G2 et G3), des fentes (S1 et S3) et du détecteur CCD.

Les expériences effectuées aux basses fréquences sur ce spectromètre ont été réalisées dans une configuration macroscopique afin d'analyser un volume d'échantillon de l'ordre du cm^3 .

II.2.2 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry) est une technique d'analyse thermique largement utilisée dans le domaine pharmaceutique. Cette méthode se base sur la mesure de la différence du flux de chaleur entre un échantillon et une référence. Cela permet d'observer les changements thermodynamiques liés aux propriétés physiques de l'échantillon en temps réel au cours de divers traitements thermiques (chauffe, refroidissement, isotherme, ...).

Dans cette étude, un appareil DSC Q200 de chez TA Instruments équipé d'un système de refroidissement (RCS : Refrigerated Cooling System 90) permettant de contrôler la température dans une plage allant de -90 à 550°C a été utilisé. Cet appareil fonctionne selon le principe de l'analyse différentielle, où l'échantillon et la référence sont soumis aux mêmes conditions. Le dispositif est composé d'un four thermostaté traversé par un gaz neutre, l'azote sec, avec une température contrôlée de manière programmée. Deux plateformes à l'intérieur du four accueillent respectivement les capsules de référence et les échantillons à analyser. Pour les expériences présentées dans ce manuscrit, les balayages de température (chauffage et refroidissement) ont été réalisés à une vitesse de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, sous atmosphère contrôlée avec un flux continu d'azote sec ($50\text{ml}/\text{min}$) pendant toute la durée des mesures. Les échantillons ont été placés dans des creusets en aluminium hermétiques. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Universal Analysis de TA Instruments.

II.2.3 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) permet la mesure des changements de masse d'un échantillon en fonction de la température et du temps, dans une atmosphère contrôlée. Elle est généralement utilisée pour étudier la stabilité

thermique et la dégradation des matériaux. Deux analyseurs thermogravimétriques ont été utilisés : Le premier est un analyseur Mettler Toledo TGA/DSC 3+. Les échantillons ont été chauffés de la température ambiante à 1000 °C avec une vitesse de 5 °C/min sous atmosphère contrôlée avec un flux continu d'air (80 ml/min) et le deuxième est un TA Instruments Thermogravimetric Analyzer Q500. La vitesse de chauffage a également été de 5 °C/min sous un flux d'azote à 60 ml/min.

II.2.4 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion des RX aux petits angles a été utilisée pour détecter la formation de domaines, inhérente au confinement de l'ibuprofène sous sa forme amorphe, ainsi que leur stabilité dans le temps. Elle permet également de sonder la matrice, dans la mesure où les dimensions de la maille formée par l'organisation des canaux conduisent à des conditions de diffraction aux très petits angles. Les expériences présentées dans cette étude ont été réalisées sur un appareil XEUSS 2.0 (Xenocs) fonctionnant sous vide et équipé d'une microsource GeniX3D ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) et d'un détecteur de type CCD, Pilatus 200K. Cet appareil permet à la fois des analyses SAXS et WAXS, et donc d'analyser simultanément les nanocristaux et la matière amorphe, coexistant après la préparation du composite. Les échantillons ont été chargés sur une plaquette, fixés à l'aide du Kapton et placés à une distance de 473 mm du détecteur.

II.3 Méthodes

II.3.1 Méthodes de chargement à l'état solide

Le broyage mécanique a été utilisé dans les années récentes afin de charger des principes actifs dans les matrices de silice mésoporeuses en évitant l'utilisation des solvants parfois toxiques et la dégradation chimique du principe actif par fusion à haute température. Cette méthode de chargement à l'état solide consiste à effectuer le cobroyage d'une proportion $[x]\text{wt\%}$ d'un principe actif avec $[1-x]\text{wt\%}$ de mésopores. Deux récipients sont utilisés pour effectuer

ce chargement : une jarre en acier de 5 ml ou un tube en plastique : Eppendorf de 5 ml. La bille utilisée est une bille en acier de 6 mm de diamètre. Le mélange du principe actif avec les mésopores est placé dans le récipient, puis installé dans le broyeur oscillant MM400 de chez Retsch (Figure 32). La durée totale du cobroyage est de 30 minutes. En effet 6 cycles de 5 minutes de broyage ponctués de pause de 2 min sont effectués. Les pauses intermédiaires permettent d'éviter tout échauffement du matériau à l'intérieur de la jarre. Ce temps de pause est également utilisé pour homogénéiser la répartition de la poudre au sein de la jarre, compte tenu que celle-ci a tendance à coller sur les surfaces de la jarre et de la bille.

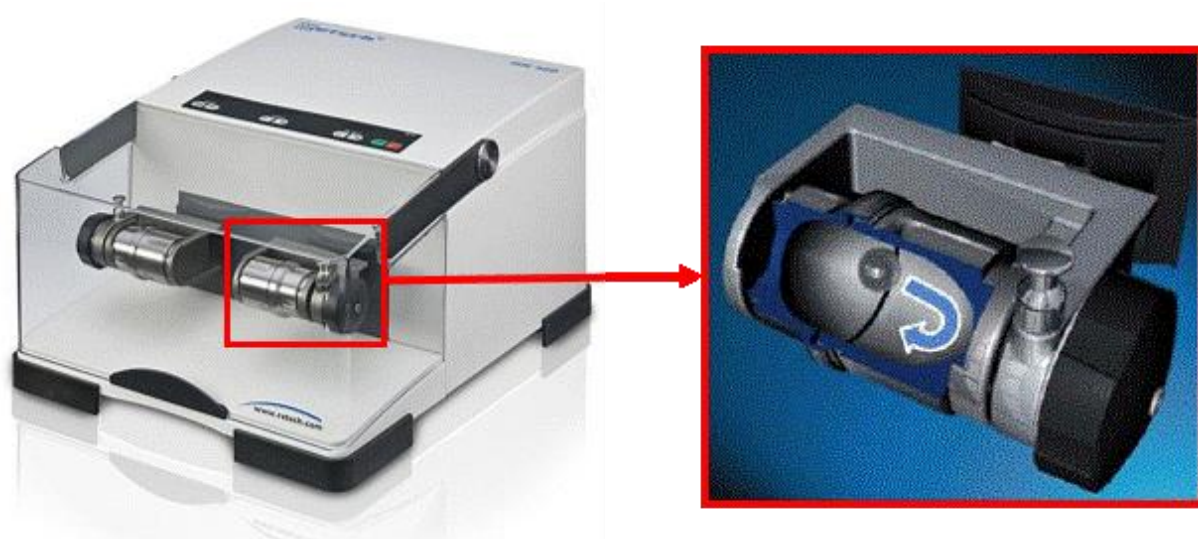


Figure 32 : Le broyeur oscillant MM400 de chez Retsch. La fenêtrée encadrée en rouge montre le mouvement de la bille à l'intérieur de la jarre.

II.3.2 Méthode de fonctionnalisation

La synthèse des matrices de silice mésoporeuses fonctionnalisées a été réalisée avec le précurseur APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$). Un protocole similaire à celui décrit dans la littérature a été adopté. 1g de poudre SBA-15 a été mis dans une solution qui contient 50 ml d'éthanol et 1 ml d'APTES. Le mélange a été chauffé à 80 °C à reflux pendant 24h sous agitation continue. À la fin de la réaction, la solution a été filtrée et la

poudre résultante a été lavée à plusieurs reprises avec de l'éthanol puis séchée à 70 °C pendant 12h. L'échantillon obtenu est noté SBA-15-NH₂.

II.3.3 Méthodes d'analyse des matériaux moléculaires par la spectroscopie Raman.

La spectroscopie est une des rares techniques à pouvoir analyser les différents types de mouvement existant dans les matériaux moléculaires. On peut classer les mouvements moléculaires en trois types, en considérant la molécule rigide.

1) Les mouvements internes à la molécule. Le nombre de mouvements internes ($3N-3$) dépend du nombre de d'atomes (N) dans la molécule. L'intervalle de fréquence dans lequel ils sont détectés s'étend généralement de 150 à 3800 cm^{-1} . La gamme 800 – 1800 cm^{-1} permet de sonder les vibrations du squelette de la molécule et de ce fait la structure moléculaire. Cette région est souvent nommée empreinte moléculaire (molecular fingerprint region). Il doit être souligné que le nombre de modes de vibration ne correspond pas aux nombres de bandes détectés dans le spectre. Pour qu'un mode de vibration soit détecté il doit modifier de manière significative le nuage électronique, phénomène produit par l'irradiation d'un rayonnement monochromatique intense d'un faisceau laser créant ainsi un moment dipolaire induit. Par ailleurs, le nombre de bandes de vibration détectées dépend à la fois des symétries de la molécule et du réseau d'une phase cristalline. Il est ainsi possible de déterminer indirectement la forme cristalline d'un système polymorphique dans cette gamme de fréquence. À plus haute fréquence, (2500 – 3800 cm^{-1}) les mouvements $X - H$ ($X = C, N, H$) permettent d'obtenir des informations importantes sur les associations moléculaires via liaisons hydrogène. Il doit être noté que les intensités de ces bandes de vibrations sont difficilement détectables compte tenu de l'expression de l'intensité Raman et de la faible sensibilité des détecteurs dans ce domaine spectrale.

2) Les mouvements externes correspondent à des potentiels d'interaction atome-atome entre 2 molécules proches voisines de type Van der Waals et sont donc détectés à très basse fréquence entre 0 et 150-200 cm^{-1} , de manière générale. Les matériaux moléculaires se caractérisent par une forte disparité entre les interactions inter et intra moléculaires, ce qui se caractérise par un gap entre le domaine des mouvements internes et celui des mouvements externes. Ce gap dépend de la rigidité de la molécule, et si celle-ci présente une flexibilité de certains groupements atomiques, il peut y avoir recouvrement de leurs vibrations avec les modes externes. C'est par exemple systématiquement le cas pour les protéines dont les spectres ne présentent aucun gap entre les deux types de mouvements. La spécificité du domaine basse fréquence est que la périodicité de l'organisation moléculaire engendre la détection de pics (modes de réseaux ou phonons) associés aux mouvements collectifs des molécules (rotation, translation et couplage entre les deux types de mouvements). Compte tenu que ce sont les potentiels atome-atome (ou constantes de forces intermoléculaires) qui sont à l'origine de la fréquence mais aussi du profil des bandes, le moindre écart à la périodicité d'un ou plusieurs atomes est directement détectable via un élargissement des bandes de vibrations. De ce fait de larges amplitudes de mouvements liées à des variations de température ou de pression seront détectables quel que soit le type d'atomes concernés, contrairement à la diffraction RX. L'analyse Raman à basse fréquence permet ainsi de révéler des degrés de désordre moléculaire non détectable par diffraction RX (ex : désordre de la phase II de l'ibuprofène non détecté par diffraction RX⁸). Lorsque le désordre détruit la périodicité du réseau, le spectre composé de phonons (bandes de vibration devient un continuum engendré par l'élargissement inhomogène des phonons, appelé densité d'états de vibration. Cet élargissement inhomogène est dû à une distribution de configurations de molécules voisines autour d'une molécule. Il y a alors différents types d'interactions atome-atome (différentes distances interatomiques, différentes directions) pour un même couple d'atomes. Le spectre d'un état totalement

désordonné (amorphe) apparaît souvent comme l'enveloppe du spectre de phonons de la phase cristalline. Le domaine apparaît comme très adapté pour aussi bien détecter de faibles degrés de désordre mais est aussi sensible pour différencier un état nano cristallisé d'un état amorphe ²⁴. Si le spectre de phonons peut être obtenu de manière complète, il est alors possible de déterminer le degré de matière cristallisé ou amorphe de manière relativement simple par rapport à la diffraction RX.

3) Les mouvements semi internes/externes correspondent souvent à des rotations de grande amplitude d'un groupement d'atomes dans la molécule ou de la molécule entière comme c'est le cas dans les phases à désordre orientationnel (exemple : Cafféine)²⁵. Ces mouvements sont thermiquement activés et sont détectés à très basse fréquence via l'élargissement de l'aile Rayleigh. De ce fait l'intensité correspondant à la contribution de ces mouvements au spectre Raman est appelée intensité quasiélastique. L'analyse de la dépendance en température de cette intensité permet de déterminer l'énergie d'activation de ces mouvements^{26,27}. Ces mouvements relaxationnels rapides (associés à des mouvements β rapides) pilotent souvent les transformations d'une phase ordonnée vers une phase désordonnée. La dépendance en température de l'intensité quasiélastique est généralement considérée inversement proportionnelle à celle du logarithme de la viscosité dynamique. Son étude permet d'analyser la transition vitreuse, détectée via une rupture de pente entre l'état liquide et l'état solide amorphe^{28,29}.

II.3.3.1 Traitement des spectres à basses fréquences

Le spectre Raman est très riche en information, à la fois au niveau structural et au niveau de la dynamique des molécules qui pilotent les transformations de phases. Cependant, l'analyse d'un spectre d'un état désordonné est très délicate dans la mesure où il y a recouvrement de la contribution quasiélastique avec la contribution vibrationnelle. Le même problème se pose pour analyser la contribution de nanocristaux coexistant avec un état amorphe. Des méthodes d'analyse des spectres Raman à basse fréquence ont été développées au sein

de l'équipe MMT afin de déconvoluer ces deux contributions de nature différente.

La Figure 33 montre le traitement d'un spectre Raman BF typique d'un état désordonné. Dans un premier temps, la ligne de base est retirée du spectre. Ensuite, l'intensité Raman $I_{Raman}(\omega, T)$ est corrigée du facteur de Bose-Einstein, qui permet d'éviter les modifications spectrales liées aux fluctuations de la température. On obtient ainsi l'intensité $I_r(\omega)$ à partir de la relation suivante :

$$I_r(\omega) = \frac{I_{Raman}(\omega, T)}{[n(\omega, T) + 1] \times \omega}$$

12

Où $n(\omega, T)$ est le facteur de Bose-Einstein

$$n(\omega, T) = \left[\exp\left(\frac{h\omega}{kT}\right) - 1 \right]^{-1}$$

13

Le spectre est ensuite ajusté en utilisant une Lorentzienne centrée en $\omega=0$, pour décrire la contribution quasiélastique, une fonction lognormale pour décrire les mouvements vibrationnels à basse fréquence, et une Gaussienne pour les vibrations à plus haute fréquence. À la suite de cette procédure d'ajustement du spectre, la contribution quasiélastique peut être retirée et l'intensité Raman corrigée du facteur de Bose-Einstein peut être converti en susceptibilité Raman selon l'expression suivante :

$$\chi''(\omega) = \omega \times I_r(\omega)$$

14

La susceptibilité Raman est directement reliée à la densité d'état de vibration par l'équation suivante :

$$\chi''(\omega) = \frac{C(\omega)}{\omega} \times G(\omega)$$

15

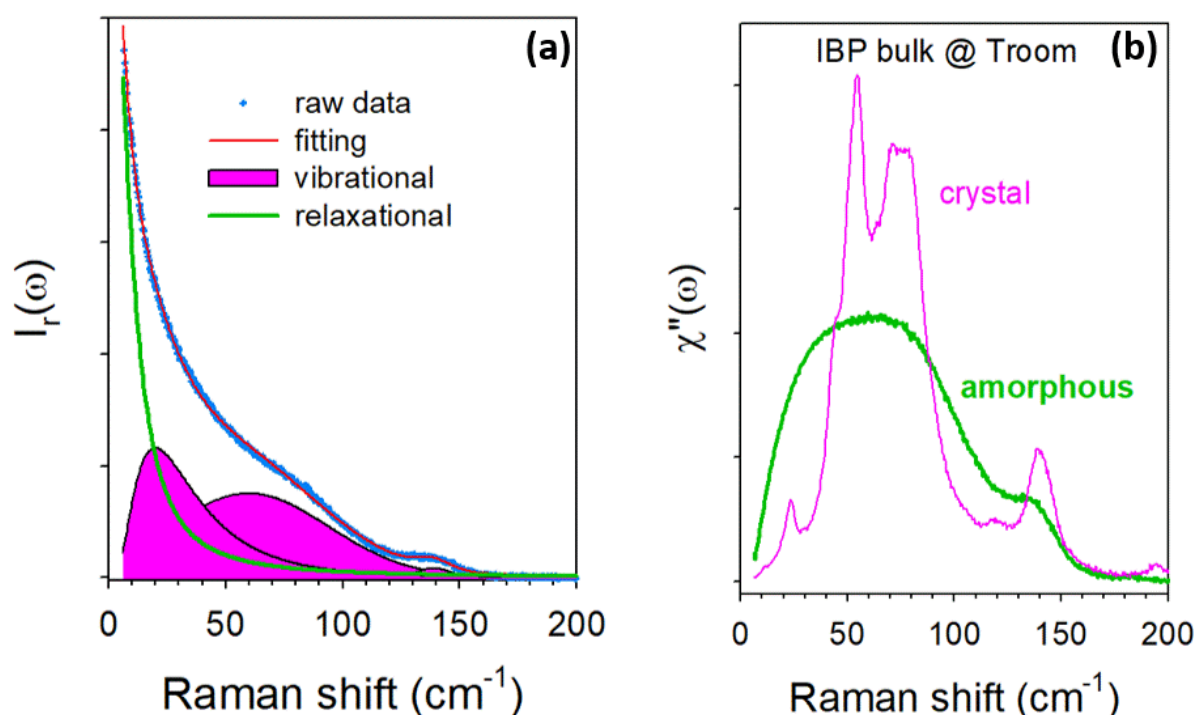


Figure 33: Traitement des spectres à basses fréquences. a) Procédure d'ajustement effectuée sur un spectre à basses fréquences de l'ibuprofène en phase liquide (état désordonné). b) Susceptibilité Raman dont la composante relaxationnelle a été soustraite afin de ne représenter que la composante vibrationnelle

Il est important de préciser que l'intensité intégrée de la densité d'états de vibration est égale à l'intensité intégrée du spectre de phonons de la phase cristalline, dans la mesure où les deux spectres représentent les mouvements collectifs des molécules. Il est possible de déterminer le degré de cristallinité d'un échantillon au cours d'une cinétique de cristallisation, à partir des spectres Raman à basses fréquences à l'aide d'une méthode basée sur la relation entre le spectre de l'état amorphe (VDOS) et le spectre des phonons caractéristiques de l'état cristallin d'égale intensité. Afin de déterminer le degré de cristallinité d'un échantillon partiellement cristallisé, la différence entre les susceptibilités Raman des états cristallins et amorphe du bulk est d'abord calculée. Cette différence est tracée sur la Figure 34 en vert. Dans un second temps, la différence entre la susceptibilité Raman de l'échantillon partiellement cristallisé

et son homologue totalement amorphe est calculée et tracée en rouge. Le rapport des aires donne le degré de cristallinité.

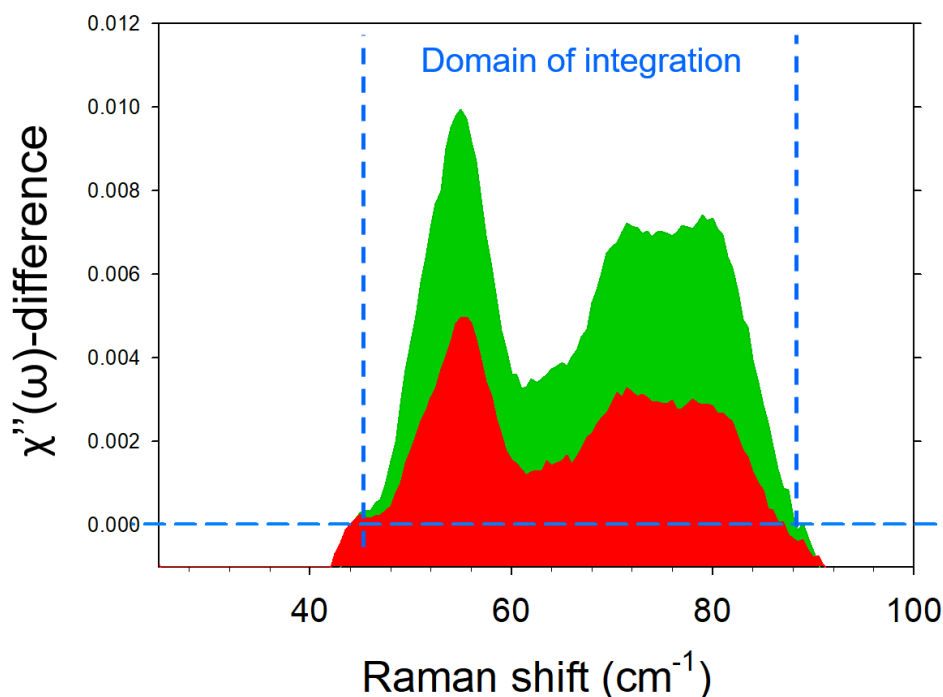


Figure 34: Procédure de calcul du degré de cristallinité des échantillons partiellement cristallisés

La spectroscopie Raman permet également d'analyser la séquence de transitions de phase d'un matériau moléculaire désordonné, lors d'une procédure de chauffe à partir de l'état vitreux. Les spectres sont alors collectés lors d'une augmentation continue de la température de l'échantillon. Le rapide temps d'acquisition d'un spectre (moins de 1 minute) permet d'obtenir la dépendance en température de l'intensité quasiélastique à 1 °C/min ou moins. L'ensemble des spectres est traité simultanément en utilisant MATLAB. La Figure 35.a présente les spectres Raman à basses fréquences $I_r(\omega)$ enregistrés et traités lors d'une rampe en température à 1 °C/min de l'ibuprofène vitreux obtenu avec trempe du liquide à -100 °C. Chaque spectre a été normé par l'intensité intégrée dans un domaine spectral où l'intensité quasiélastique ne donne plus de contribution au spectre. Dans ce cas la normalisation est faite à partir de l'intensité des spectres intégrée entre 70 et 150 cm⁻¹. Au-delà de 150 cm⁻¹, les modes internes donnent une contribution au spectre. Cette

présentation montre les transitions de phase successives que subit l'ibuprofène lors d'une chauffe à partir de l'état vitreux. En effet, un premier événement a lieu à $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ et correspond à la transition vitreuse de l'ibuprofène⁶, ensuite, la cristallisation sous la forme métastable II⁶ est détectée juste en dessous de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ par une légère diminution de l'intensité à très basses fréquences, puis cette forme II fond vers $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, cette fusion est mise en évidence par l'augmentation de l'intensité à très basses fréquences I_{QES} . Ensuite, une chute brutale de cette intensité est observée et correspond à la cristallisation vers la forme stable de l'ibuprofène notée I. Parallèlement à cette chute d'intensité, on détecte des bandes de vibration entre 0 et 150 cm^{-1} , correspondant aux modes de réseau. On peut souligner qu'aucune bande de vibration n'est détectable dans le spectre basse-fréquence de la forme II. Cette caractéristique ainsi que la forte intensité quasiélastique du spectre de la forme II par rapport à celle de la forme I mettent en évidence le degré de désordre important de la phase métastable. Cette forme fond ensuite vers $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ observée par l'augmentation de l'intensité I_{QES} . Ces transitions de phase peuvent être bien décrites avec l'intensité I_{QES} .

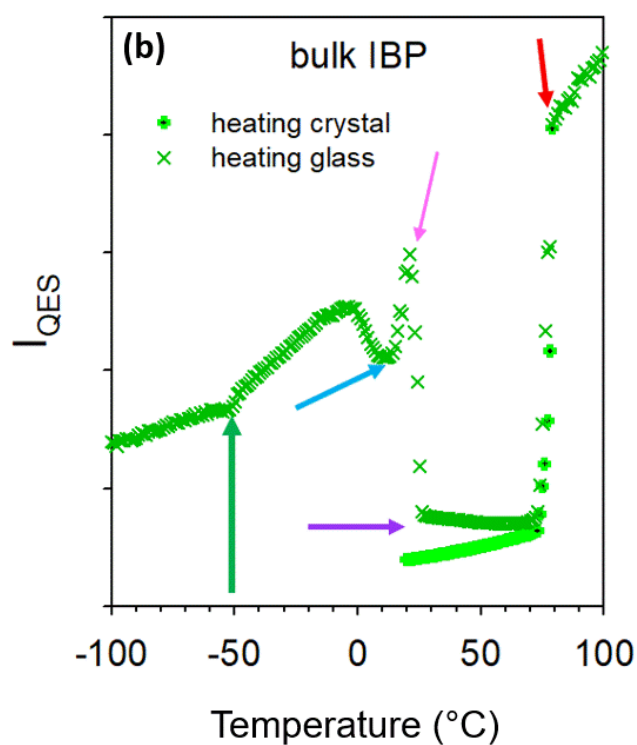
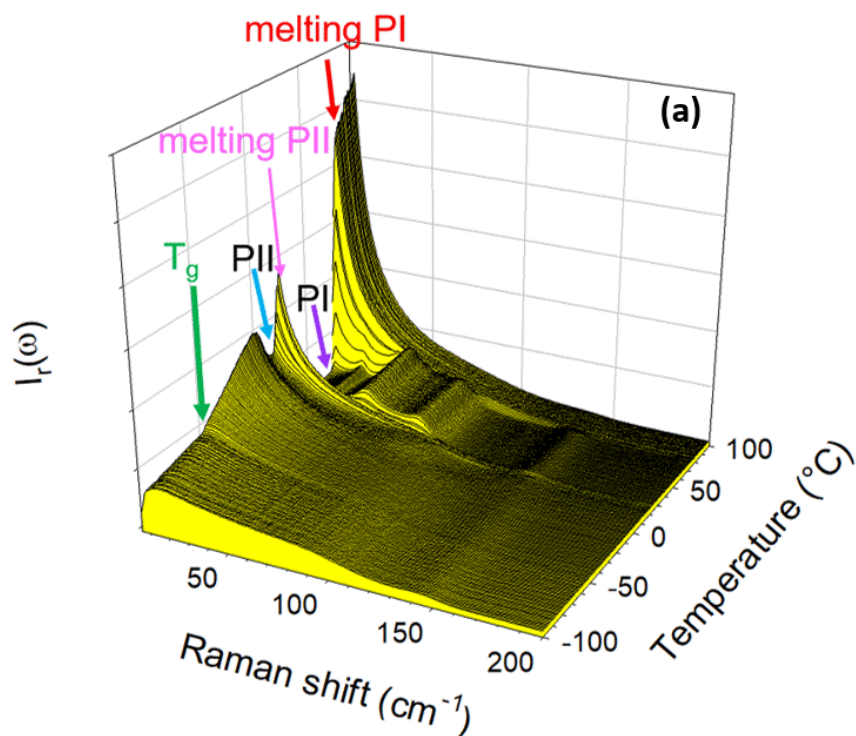


Figure 35: Chauffage de l'état vitreux de l'ibuprofène : a) Représentation en $I_r(\omega)$ des spectres Raman issus d'une chauffe à $1^\circ\text{C}/\text{min}$ à partir de l'état vitreux de l'ibuprofène obtenu par trempe du liquide à -100°C . b) Représentation en I_{QES} obtenue en intégrant les spectres $I_r(\omega)$ sur un domaine allant de 9 à 35 cm^{-1}

. La Figure 35.b montre la dépendance de I_{QES} en température. Cette présentation est obtenue en intégrant les spectres Raman $I_r(\omega)$ à basses fréquences (entre 9 et 35 cm^{-1}) pour chaque température. À -50 °C, un changement de pente est observé et correspond à la transition vitreuse T_g , une légère diminution de l'intensité quasi-élastique révèle la cristallisation de l'ibuprofène vers la forme II qui fond ensuite vers 20 °C. Cette fusion est suivie par une chute brutale de $I_{QES}(T)$ qui montre la cristallisation de l'ibuprofène vers la forme stable I. La forme I fond ensuite vers 80 °C, ce qui est observé via la brusque augmentation de l'intensité quasiélastique qui s'aligne sur celle du liquide sous-refroidi.

II.3.3.2 Traitement des spectres à moyennes fréquences

Dans le domaine des moyennes fréquences, les spectres Raman ne sont pas déformés par le facteur de Bose-Einstein. De ce fait, le traitement de ces spectres consiste en simplement la soustraction de la ligne de base, et la normalisation par rapport aux bandes Raman qui dépendent peu de la température. Ce traitement a été effectué dans le cadre de ce travail à l'aide du logiciel PeakFit. La ligne de base choisie dépend des systèmes étudiés mais est généralement une fonction polynomiale d'ordre 2 ou d'ordre 3.

L'étude de cette région spectrale permet de mettre en évidence les interactions entre le principe actif confiné et la surface interne des mésopores (SBA-15, MCM-41) qui contient des silanols (Si-OH), à travers l'étude du mode d'étirement C=O qui se situe vers 1600 cm^{-1} . Ce domaine de fréquence permet également de connaître les proportions d'un matériau A par rapport à un matériau B dans un mélange AB. Il est par exemple possible de quantifier la part du cristal dans un mélange de cristal et d'amorphe et de définir ainsi le degré de cristallinité de l'échantillon à partir de l'étude de bandes distinctives de chaque état physique. En effet une cartographie est d'abord réalisée sur l'échantillon. Ensuite, un traitement DCLS (Direct Classical Least Squares) est appliqué sur les données de la cartographie. Cette méthode classique directe

des moindres carrés permet d'ajuster le spectre d'un point de la cartographie à partir d'une combinaison linéaire des composants purs (cristal et amorphe par exemple). Ce traitement nécessite donc de connaître les composants du mélange afin d'avoir les spectres de référence pour effectuer l'ajustement et les calculs des proportions des composants.

Cette région spectrale et notamment entre 1500 et 1800 cm^{-1} a été particulièrement utilisée dans des études antérieures afin d'analyser les structures secondaires des protéines et de décrire leurs mécanismes de dénaturation^{32,33}. En effet, ce domaine spectral est caractérisé par l'existence d'une bande appelée la bande amide I (AI) dont la fréquence permet de distinguer la conformation des protéines. Cette bande est due en grande partie aux mouvements d'étirement de la double liaison C=O, avec une plus faible contribution des mouvements d'étirement C-N et N-H, et du mouvement de déformation angulaire entre C-N et N-H. Cette bande est généralement considérée comme une sonde structurale de la conformation moléculaire de la protéine. À titre d'exemple, la Figure 36 montre deux spectres du Lysozyme à l'état natif (à 30 °C) et du lysozyme à l'état dénaturé (à 100°C). L'état dénaturé est donc caractérisé par un décalage de la bande amide (AI) vers les hautes fréquences. Ceci peut être expliqué par la rupture des liaisons hydrogène intramoléculaires (C=O...H) au sein des hélices qui rend plus dur l'étirement de la liaison C=O. Il est donc possible de suivre la cinétique de dénaturation du lysozyme correspondant au dépliement des hélices, principales composantes de l'état natif de cette protéine.

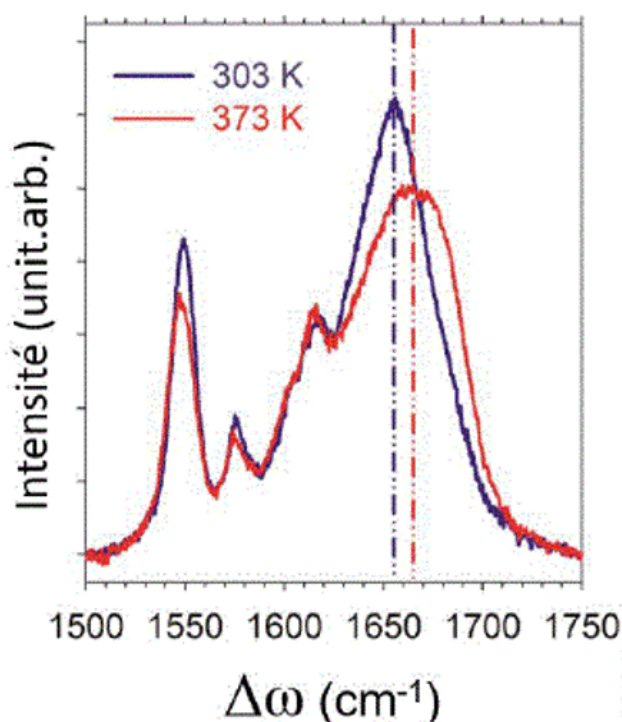


Figure 36: Dénaturation chaude du Lysozyme: Comparaison entre deux spectres du lysozyme à deux températures différentes montrant que l'état dénaturé se caractérise par un décalage de la bande amide AI vers les hautes fréquences par rapport à l'état natif³⁴

II.3.4 Physisorption

La physisorption est une technique largement utilisée pour caractériser les matériaux poreux. En effet, elle permet d'estimer la taille moyenne des pores, le volume poreux, la surface spécifique, etc ...

Les données issues des expériences de physisorption sont généralement représentées par des courbes d'isotherme, décrivant la quantité adsorbée du gaz N₂ en (mmol/g) en fonction de la pression relative $\frac{p}{p_0}$. La Figure 37.a montre un exemple de cette représentation pour les SBA-15. La forme de l'hystérèse créée par les branches d'adsorption et désorption est généralement utilisée pour décrire la mésoporosité du matériau analysé.

La distribution de la taille des pores peut être évaluée avec la méthode BJH (Barret, Joyner et Halenda). Ce modèle développé dans les années 1950, établit

un lien entre les données thermodynamiques, l'isotherme d'adsorption ou désorption, et les données géométriques de l'échantillon. La distribution moyenne de la taille des pores est souvent représentée comme sur la Figure 37.b. Le maximum du pic correspond à la taille moyenne des pores. La surface spécifique S_{BET} en m^2/g (BET : Brunauer, Emmet et Teller) peut être calculée en utilisant l'équation BET sur la partie $0.05 < \frac{p}{p^0} < 0.25$. Le volume total des pores V_{total} en cm^3/g est mesuré sur la branche d'adsorption à $\frac{p}{p^0} = 0.99$. Le volume des micropores V_{μ} en cm^3/g est mesuré en utilisant la méthode du t-plot sur la partie $0.2 < \frac{p}{p^0} < 0.5$. Le volume des mésopores $V_{\text{mésoporeux}}$ est donc déduit à partir des deux valeurs du volume total V_{total} et du volume V_{μ} selon la relation suivante

$$V_{\text{mésoporeux}} = V_{\text{total}} - V_{\mu}$$

16

L'appareil utilisé pour effectuer les expériences de physisorption présentées dans ce manuscrit est un instrument Micromeritics Tristar II. Une étape préliminaire est nécessaire avant l'analyse afin de libérer la porosité des impuretés. Les échantillons sont donc placés pendant une nuit dans un site d'activation chauffé à 60 °C lorsqu'il s'agit des systèmes confinés, tandis que les échantillons qui contiennent uniquement les matrices de silice mésoporeuses ont été chauffés à 300°C pendant 4 heures.

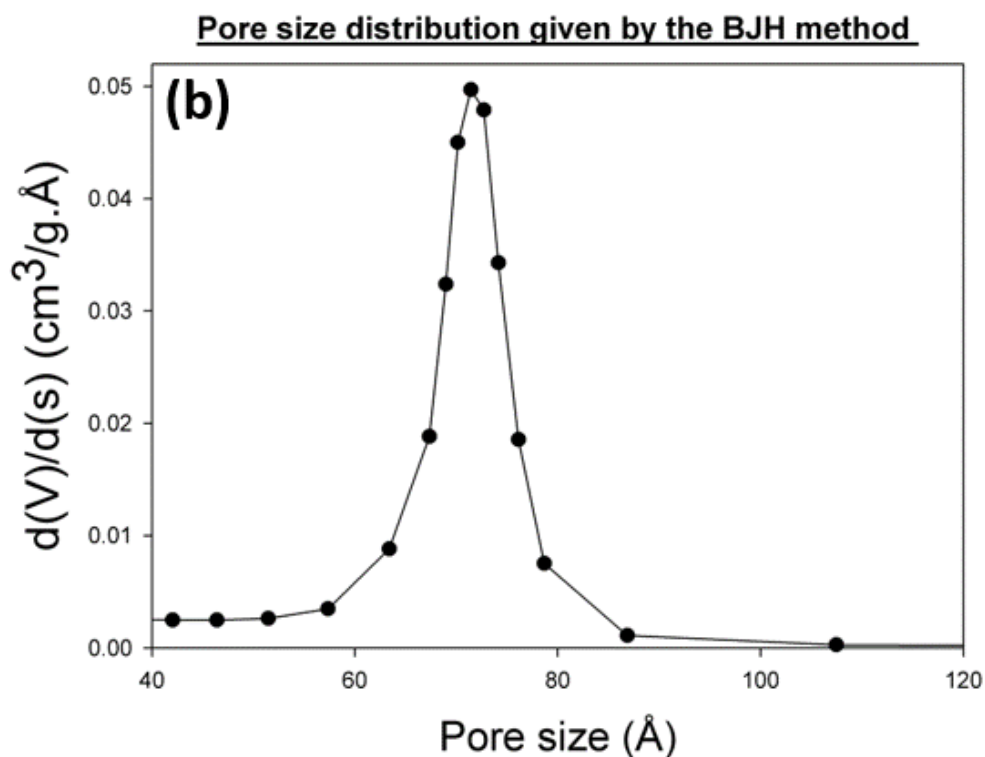
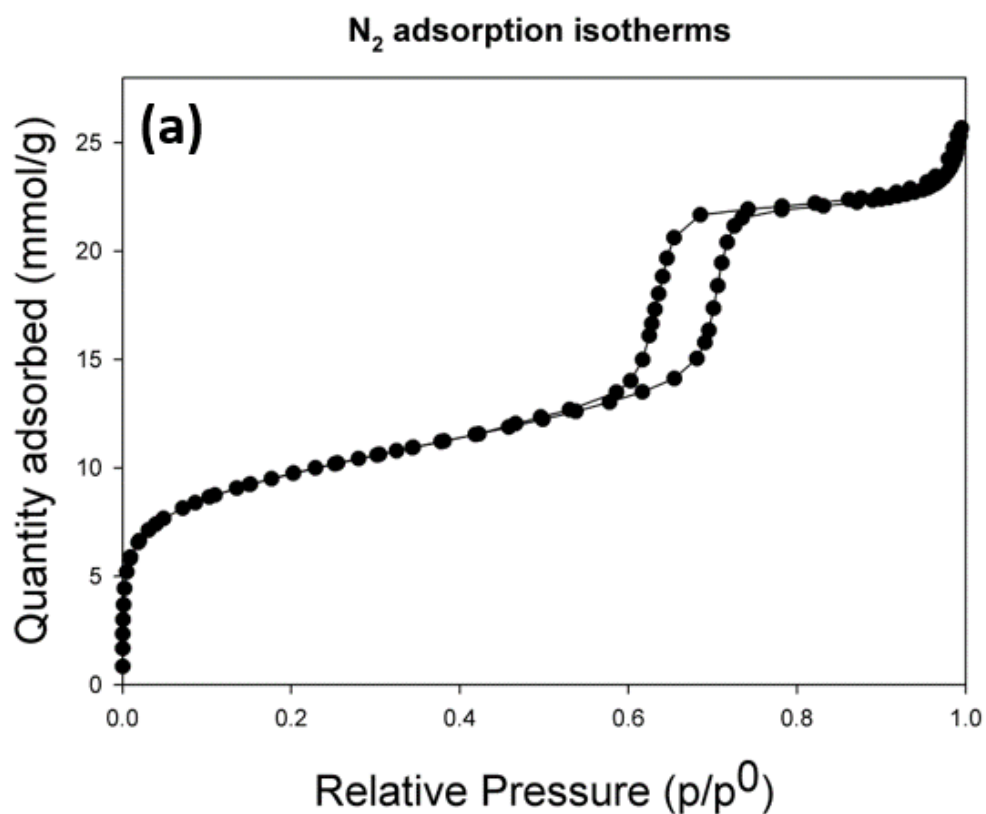


Figure 37: Physisorption des SBA-15. a) Isotherme d'adsorption-désorption de N₂. b) Distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH (Barret, Joyner et Halenda)

II.3.5 Libération de l'ibuprofène

Un spectromètre UV (UV-1800 Spectrophotometer Shimadzu) a été utilisé afin de réaliser les études de libération de l'ibuprofène dans les systèmes confinés. Ces études ont été effectuées dans une gamme de longueur d'onde allant de 200 à 250 nm, puisque le pic d'absorbance maximale de l'ibuprofène est à 220 nm³⁵. Un milieu très acide (HCl à 0.1 M) a été choisi pour effectuer cette étude dans la mesure où la vitesse de libération de l'ibuprofène dans un milieu acide est relativement lente par rapport à sa vitesse de libération dans un milieu PBS³⁶. Dans un premier temps, une calibration dans la solution de HCl à 0.1 M a été réalisée (Figure 38). Cette calibration permet de retrouver la concentration d'ibuprofène libéré et est en accord avec la littérature³⁶. En effet, la loi de Beer-Lambert établit une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration du principe actif dans la solution selon l'expression suivante :

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

17

Où A est l'absorbance, ε est le coefficient d'absorption molaire en mol.L⁻¹, l en cm correspond à la longueur du trajet parcouru par le rayonnement dans la solution (cela représente la largeur de la cuve dans laquelle la solution est mise) et C est la concentration du principe actif absorbant en mol.L⁻¹.

Les expériences de libération ont été réalisées dans les conditions Sink^{37,38}. c'est-à-dire que la concentration de l'ibuprofène dans la solution ne dépassait pas 30% de sa solubilité qui est d'environ 47mg/L³⁶. Cette limite permet d'éviter une modification de la cinétique de libération suite à une cristallisation induite par une saturation de l'ibuprofène dans la solution. Expérimentalement, à la température ambiante, 10 mg d'un composite sont ajoutés à 250 ml de la solution acide chloridrique à 0.1 M sous agitation à 100 tours/min. Pour chaque mesure, 2 ml de la solution sont prélevés pour l'analyse et remis par la suite dans le bécher qui contient la solution entière afin d'éviter les variations du volume total. Ces expériences ont été répétées 3 fois (n = 3) pour chaque

échantillon pour limiter les incertitudes. Les courbes de libération sont présentées sous la forme du pourcentage d'ibuprofène libéré en fonction du temps.

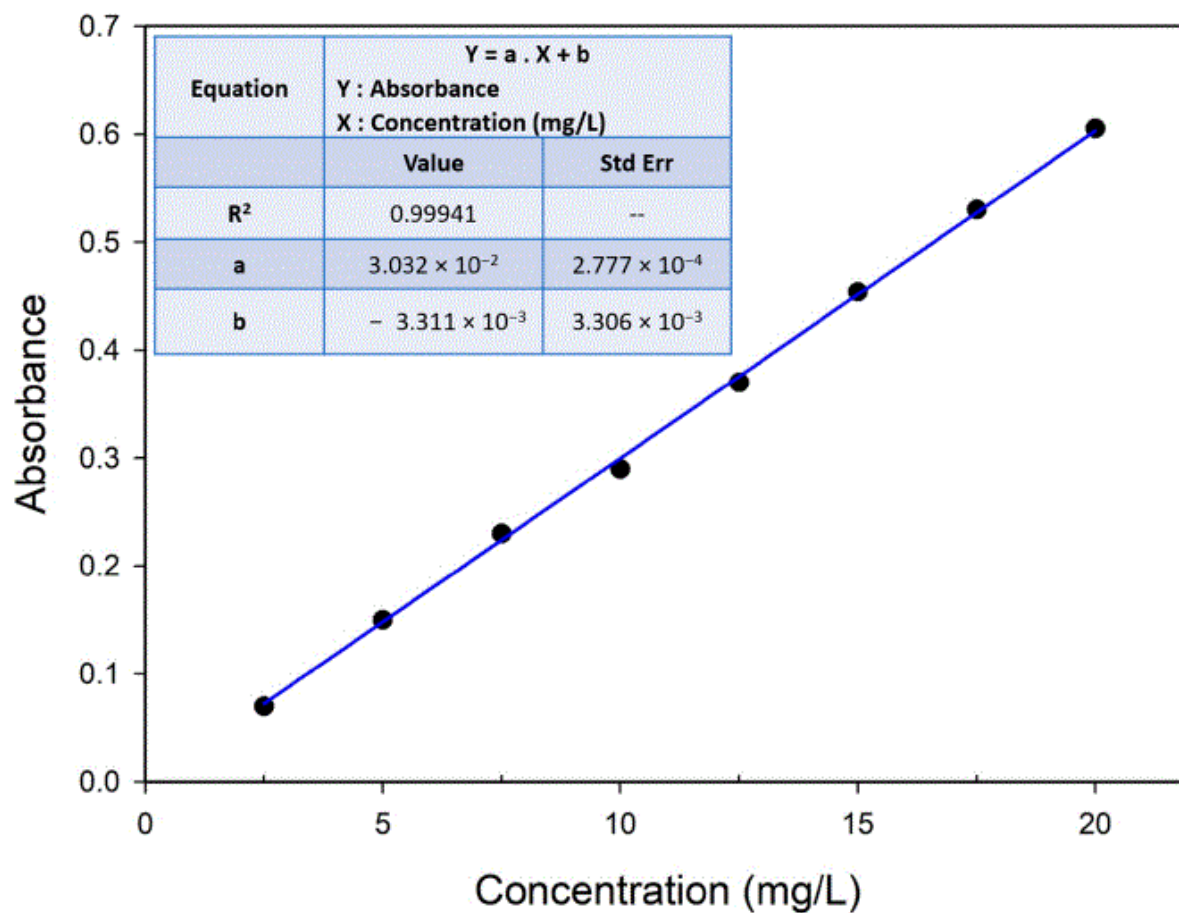


Figure 38: Courbe de calibration en absorbance de l'ibuprofène dans un milieu acide de solution acide chloridrique à 0.1 M

Références

1. Vallet-Regi M, Rámila A, Del Real RP, Pérez-Pariente J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem Mater*. 2001;13(2):308-311. doi:10.1021/cm0011559
2. Qian KK, Zhou W, Xu X, Udovic TJ. Characterization of Medicinal Compounds Confined in Porous Media by Neutron Vibrational Spectroscopy and First-Principles Calculations: A Case Study with Ibuprofen. *Pharm Res*. 2012;29(9):2432-2444. doi:10.1007/s11095-012-0771-z
3. Xu F, Sun LX, Tan ZC, Liang JG, Li RL. Thermodynamic study of ibuprofen by adiabatic calorimetry and thermal analysis. *Thermochimica Acta*. 2004;412(1):33-57. doi:10.1016/j.tca.2003.08.021
4. Shankland N, Wilson CC, Florence AJ, Cox PJ. Refinement of Ibuprofen at 100K by Single-Crystal Pulsed Neutron Diffraction. *Acta Cryst C*. 1997;53(7):951-954. doi:10.1107/S0108270197003193
5. Ostrowska K, Kropidłowska M, Katrusiak A. High-Pressure Crystallization and Structural Transformations in Compressed R,S-Ibuprofen. *Crystal Growth & Design*. 2015;15(3):1512-1517. doi:10.1021/cg5018888
6. Dudognon E, Danède F, Descamps M, Correia NT. Evidence for a New Crystalline Phase of Racemic Ibuprofen. *Pharmaceutical research*. 2008;25(12):2853-2858. doi:10.1007/s11095-008-9655-7
7. Derollez P, Dudognon E, Affouard F, Danède F, Correia NT, Descamps M. Ab initio structure determination of phase II of racemic ibuprofen by X-ray powder diffraction. *Acta Cryst B*. 2010;66(1):76-80. doi:10.1107/S0108768109047363
8. Hédoux A, Guinet Y, Derollez P, Dudognon E, Correia NT. Raman spectroscopy of racemic ibuprofen: Evidence of molecular disorder in phase II. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;421(1):45-52. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.015
9. Görbitz CH, Törnroos KW, Day GM. Single-crystal investigation of L-tryptophan with $Z' = 16$. *Acta Cryst B*. 2012;68(5):549-557. doi:10.1107/S0108768112033484
10. Gheorghe D, Neacșu A, Contineanu I, Tănăsescu S, Perișanu Ș. A calorimetric study of L-, d- and dl-isomers of tryptophan. *J Therm Anal Calorim*. 2017;130(2):1145-1152. doi:10.1007/s10973-017-6396-z
11. Holzapfel K, Liu J, Rades T, Leopold CS. (Co-)amorphization of enantiomers – Investigation of the amorphization process, the physical stability and the dissolution behavior. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;616:121552. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121552
12. Sosa-Rivadeneira M, Zavala A, Rivas-Silva JF, Uriza-Prias D, Bernès S. Crystallization of the Third Polymorphic Modification of L-Tryptophan: A Case of Non-order-disorder Polytypism. *Crystal Growth & Design*. 2023;23(10):7031-7036. doi:10.1021/acs.cgd.3c00704

13. Schneider-Helmert D, Spinweber CL. Evaluation of L-tryptophan for treatment of insomnia: A review.
14. Hartmann E, Cravens J. Hypnotic Effects of L-Tryptophan. *Archives of General Psychiatry*. 1974;31(3):394-397. doi:10.1001/archpsyc.1974.01760150098014
15. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:IJTR.S2129. doi:10.4137/IJTR.S2129
16. Yadav I, Aswal VK, Kohlbrecher J. Size-dependent interaction of silica nanoparticles with lysozyme and bovine serum albumin proteins. *Phys Rev E*. 2016;93(5):052601. doi:10.1103/PhysRevE.93.052601
17. Bhattacharyya MS, Hiwale P, Piras M, et al. Lysozyme Adsorption and Release from Ordered Mesoporous Materials. *J Phys Chem C*. 2010;114(47):19928-19934. doi:10.1021/jp1078218
18. Caetano DLZ, Metzler R, Cherstvy AG, de Carvalho SJ. Adsorption of Lysozyme Into a Charged Confining Pore.
19. Cegielska-Radziejewska R, Lesniewski G, Kijowski J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008;58(1). Accessed March 31, 2024. <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-3c51a543-e36a-41a8-9b8c-ad3dc815a94a>
20. Matthews BW, Remington SJ. The Three Dimensional Structure of the Lysozyme from Bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974;71(10):4178-4182. doi:10.1073/pnas.71.10.4178
21. Bugatti V, Sorrentino A, Gorrasi G. Encapsulation of Lysozyme into halloysite nanotubes and dispersion in PLA: Structural and physical properties and controlled release analysis. *European Polymer Journal*. 2017;93:495-506. doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.06.024
22. Han Q, Smith KM, Darmanin C, Ryan TM, Drummond CJ, Greaves TL. Lysozyme conformational changes with ionic liquids: Spectroscopic, small angle x-ray scattering and crystallographic study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021;585:433-443. doi:10.1016/j.jcis.2020.10.024
23. Masuda T, Ide N, Kitabatake N. Structure–Sweetness Relationship in Egg White Lysozyme: Role of Lysine and Arginine Residues on the Elicitation of Lysozyme Sweetness. *Chemical Senses*. 2005;30(8):667-681. doi:10.1093/chemse/bji060
24. Hédoux A, Derollez P, Guinet Y, Dianoux A, Descamps M. Low-frequency vibrational excitations in the amorphous and crystalline states of triphenyl phosphite: A neutron and Raman scattering investigation. *Phys Rev B*. 2001;63. doi:10.1103/PhysRevB.63.144202
25. Hédoux A, Decroix AA, Guinet Y, Paccou L, Derollez P, Descamps M. Low- and High-Frequency Raman Investigations on Caffeine: Polymorphism, Disorder and Phase Transformation. *J Phys Chem B*. 2011;115(19):5746-5753. doi:10.1021/jp112074w

26. Guinet Y, Paccou L, Danède F, Hédoux A. Revisiting the phase transition sequence in L-methionine: Description of the disordering mechanism in an essential amino acid. *The Journal of Chemical Physics*. 2022;156(3):034501. doi:10.1063/5.0077743
27. Guinet Y, Paccou L, Danède F, Derollez P, Hédoux A. Identification of incommensurability in L -leucine: can lattice instabilities be considered as general phenomena in hydrophobic amino acids? *Phys Chem Chem Phys*. 2022;24(44):27023-27030. doi:10.1039/D2CP00989G
28. Guinet Y, Paccou L, Danède F, Willart JF, Derollez P, Hédoux A. Comparison of amorphous states prepared by melt-quenching and cryomilling polymorphs of carbamazepine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;509(1-2):305-313. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.05.050
29. Hédoux A, Guinet Y, Paccou L, Derollez P, Danède F. Vibrational and structural properties of amorphous n-butanol: A complementary Raman spectroscopy and X-ray diffraction study. *The Journal of Chemical Physics*. 2013;138(21):214506. doi:10.1063/1.4808159
30. Galeener FL, Sen PN. Theory for the first-order vibrational spectra of disordered solids. *Phys Rev B*. 1978;17(4):1928-1933. doi:10.1103/PhysRevB.17.1928
31. Shuker R, Gammon RW. Raman-Scattering Selection-Rule Breaking and the Density of States in Amorphous Materials. *Phys Rev Lett*. 1970;25(4):222-225. doi:10.1103/PhysRevLett.25.222
32. Starciuc T, Malfait B, Danede F, et al. Trehalose or Sucrose: Which of the Two Should be Used for Stabilizing Proteins in the Solid State? A Dilemma Investigated by In Situ Micro-Raman and Dielectric Relaxation Spectroscopies During and After Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;109(1):496-504. doi:10.1016/j.xphs.2019.10.055
33. Starciuc T, Guinet Y, Paccou L, Hedoux A. Influence of a Small Amount of Glycerol on the Trehalose Bioprotective Action Analyzed In Situ During Freeze-Drying of Lysozyme Formulations by Micro-Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;106(10):2988-2997. doi:10.1016/j.xphs.2017.05.040
34. Starciuc T. *Apport de La Spectroscopie Raman à l'étude Des Mécanismes de Stabilisation Des Protéines Par Les Disaccharides et Cyclodextrines*. These de doctorat. Lille 1; 2017. Accessed June 14, 2023. <https://www.theses.fr/2017LIL10179>
35. Kwon M, Kim S, Yoon Y, et al. Comparative evaluation of ibuprofen removal by UV/H₂O₂ and UV/S₂O₈²⁻ processes for wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*. 2015;269:379-390. doi:10.1016/j.cej.2015.01.125
36. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques*. These de doctorat. Université de Lille (2018-

2021); 2019. Accessed September 18, 2023.
<https://theses.fr/2019LILUR051>

37. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS.
38. Gibaldi M, Feldman S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1967;56(10):1238-1242. doi:10.1002/jps.2600561005

Chapitre III : Analyse des paramètres opératoires du chargement assisté par broyage mécanique : influence de la fréquence de broyage sur l'état physique de la matrice mésoporeuse et celui de la matière confinée

Les deux enjeux majeurs qui préoccupent les pharmaciens lors de la formulation des médicaments sont la stabilité et la solubilité des principes actifs. Un principe actif est dans la plupart du temps synthétisé à l'état cristallin^{1,2} souvent très peu soluble. Il est maintenant reconnu que le chargement de matériaux de faible poids moléculaire au sein de matrices de silice mésoporeuse, permet de placer ceux-ci dans un état amorphe stable lorsque la méthode de chargement est basée sur le phénomène de capillarité. Ceci implique que le matériau soit dissous dans une solution à base de solvants, souvent toxiques et incompatibles avec l'application pharmaceutique, ou que le matériau soit porté à l'état liquide dans lequel il peut être dégradé si la température de fusion est assez élevée. La faible capacité de remplissage de ces méthodes de chargement ainsi que la nécessité de nettoyage pour enlever le matériau non chargé sont des verrous supplémentaires à l'utilisation de ces matrices comme support de principes actifs amorphes. Cependant l'intérêt d'utiliser le confinement à l'échelle nanométrique comme méthode d'amorphisation du matériau est que l'état amorphe dans lequel il est confiné est relativement stable, dans la mesure où le phénomène de nucléation est inhibé, rendant impossible la cristallisation. Pour lever les verrous technologiques décrits ci-dessus, Malfait et al.³⁻⁶ ont développé récemment une méthode de chargement par broyage mécanique décrite dans le chapitre I. Cette méthode est au stade des premières explorations visant à maîtriser les

paramètres opératoires notamment la fréquence de broyage, ainsi que les propriétés de la matrice (taille de pores, chimie de surface...) pour manipuler l'état physique du matériau confiné. Les premières analyses^{3-5,7} ont permis de déterminer les capacités de remplissage des matrices SBA-15 et MCM-41 et le temps de broyage nécessaire à leur chargement complet et sonder l'état physique de plusieurs principes actifs en fixant la fréquence de broyage à 30 Hz.

Dans ce chapitre, l'effet de la fréquence de broyage à la fois sur les matrices de silice mésoporeuses, sur la capacité de remplissage et sur l'état physique de l'ibuprofène confiné sera analysé. Pour cela, des expériences de physisorption, de diffusion des rayons X aux petits angles, de microscopie électronique à balayage et de spectroscopie Raman ont été réalisées.

III.1 Effet de la fréquence de broyage sur les SBA-15

Les premières études visant à déterminer les performances de remplissage des pores ont été réalisées à une fréquence de 30 Hz^{3-5,7,8}. Dans cette partie, nous varions la fréquence de broyage de 10 à 30 Hz et étudions l'impact de ce paramètre sur l'état physique de la matrice SBA-15.

III.1.1 Impact du broyage sur la taille des particules

La Figure 39 montre des analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) des SBA-15 non broyés et des SBA-15 broyés à différentes fréquences de broyage, allant de 10 jusqu'à 30 Hz. Les clichés MEB de ces échantillons ont été réalisés avec une tension d'accélération de 5 kV et une distance de travail de 10 mm et sont présentés avec un grossissement $\times 30\,000$. Sur la Figure 39.a, le cliché MEB des SBA-15 non broyés est présenté. Les particules se présentent sous forme de bâtonnets allongés, de taille plus ou moins homogène. Sur la Figure 39.b, le cliché MEB des SBA-15 broyés à 10 Hz est présenté. Tout comme pour les SBA-15 non broyés, les particules se présentent également sous forme de bâtonnets allongés. Cependant, la taille

de ces particules semble être plus inhomogène. Cette inhomogénéité peut être interprétée par la réduction de taille d'une partie des particules suite au broyage mécanique. Cet impact est d'autant plus observé sur les échantillons broyés à 20 et à 30 Hz. En effet, la Figure 39.c et la Figure 39.d présentent les photos MEB des SBA-15 broyés à 20 Hz et des SBA-15 broyés à 30 Hz respectivement, nous pouvons facilement observer que ces deux échantillons ont un aspect granulaire dépendant de l'intensité de broyage. Plus le broyage est intense plus la réduction de la taille des particules est notable.

À l'inverse, selon une étude antérieure réalisée par microscopie électronique à transmission et par physisorption³, le broyage pendant 30 min à 30 Hz des SBA-15 affecte peu la taille des pores dont le diamètre est de l'ordre de 7.9 nm pour l'échantillon non broyé et de 7.2 nm pour le même échantillon après le broyage. Nous pouvons donc en conclure que le broyage mécanique ne modifie pas la taille moyenne des pores des SBA-15, mais induit une diminution de la taille des particules. Cette diminution est dépendante de la fréquence de broyage et sera donc quantifiée dans les paragraphes qui suivent.

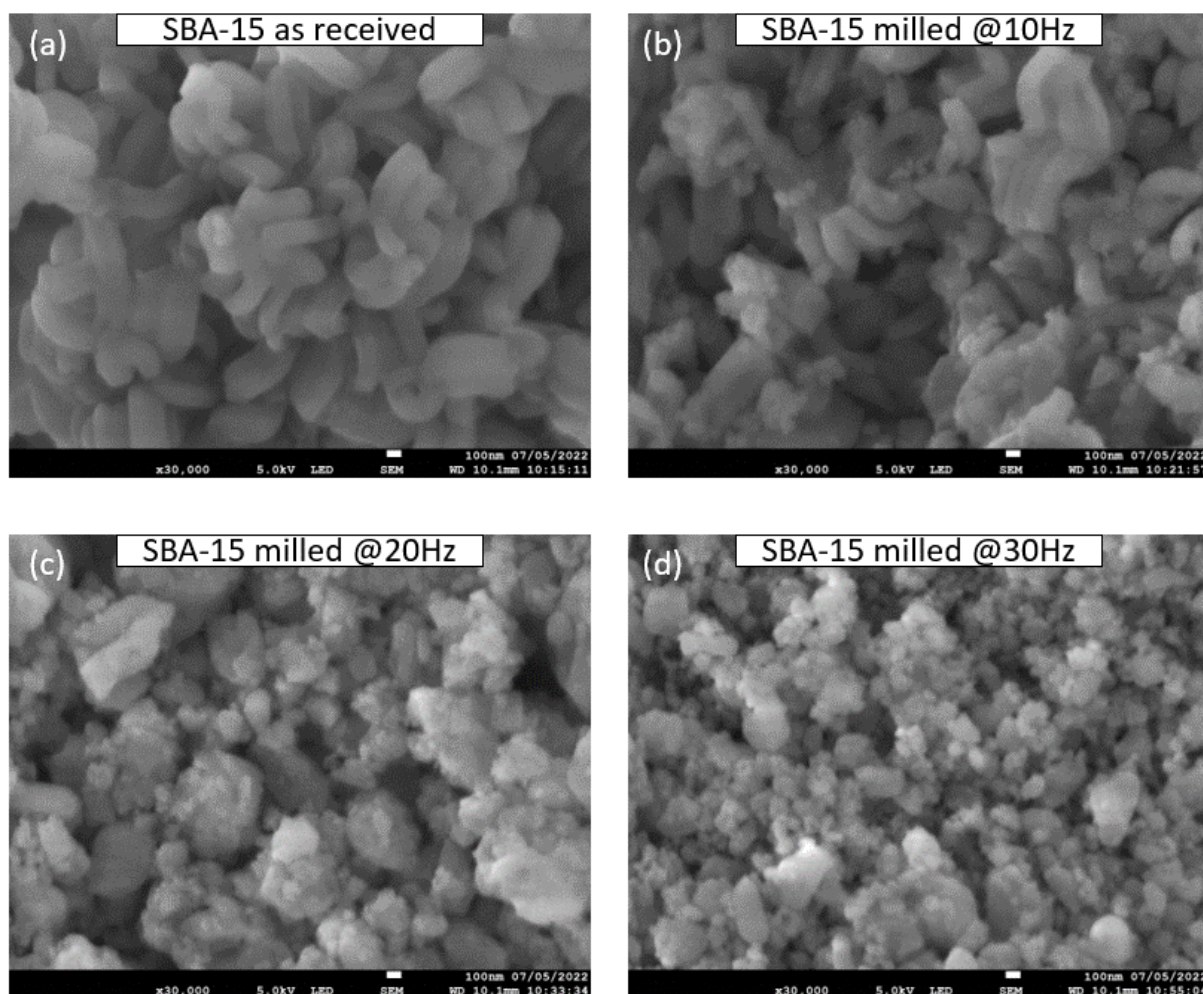


Figure 39: Analyse par microscopie électronique à balayage de: a) SBA-15, (b) SBA-15 après 30 min de broyage à 10 Hz, (c) SBA-15 après un broyage à 20 Hz et (d) SBA-15 après un broyage à 30 Hz.

La faible tension d'accélération utilisée lors de ces expériences de MEB ne permet pas l'application d'une méthode automatique afin de mesurer la taille des particules. Néanmoins, elle a été mesurée à l'aide d'une méthode basée sur le tracé manuel des particules. Cette méthode est décrite sur la Figure 40 pour un exemple d'échantillon (SBA-15 non broyé).

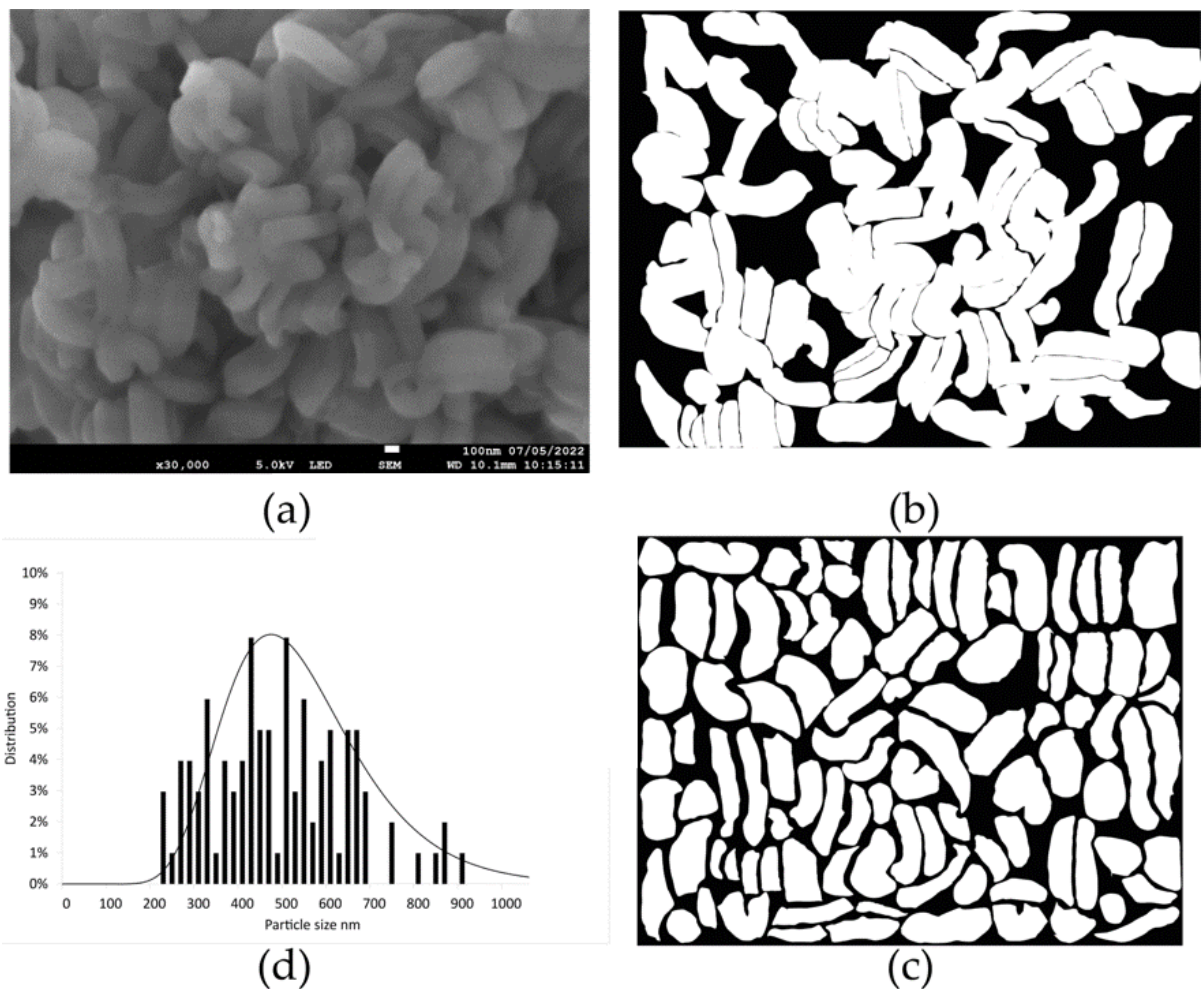


Figure 40: Méthodologie d'estimation de la taille des particules a) Cliché MEB des SBA-15, (b) Résultat du traçage des particules manuel (c) isolement des particules tracées préalablement (d) Distribution de la taille des particules.

En effet, les particules sont tracées, dans un premier temps, à la main comme le montre la Figure 40.b. Ces particules sont ensuite isolées les unes des autres (Figure 40.c). L'image obtenue est enfin traitée par un logiciel nommé *ImageJ* pour estimer la taille moyenne des particules (Figure 40.d). Cette opération a été appliquée de la même façon sur les 3 autres images pour évaluer la distribution de la taille des particules de l'ensemble des échantillons. Les résultats sont présentés sur la Figure 41.

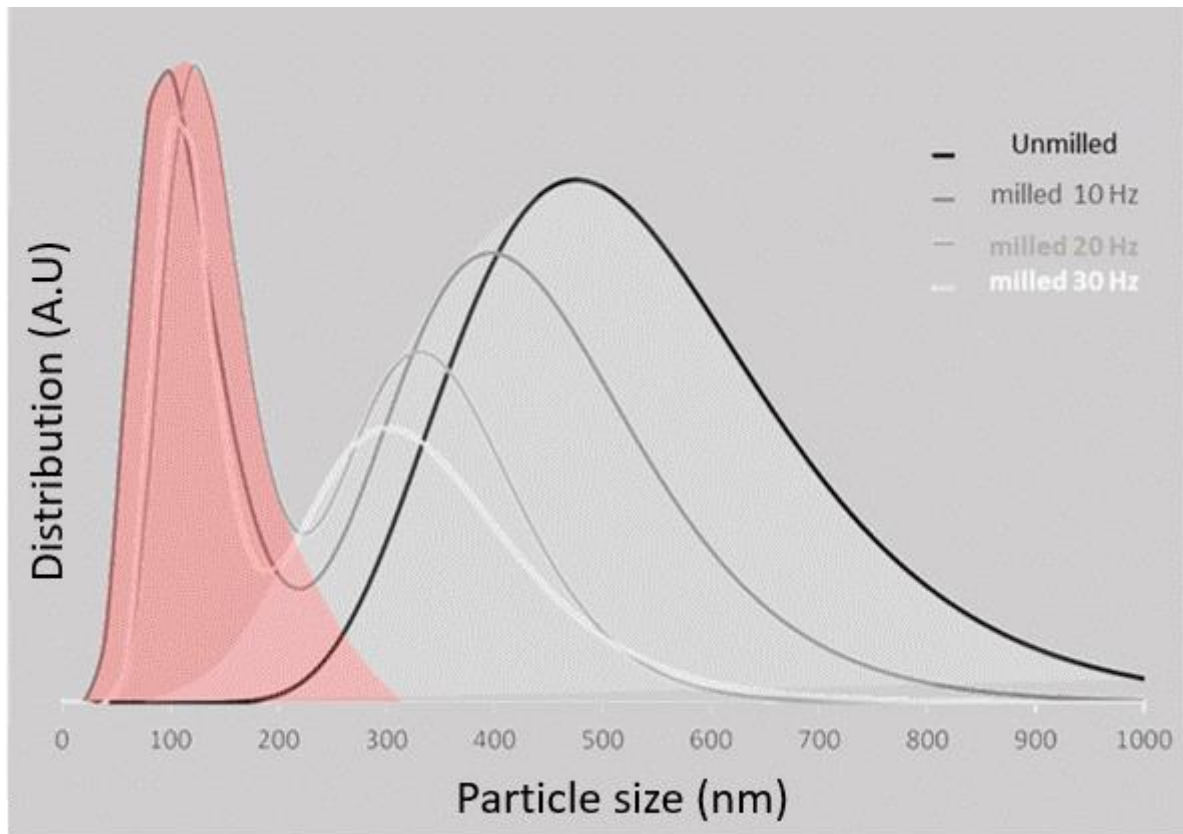


Figure 41: Évolution de la distribution des tailles des particules en variant la fréquence de broyage.

Pour les SBA-15 non broyés (la courbe en noire), nous observons une distribution de taille des particules centrée aux alentours de 480 nm. Cependant les courbes de distribution des particules des SBA-15 broyés présentent un caractère bimodal. En effet, si l'on prend par exemple le cas des SBA-15 broyés à 10 Hz, nous notons la présence de deux populations de taille des particules que l'on va appeler *petites particules* et *particules de taille plus importante*. Les particules de taille plus importante se situent aux alentours de 400 nm et les petites particules se trouvent à 90 nm.

Les effets très remarquables du broyage sur la taille des particules sont d'une part le passage d'une distribution unimodale pour les SBA-15 non broyés à des distributions bimodales pour les SBA-15 broyés, et d'autre part la réduction progressive de la taille des particules de taille importante avec l'augmentation de la fréquence de broyage. Pour bien illustrer cet effet, le tableau ci-dessous

regroupe la taille moyenne et les proportions des petites et des particules de taille plus importante de chaque échantillon.

Fréquence de broyage (Hz)	La taille des petites particules (nm)	La taille des particules de taille plus importante (nm)	Proportion des petites particules (%)	Proportion des particules de taille plus importante (%)
0	--	470 ± 165	0	100
10	95 ± 50	405 ± 135	20	80
20	125 ± 45	335 ± 100	50	50
30	110 ± 30	305 ± 115	65	35

Tableau 1: Évolution des proportions et des tailles des particules en fonction de la fréquence de broyage.

Plus la fréquence est élevée, plus la taille des particules de taille importante diminue. Cependant, la taille des petites particules reste presque constante et égale à environ 110 nm. Par ailleurs, plus la fréquence est élevée, plus la proportion de petites particules augmente aux dépens de la proportion des particules de taille importante.

En conclusion, les expériences en MEB ont permis de mettre en évidence la réduction progressive de la taille des particules avec l'intensité du broyage.

III.1.2 Impact du broyage sur la structure hexagonale des SBA-15.

Des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles, SAXS (Small Angle X-rays Scattering), ont été réalisées pour analyser les possibles déformations du réseau des canaux cylindriques subies lors du broyage. Les diagrammes sont présentés sur la Figure 42. Pour les trois échantillons, SBA-15, SBA-15 broyés à 30 Hz et SBA-15 broyés à 10 Hz, nous observons trois pics de diffraction. Il est reconnu que l'arrangement des canaux cylindriques forment une structure ordonnée bi-dimensionnelle en nid d'abeilles^{9,10}. Il y a absence de périodicité dans la direction des canaux qui sont de longueur variable. Le diagramme de diffraction du réseau hexagonal 2D de symétrie P6mm peut donc être indexé pour les trois premières raies comme indiqué sur la figure 4, c'est-à-dire : (10), (11) et (20). Un quatrième pic repéré par une étoile sur la Figure 42 résulte de la diffusion du Kapton qui a été utilisé pour fixer les échantillons sur le porte-échantillon.

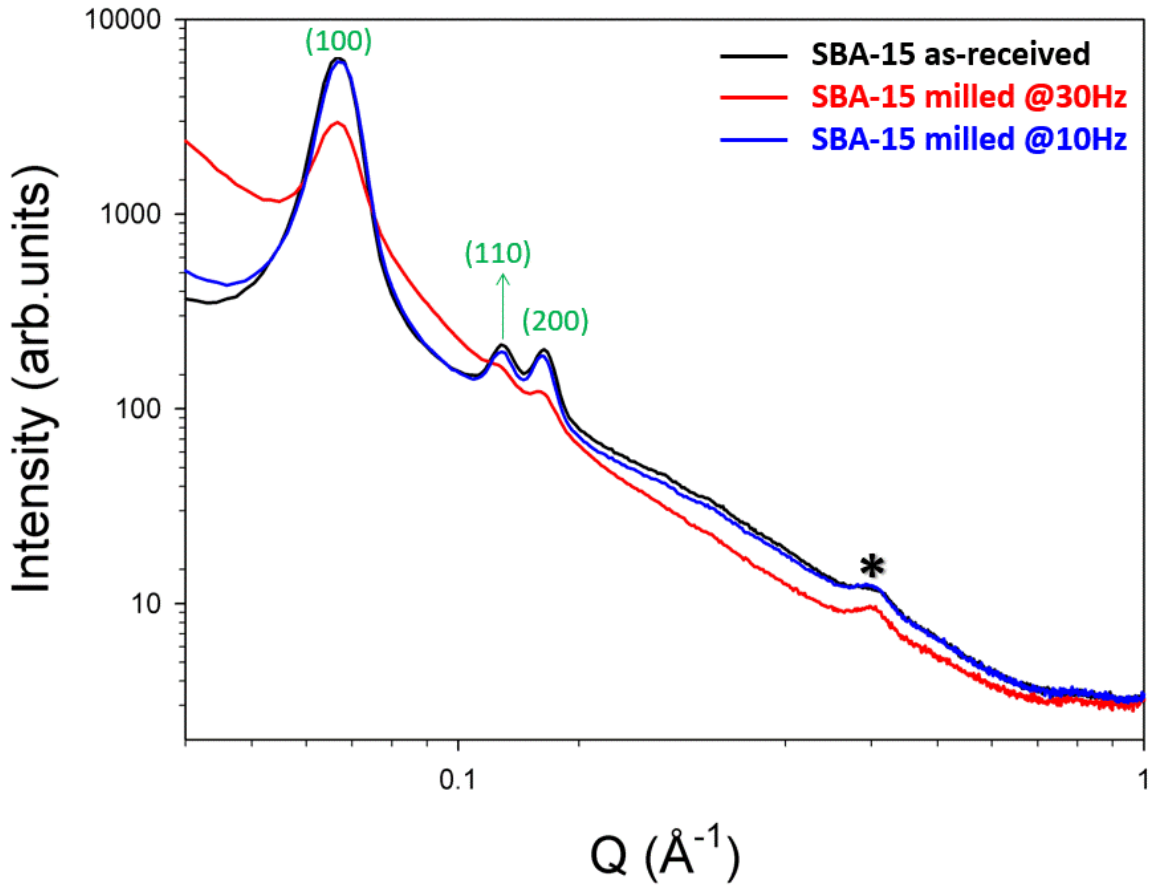


Figure 42: Diagramme des rayons X aux petits angles (SAXS).

Si l'on compare les trois courbes, nous remarquons que la position des pics de diffraction est la même pour les SBA-15 avant et après broyage. Cela montre que le paramètre de maille n'est pas modifié et que l'arrangement ordonné des canaux est préservé à l'issue du broyage comme récemment démontré à 30 Hz³.

Le paramètre de maille peut être calculé à partir de la position du pic de Bragg (10) et des relations :

$$\vec{a}_i \cdot \vec{a}_j^* = 2\pi\delta_{ij}$$

18

avec dans le cas d'une structure hexagonale:

$$\vec{a} \cdot \vec{a}^* = a \cdot a^* \cdot \cos \frac{\pi}{6}$$

19

Il vient alors la relation géométrique suivante pour une maille hexagonale 2D:

$$a = \frac{2}{\sqrt{3}} \cdot d_{10}$$

20

Le diamètre des pores, noté d_p , peut être calculé facilement à partir du paramètre de maille « a » et de l'épaisseur « e » des murs des SBA-15, comme le montre la Figure 43.

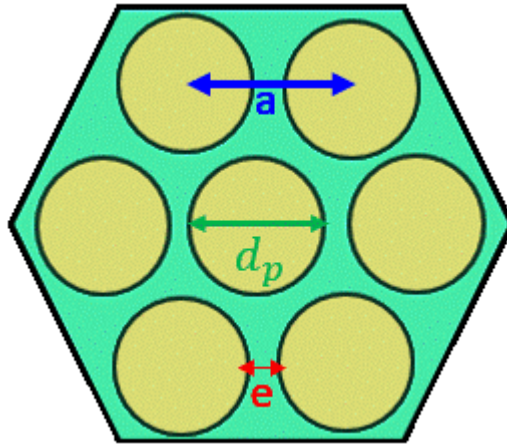


Figure 43: Vue du dessus des SBA-15. a est le paramètre de la maille hexagonale que forment les canaux cylindriques, d_p est le diamètre des pores et e est l'épaisseur des murs qui se trouvent entre les canaux.

Le paramètre de la maille a été de cette façon estimé à environ 10.75 nm. Ceci est cohérent dans la mesure où les matrices SBA-15 utilisées possèdent un diamètre de pore égal à environ 7 nm et une épaisseur des murs, calculée par physisorption, de l'ordre de 3 nm¹¹. La taille des pores n'est donc pas impactée par le broyage quelle que soit la fréquence. Ceci confirme de précédents résultats obtenus sur des matrices SBA-15 broyées à 30 Hz à partir d'expériences de diffusion des neutrons aux petits angles⁶.

Il est possible de tirer des informations sur les possibles déformations ou réductions de taille de particules induites par le broyage en analysant les largeurs de raies de Bragg. Un élargissement des raies de Bragg est clairement observable (sans traitement numérique) sur le diagramme RX enregistré sur une matrice ayant subi un broyage à 30 Hz. Le diagramme obtenu après broyage à 10 Hz est au contraire quasiment identique à celui obtenu sur les matrices mésoporeuses non broyées. Cette étude révèle donc que le broyage à 10 Hz des matrices mésoporeuses laisse totalement intacte l'arrangement 2D en nid d'abeilles des canaux cylindriques. L'élargissement des raies de Bragg observé sur les matrices broyées à 30 Hz peut être couplé avec l'observation d'une augmentation de l'intensité diffusée aux faibles valeurs de Q , inexistante sur les matrices broyées à 10 Hz. Cette corrélation a déjà été observée par diffusion neutronique⁶ et interprétée comme résultant de poussière de silice inhérente à la réduction de taille des particules. Ce travail montre une corroboration entre les deux types d'investigations de nature différente (MEB et RX), et l'intérêt d'effectuer le broyage à la fréquence de 10 Hz qui préserve totalement la structure ordonnée mésoporeuse.

Afin d'étudier l'impact de la fréquence de broyage sur le volume poreux des matrices de silice mésoporeuses, la physisorption a été utilisée. Cette technique largement utilisée pour caractériser les matériaux poreux permet également d'évaluer la distribution moyenne de la taille des pores.

Sur la Figure 44.a, les isothermes d'adsorption-désorption des SBA-15 non broyées (courbe noire), des SBA-15 broyées à 30 Hz (courbe en rouge) et des SBA-15 broyées à 10 Hz (courbe en bleu) sont présentées. Selon la classification IUPAC^{12,13}, les trois isothermes sont de type IV avec un hystérèse de type H1 pour les SBA-15 et les SBA-15 broyées à 10 Hz et un hystérèse de type H2 pour les SBA-15 broyées à 30 Hz. Cette différence de type d'hystérèse vient de la forme des deux branches d'adsorption et désorption. En effet, à l'inverse de l'hystérèse de type H2, l'hystérèse de type H1 est caractérisée par les deux

branches parfaitement parallèles. Le changement de type d'hystérèse d'une part et la forte diminution de la quantité adsorbée d'autre part pour les SBA-15 broyés à 30 Hz pourraient être dus à l'obstruction d'une partie des pores à l'issue du broyage mécanique, engendrant une distribution non uniforme de la taille des pores responsable de ce changement de régime sur l'isotherme d'adsorption-désorption. La distribution de la taille des matériaux mésoporeux peut être évaluée à l'aide de la méthode BJH (Barett, Joyner et Halenda). Cette méthode établit un lien entre les données thermodynamiques, l'isotherme d'adsorption-désorption et les données géométriques du solide notamment la taille des pores. Cette méthode a été appliquée sur les trois isothermes de sorption, les résultats sont présentés sur la Figure 44.b.

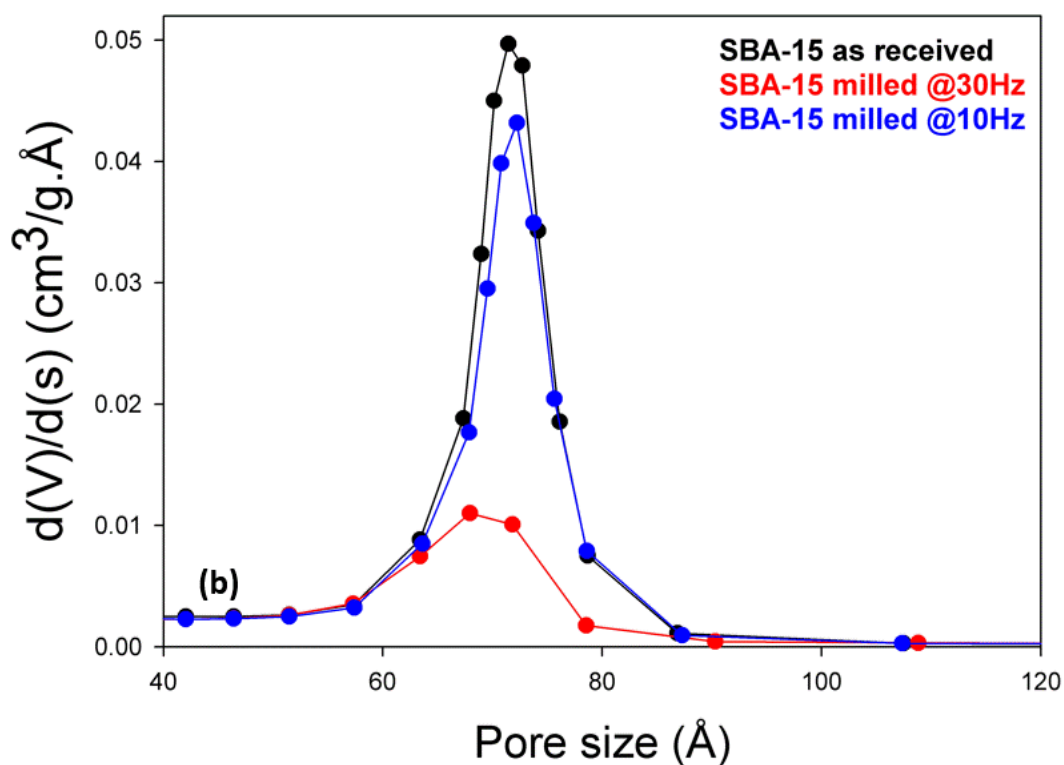
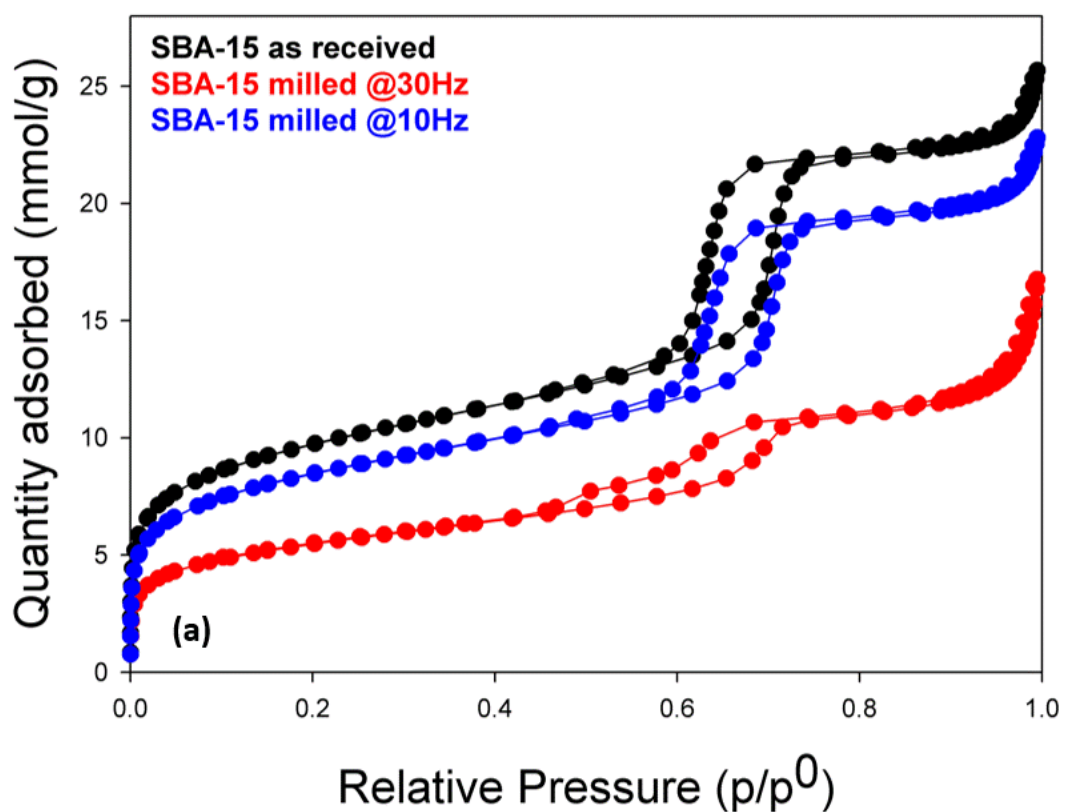


Figure 44: Caractérisation des matrices de silice mésoporeuses. (a) Isotherme adsorption-désorption N_2 des SBA-15, SBA-15 broyés à 30 Hz et des SBA-15 broyés à 10 Hz. (b) Distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH (Barrett, Joyner et Halenda).

La distribution de la taille des pores est uniforme dans le cas des SBA-15 et des SBA-15 broyés à 10 Hz. La taille des pores de ces deux échantillons est estimée à environ 72 Å. Cependant, pour les SBA-15 broyés à 30 Hz, la taille moyenne des pores se situe entre 66 et 70 Å.

Pour conclure cette partie, les expériences du MEB ont permis de mettre en évidence la réduction de la taille des particules progressive avec l'intensité du broyage. Cette réduction de la taille des particules a été observée également sur les résultats de diffusion des rayons X aux petits angles. La physisorption a permis de conclure sur la distribution de la taille des pores qui devient non – uniforme avec le broyage, mais aussi de mettre en évidence la réduction du volume poreux et donc l'obstruction d'une partie des pores à l'issue du broyage à 30 Hz, pratiquement négligeable lors d'un broyage à 10 Hz. Il est nécessaire de souligner que la poussière de silice résultant de la réduction de taille de particules obstrue les canaux uniquement en absence du matériau moléculaire à confiner⁶.

III.1.3 Manipulation de l'état physique de l'ibuprofène confiné par variation de la fréquence de broyage.

L'état physique des principes actifs pourrait représenter un paramètre important pour moduler la solubilité, dans la mesure où la différence de solubilité entre les états amorphe et cristallin est importante^{14,15}. Il est aussi reconnu que le broyage mécanique a pour conséquence directe la réduction de taille des cristallites^{16–18}. Considérant que l'intensité du broyage peut avoir un effet sur la réduction de taille de cristallites, il apparaît donc intéressant d'étudier l'influence de la fréquence de broyage sur l'état physique du matériau confiné. Pour cela, l'ibuprofène qui a fait l'objet de plusieurs études de confinement par spray-drying¹⁹, par solution²⁰, par fusion^{21,22} et par broyage^{3,4} a été choisi pour effectuer cette étude. La spectroscopie Raman à basses fréquences est une

technique très puissante pour sonder l'état physique des échantillons analysés, elle permet de détecter la signature de la matière amorphe, cristalline ou nanocristalline. Un autre avantage de cette technique est le signal de très faible intensité de la matrice de silice mésoporeuse par rapport au signal de l'ibuprofène, comme le montre la Figure 45, permettant de considérer le signal du composite comme celui de l'ibuprofène confiné. Il est important de préciser ici que les deux expériences ont été faites dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec la même intensité Laser et le même volume d'échantillon.

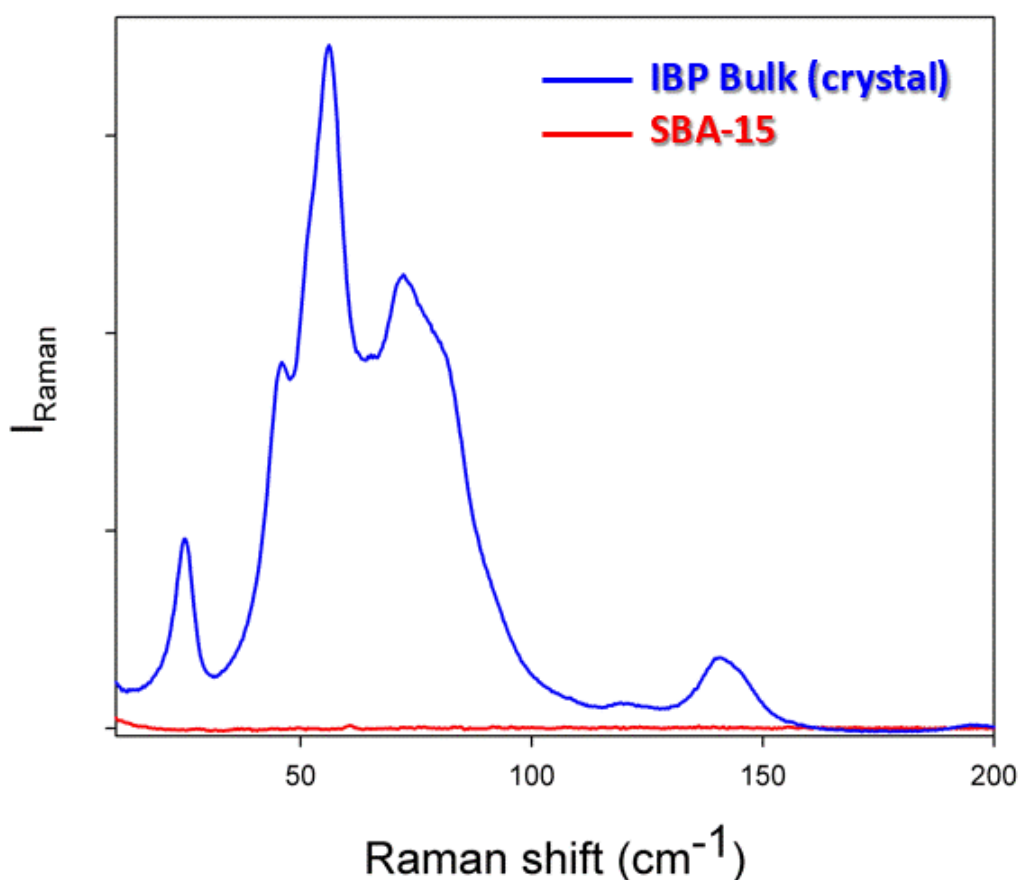


Figure 45: Intensité Raman de l'ibuprofène cristallin en bulk comparé à l'intensité Raman des SBA-15.

Avant d'étudier des systèmes confinés, il est important, dans un premier temps, d'analyser l'ibuprofène en bulk avant et après broyage. Les spectres Raman basses fréquences de l'ibuprofène en bulk, de l'ibuprofène broyé à 10 Hz et de l'ibuprofène broyé à 30 Hz, sont présentés en intensité réduite I_r sur la Figure 46.a. Les trois spectres présentent des bandes intenses qui

correspondent aux vibrations du réseau (phonons) et qui représentent donc la signature d'une phase cristalline, au même titre que les raies de Bragg dans un diagramme RX. La comparaison de ces trois spectres montre un élargissement des phonons pour les échantillons broyés. Cet élargissement correspond à la réduction de la taille ou/et à la déformation des cristallites à l'issue du broyage. La Figure 46.b présente la dépendance en température de l'intensité quasi-élastique I_{QES} . Les points de ces courbes ont été calculés à partir de l'intégration de l'intensité réduite sur le domaine $10 - 30 \text{ cm}^{-1}$ où sa contribution au spectre est prépondérante devant celle des phonons (Chapitre II). L'intégration a été réalisée sur chaque spectre collecté au cours des rampes de chauffage à $1^\circ\text{C}/\text{min}$ pour chaque échantillon. La courbe $I_{QES}(T)$ correspondant à la chauffe de l'ibuprofène montre une forte discontinuité et qu'un plateau est atteint à la température de 76°C , température à laquelle l'ibuprofène fond conformément à la littérature²³.

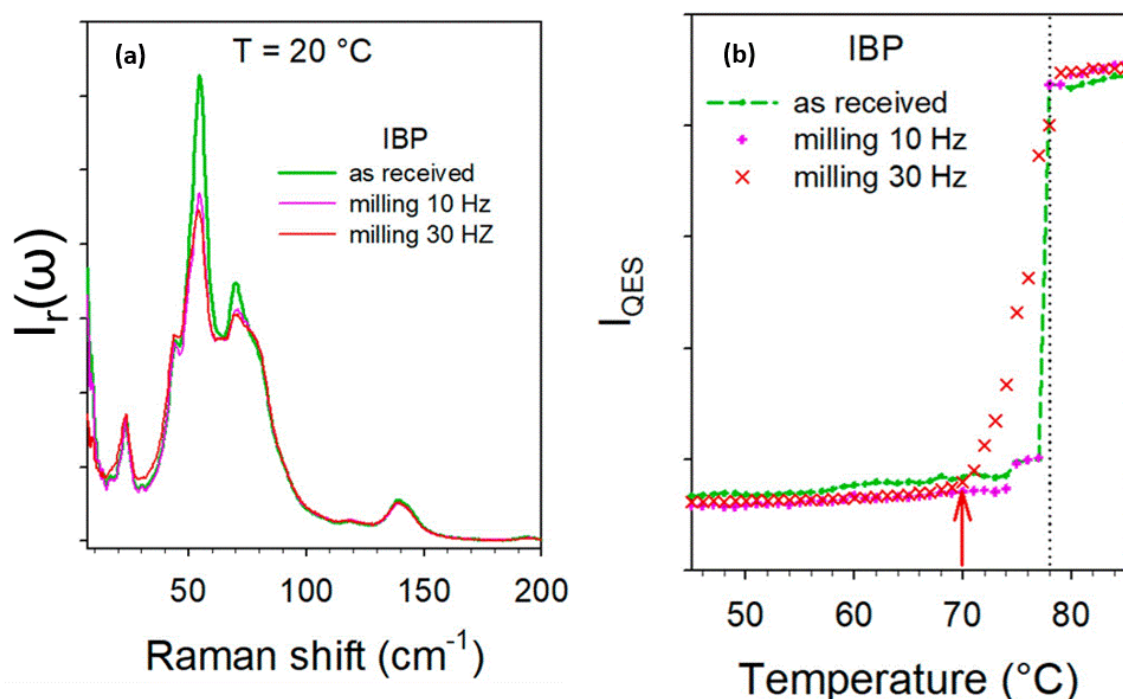


Figure 46: Influence du broyage sur l'état physique de l'ibuprofène. a) Comparaison entre les spectres de l'ibuprofène, de l'ibuprofène broyé à 10 Hz et de l'ibuprofène broyé à 30 Hz. b) Les courbes IQES en fonction de la température des trois échantillons.

La courbe $I_{QES}(T)$ correspondant à l'ibuprofène broyé à 10 Hz est présentée sur la Figure 46.b. L'impact d'un broyage à 10 Hz sur la température de fusion du cristal est dans ce cas quasiment indétectable. À l'inverse, l'augmentation de I_{QES} est plus étalée et débute à une température plus basse ($\sim 70^\circ\text{C}$) montrant une fusion plus étalée liée à une distribution de taille significativement plus large que pour les deux autres échantillons.

Ces résultats montrent donc que le broyage induit une réduction significative de la taille des cristallites uniquement pour une fréquence de broyage de 30 Hz. Cette étude pourrait donc indiquer que l'état physique de l'ibuprofène confiné pourrait être impacté par la fréquence de broyage.

Pour étudier le possible impact de la fréquence de broyage sur l'état physique de l'ibuprofène confiné, nous avons choisi de broyer 35% en masse d'ibuprofène avec 65% en masse des SBA-15. Ce choix de ce composite, qui sera noté 35%IBP:SBA-15(Fréquence de broyage), vient simplement du fait qu'une étude préliminaire a montré que le taux de chargement optimal dans les SBA-15 avec un broyage à 30 Hz est de l'ordre de 37% d'ibuprofène³. L'idée a donc été de se placer juste en dessous de cette valeur, pour assurer un confinement total de l'ibuprofène. Les susceptibilités Raman obtenues à partir des I_r des états cristallin et amorphe de l'ibuprofène en bulk sont présentées sur la Figure 47.a. Cette figure montre les phonons pour la forme cristalline et un continuum pour la forme amorphe induit par le désordre présent dans cet échantillon. Ces deux spectres serviront de référence pour évaluer l'état physique de l'ibuprofène confiné en fonction de la fréquence de broyage (Figure 47.b).

Une étude précédente³, a montré qu'un broyage pendant 30 minutes à 30 Hz permet de confiner et stabiliser jusqu'à 37% en masse d'ibuprofène dans un état amorphe au sein des SBA-15 ($d_p = 7$ nm). Il est important de rappeler ici que la température de transition vitreuse de l'ibuprofène est de l'ordre de -50°C ²³. De ce fait, un broyage à la température ambiante ne permet pas

d'amorphiser l'ibuprofène, comme montré par les spectres collectés sur l'ibuprofène broyé seul à différentes fréquences (Figure 46.a). Par conséquent, la présence de la matière amorphe dans les composites a constitué une preuve de confinement dans les SBA-15 ($d_p = 7$ nm).

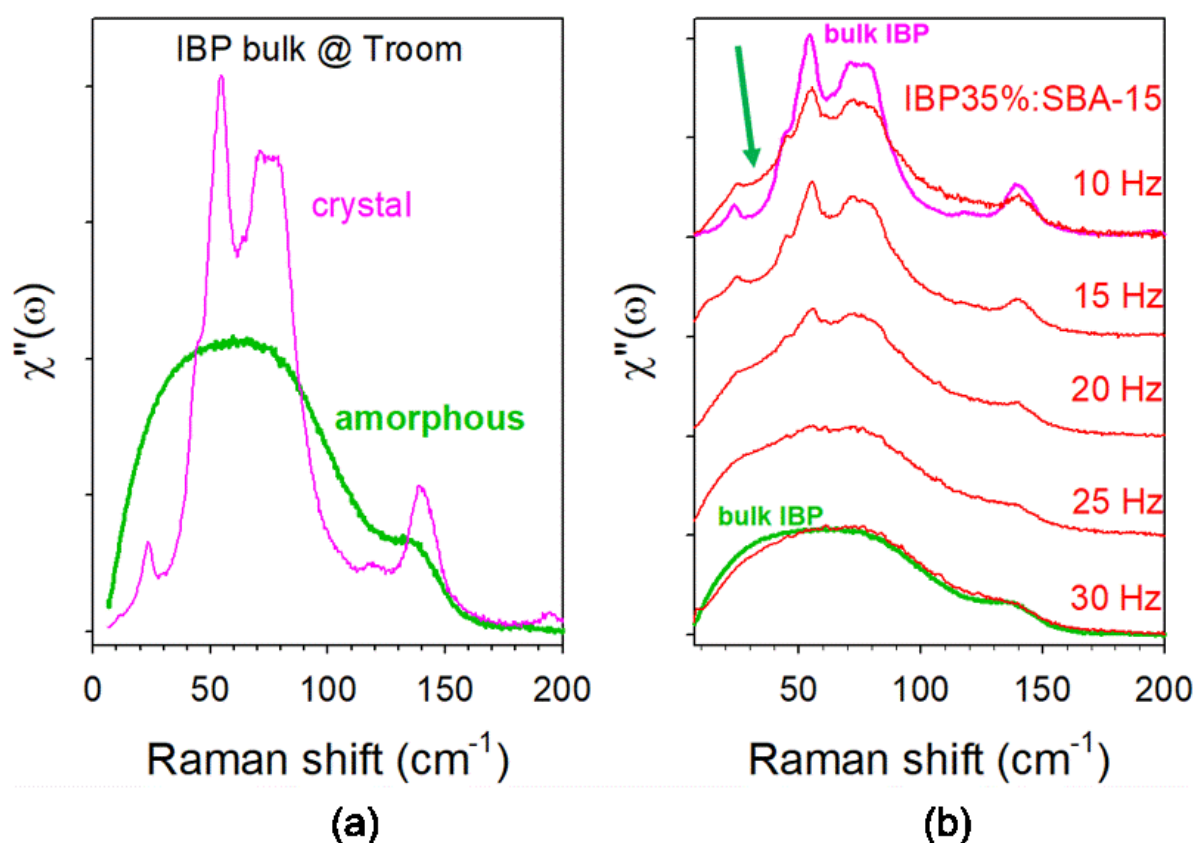


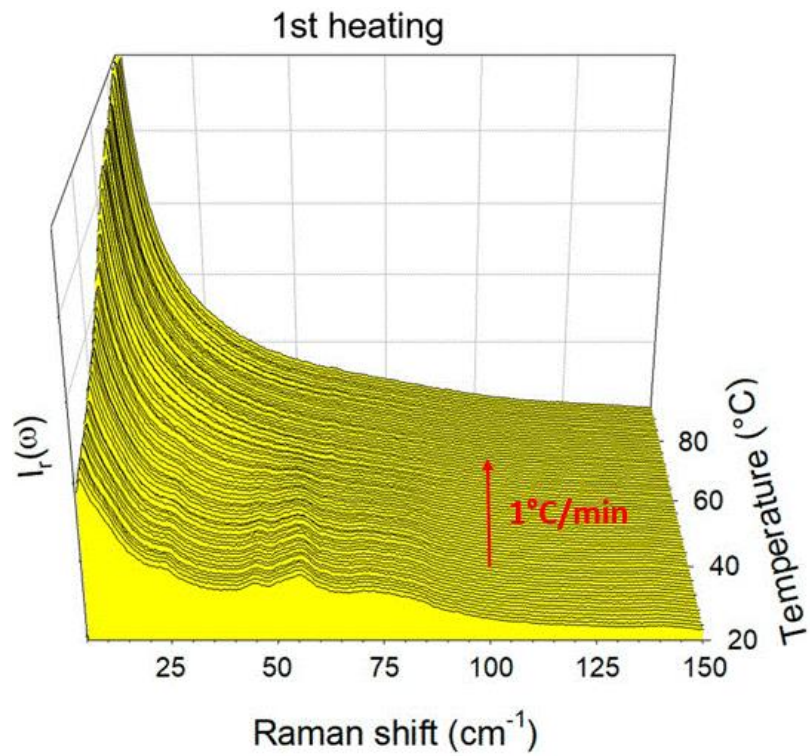
Figure 47: Susceptibilité Raman a) de l'ibuprofène dans sa forme cristalline et l'ibuprofène dans sa forme amorphe. b) des composites broyés à différentes fréquences de broyage.

Les spectres, exprimés en susceptibilité Raman, de l'ibuprofène chargé à différentes fréquences de broyage sont présentés sur la Figure 47.b. Les spectres de l'ibuprofène cristallin et de l'ibuprofène amorphe servent de référence. Comme cela a déjà pu être montré³, le broyage à 30 Hz a permis de charger 35% d'ibuprofène dans un état amorphe. Cet état amorphe confiné est sensiblement différent de l'état amorphe en grand volume. Ceci a été interprété par des organisations moléculaires différentes induites par les interactions de

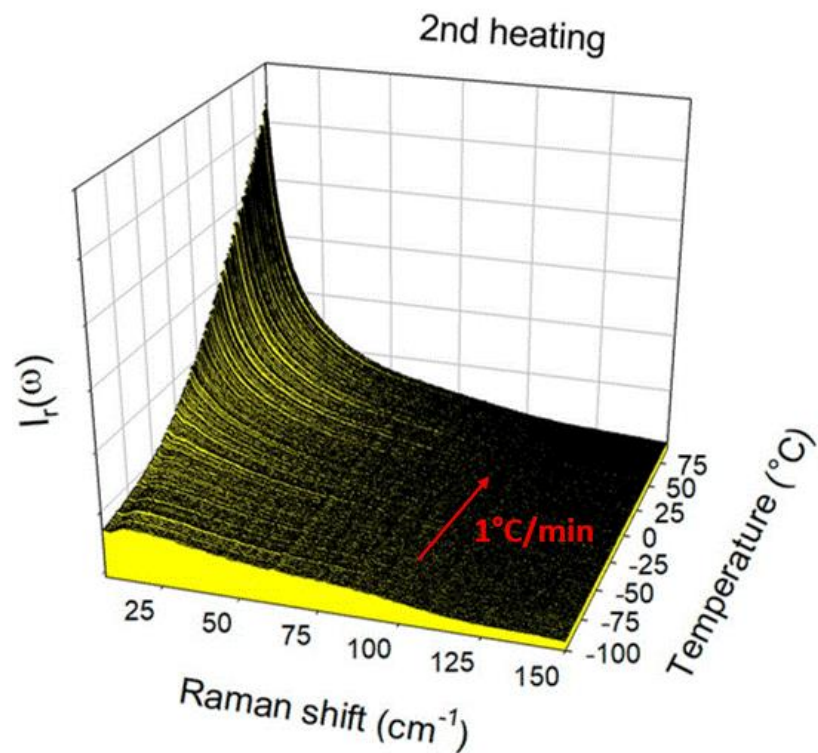
l'ibuprofène avec les groupements -OH de la surface interne des pores. Le composite broyé à 25 Hz se trouve dans un état quasiment amorphe puisque le spectre correspondant ne présente que quelques légères traces de structuration. À partir et en dessous de 20 Hz, nous observons l'émergence des pics de phonons indiquant la présence des nanocristallites. Le spectre du composite obtenu par broyage à 10 Hz, montre des pics de phonon bien définis, indiquant un haut degré de cristallisation. Il est à noter également qu'en dessous de 40 cm^{-1} , l'intensité repérée par une flèche sur la Figure 47.b est relativement plus élevée. Ceci indique la présence de la matière amorphe dans un domaine spectral ou la contribution vibrationnelle de la matière cristalline est faible.

Afin de déterminer si l'intégralité d'ibuprofène se trouve à l'intérieur des pores deux rampes en température sont effectuées. La première allant de la température ambiante jusqu'à 90°C sert à fondre les nanocristaux. Après refroidissement à -100°C ($\ll T_g$), une seconde chauffe jusqu'à 80°C est effectuée pour détecter la cristallisation froide, systématiquement observée lorsque la température de l'ibuprofène est portée dans le domaine de nucléation et de croissance²³. L'absence de recristallisation lors de cette seconde chauffe indique l'absence d'ibuprofène à l'extérieur des pores, dans la mesure où il est considéré que la nucléation est inhibée par une taille de pore plus petite que la taille critique du noyau requise pour sa stabilité.

La Figure 48.a présente les spectres Raman, lors d'une chauffe allant de la température ambiante jusqu'à 90°C à une vitesse de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) fraîchement préparé. Cette figure montre des pics de phonon, situés entre 20 et 100 cm^{-1} , sur les spectres du composite. Ces pics de phonon sont visibles dans une gamme de température allant de 20 à environ 40°C , indiquant la présence des nanocristaux. À partir de 40 et jusqu'à 80°C , nous observons la disparition progressive de ces phonons indiquant la fusion des nanocristaux.



(a)



(b)

Figure 48 : Spectres Raman à basses fréquences de 35%IBP:SBA-15 co-broyé à 10 Hz collectés lors d'une chauffe à 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (a) Première chauffe allant de la température ambiante jusqu'à 100 $^{\circ}\text{C}$. (b) Deuxième chauffe allant de -100 jusqu'à 80 $^{\circ}\text{C}$.

Cette large plage de température de fusion reflète une large distribution de taille de cristallites et une très faible stabilité des plus petits nanocristaux.

Le composite a ensuite été refroidi jusqu'à $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ et a été chauffé une nouvelle fois à la même vitesse que la première rampe. Les spectres collectés pendant cette seconde chauffe sont tracés sur la Figure 48.b. Aucune trace de phonon n'a été détectée dans ces spectres. Pour bien visualiser le comportement du composite pendant la seconde chauffe, sur la Figure 49, la dépendance en température de I_{QES} est présentée. L' $I_{QES}(T)$ de l'ibuprofène vitreux, obtenu par trempe de l'état liquide, est également présentée et sert comme témoin pour marquer les domaines de recristallisation et de fusion des formes I et II en bulk.

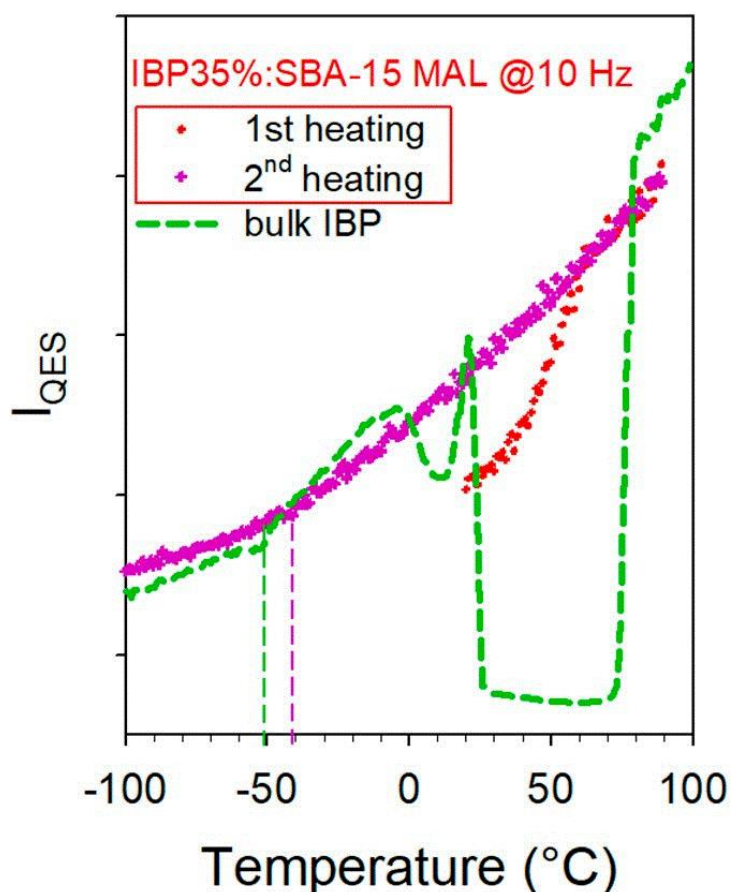


Figure 49 : Courbes $I_{QES}(T)$ de l'ibuprofène vitreux obtenu par trempe de l'état liquide lors de la seconde chauffe, et du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) lors de la première puis seconde chauffe. Les lignes en pointillées indiquent les températures de la transition vitreuse.

La courbe $I_{QES}(T)$ de l'ibuprofène vitreux montre un changement de pente à -50 °C repéré par une ligne verte en pointillé sur la Figure 49. Ce changement de pente de $I_{QES}(T)$ est caractéristique de la transition vitreuse. À la température de 10 °C, nous observons une chute de $I_{QES}(T)$ indiquant la recristallisation vers la forme II qui fond ensuite aux environs de 17 °C. Il s'en suit directement une deuxième chute de $I_{QES}(T)$ correspondant à la recristallisation vers la forme I. Cette forme I fond ensuite vers 75 °C. L' I_{QES} qui correspond au premier chauffage du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) est supérieure à $I_{QES}(T)$ de l'ibuprofène cristallin (forme commerciale) en bulk. Ceci est dû principalement à la présence de la matière amorphe coexistant avec les nanocristaux de la forme stable dans le composite. La fusion de ces nanocristaux est observée dès le début de la chauffe et s'achève aux alentours de 60 °C, c'est-à-dire à 15 °C en dessous de la température de fusion de l'ibuprofène en bulk. Cette différence de température de fusion montre que les nanocristaux sont de très petite taille. Au second chauffage, le changement de pente notifiant la transition vitreuse est observée vers -40 °C, ensuite aucune recristallisation n'est détectée. Ceci montre que les nanocristaux sont bien localisés à l'intérieur des pores, dans la mesure où, si des nanocristaux se trouvaient à l'extérieur des pores, une recristallisation aurait dû être observée lors de la seconde chauffe.

Le degré de cristallisation des composites (35%IBP:SBA-15) préparés à différentes fréquences de broyage a été calculé par une méthode décrite dans le chapitre II. Cette méthode a été utilisée pour analyser le processus de cristallisation de l'indométhacine²⁴, ainsi que pour évaluer le taux de transformation de la phase I en phase II dans la caféine¹⁸. Les résultats sont groupés sur le tableau ci-dessous.

	30 Hz	25 Hz	20 Hz	15 Hz	10 Hz
SBA-15	0%	5%	19%	39%	42%

Tableau 2: Degré de cristallinité de l'ibuprofène dans les composites (35%IBP:SBA-15) préparés à différentes fréquences de broyage.

Cette méthode de calcul a permis de montrer que l'intensité du broyage a un lien direct avec le degré de cristallinité. Plus le broyage est intense, plus le degré de cristallinité est faible et inversement.

Afin d'étudier la distribution de la fraction cristalline, une cartographie par spectroscopie Raman dans le domaine spectral correspondant à l'empreinte de la conformation moléculaire (800 à 1800 cm^{-1}) a été réalisée. Cette cartographie a été effectuée à l'aide d'un objectif de grossissement $\times 50$ permettant d'analyser un volume d'échantillon d'environ quelques centaines de μm^3 . Dans cette gamme les spectres des états amorphe et cristallin se différencient clairement dans la région $1500 - 1750\text{ cm}^{-1}$. Seule cette région a été analysée par imagerie Raman. Une surface de $46 \times 46\text{ }\mu\text{m}^2$ du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) a été cartographiée et analysée par un traitement DCLS (décrit dans le chapitre II). Afin d'appliquer ce traitement, il est nécessaire d'avoir les spectres de référence des différents composants de l'échantillon, en l'occurrence, l'ibuprofène à l'état cristallin et l'ibuprofène à l'état amorphe (liquide sous-refroidi), collectés à la même température (T_{amb}) que celle correspondant à la cartographie. On rappelle ici que le traitement DCLS permet d'ajuster chaque spectre de la cartographie à partir d'une combinaison linéaire de spectres des composants, par la méthode des moindres carrés (Chapitre II).

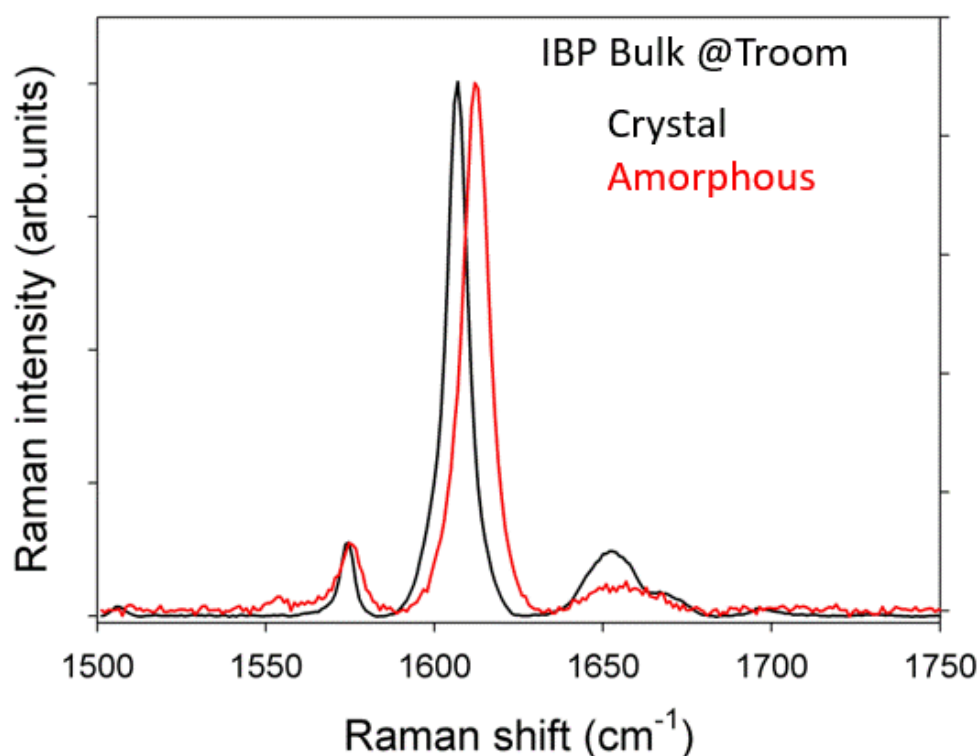


Figure 50: Spectres Raman aux moyennes fréquences de l'ibuprofène à l'état cristallin en noir et de l'ibuprofène sous-refroidi (amorphe) en rouge.

Le spectre, représenté en courbe noire sur la Figure 50, de l'ibuprofène cristallin présente un pic intense aux alentours de 1607 cm^{-1} . Cette bande attribuée aux vibrations des liaisons C=C de l'ibuprofène^{25,26} est décalée vers les hautes fréquences pour l'ibuprofène amorphe et se trouve à environ 1612 cm^{-1} . La position de ce pic permet donc de distinguer l'état physique (cristallin ou amorphe) de l'ibuprofène. Par conséquent, le traitement numérique de la cartographie va reposer essentiellement sur la position de cette bande. L'image obtenue en fonction du degré de cristallinité est présentée sur la Figure 51.a. Le traitement DCLS effectué sur le logiciel *wire* (version 5.4) a permis non seulement de mettre en évidence la distribution hétérogène de la matière cristalline dans le composite mais aussi de calculer la fraction cristalline qui par cette méthode a été estimée à 41%. Ce résultat est cohérent avec le degré de cristallinité du composite (35%IBP:SBA-15(10Hz)) calculé à partir des spectres à basses fréquences (Tableau 2).

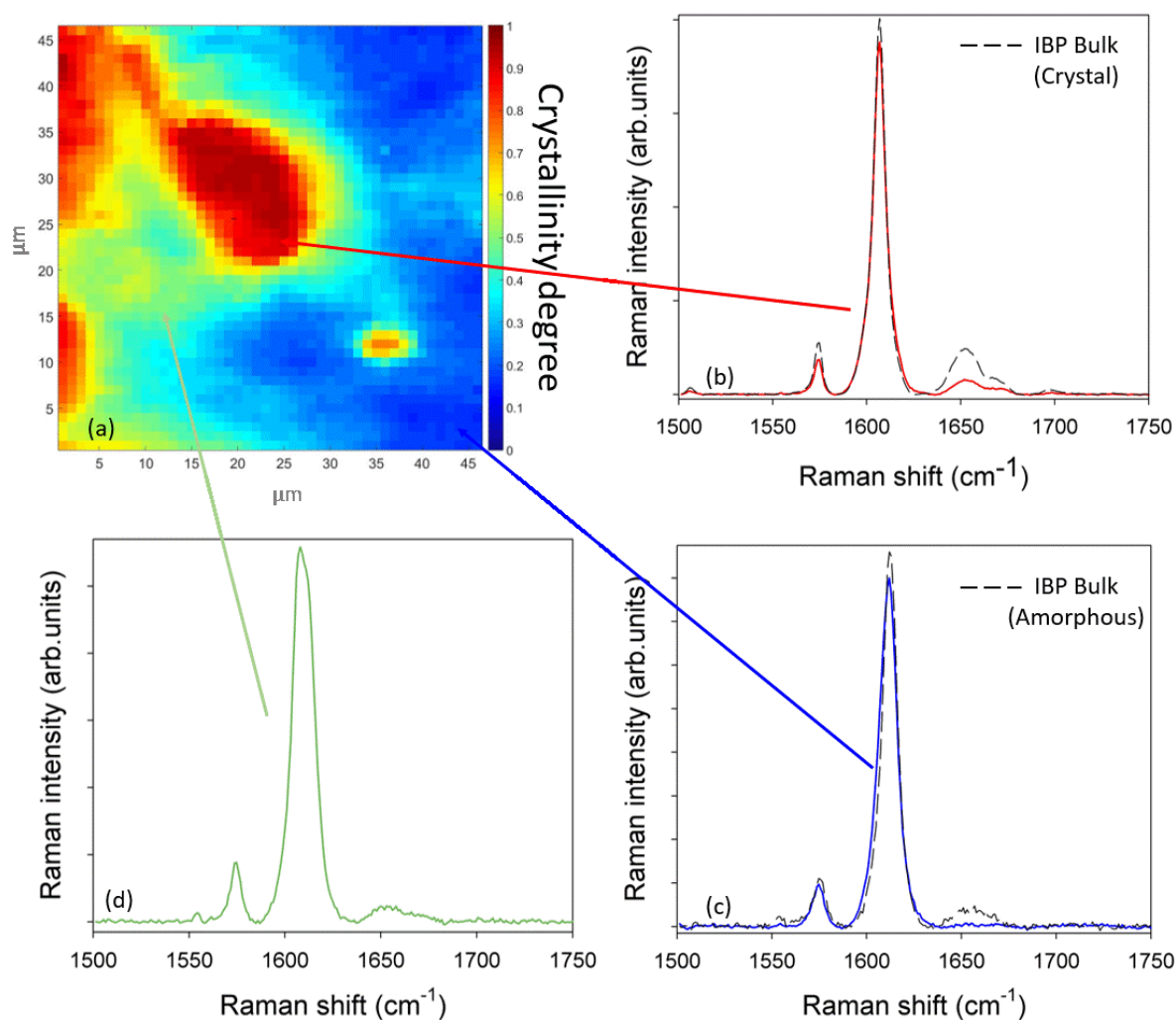


Figure 51: Analyse de la cartographie Raman à moyennes fréquences du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz). a) image obtenue avec un traitement DCLS b) spectre correspondant à la zone rouge à haut degré de cristallinité c) spectre correspondant à la zone bleue à faible degré de cristallinité et d) spectre correspondant à la zone verte à un degré de cristallinité intermédiaire

L'image sur la Figure 51.a montre des zones en rouge à haut degré de cristallinité. Un spectre a été sélectionné de cette zone et a été tracé sur la Figure 51.b, nous remarquons la présence du pic intense caractéristique de l'ibuprofène à l'état cristallin. Les zones en bleu représentent un faible degré de cristallinité, dans la mesure où le spectre correspondant se caractérise par la bande intense qu'on retrouve sur le spectre de l'ibuprofène à l'état amorphe. Nous observons également des zones en vert à degré de cristallinité intermédiaire. Le spectre correspondant présente une bande intense large due à la contribution du cristal qui s'ajoute à celle de l'amorphe et forme donc un pic

plus large. Il est important de rappeler ici que le spectromètre Raman à basses fréquences permet d'effectuer des analyses en mode macroscopique, tandis que la zone analysée en cartographie à moyennes fréquences ne fait que $46 \times 46 \mu\text{m}^2$. Bien que le taux de cristallinité obtenu par cartographie est similaire à celui obtenu à basses fréquences, les résultats de la cartographie ne peuvent pas être généralisés à l'ensemble de l'échantillon.

Dans cette partie, nous avons étudié l'impact de la fréquence de broyage sur l'état physique de l'ibuprofène. Nous avons pu montrer par spectroscopie Raman à basses fréquences la dépendance de l'état physique de l'ibuprofène à la fréquence de broyage. À partir des spectres à basses fréquences, et avec la méthode décrite dans le chapitre II, nous avons déterminé le degré de cristallinité dans différents types de composites préparés à différentes fréquences de broyage allant de 10 à 30 Hz. Nous avons également effectué une cartographie à moyennes fréquences sur le 35%IBP:SBA-15(10Hz). Cette cartographie a mis en évidence la présence de l'ibuprofène cristallin et de l'ibuprofène amorphe répartis d'une façon hétérogène dans le composé. Bien que le volume analysé à moyenne fréquence soit petit par rapport au volume analysé à basse fréquence, le traitement DCLS de la cartographie a permis d'estimer la fraction cristalline présente dans le composite qui est de l'ordre de 41% ce qui est très proche de l'estimation obtenue à partir des spectres à basse fréquence. Nous nous intéressons dans ce qui suit au taux de chargement optimal, de l'ibuprofène dans les SBA-15, qu'il est possible d'atteindre avec un broyage à 10 Hz.

III.1.4 Taux de chargement optimal

La limite de chargement d'un broyage à 30 Hz de l'ibuprofène dans les SBA-15 ($d_p = 7 \text{ nm}$) a été déterminée dans une étude précédente et a été fixée à 37% en masse de l'ibuprofène³. Le but de cette partie sera d'étudier l'impact de cette fréquence de broyage sur la capacité de chargement de la méthode dans la mesure où la fréquence de broyage impacte directement le volume poreux.

Par conséquent, la fréquence de broyage pourrait éventuellement modifier la capacité de chargement.

Pour cela, une série d'expériences a été réalisée en variant la concentration de l'ibuprofène de 35 à 45% en masse. L'analyse des composites lors de la seconde chauffe permet d'observer une recristallisation du principe actif qui se trouve à l'extérieur des pores. Cette étude en température des composites a montré qu'aucune recristallisation n'est observée lors de la seconde chauffe des composites avec des concentrations d'ibuprofène allant de 35 à 42%. La Figure 52.a montre les spectres Raman à basse fréquence enregistrés lors d'une rampe en température de -100 à 80°C du composite 42%IBP:SBA-15(10Hz). Aucune trace de recristallisation n'est observée dans cette gamme de température. À l'inverse, les spectres de la seconde chauffe du composite 43%IBP:SBA-15(10Hz) présentée sur la Figure 52.b montrent des structurations accompagnées d'une légère diminution de l' I_{QES} , signatures d'une recristallisation détectée vers 25 °C. La recristallisation de l'ibuprofène lors de la seconde chauffe de ce composite montre bien qu'une partie d'ibuprofène se trouve à l'extérieur des pores. Nous pouvons donc en conclure que le broyage à 10 Hz permet de confiner 42% d'ibuprofène. Ce taux maximal de chargement est légèrement supérieur à celui obtenu avec un broyage de 30 Hz (37%)³. Ce résultat peut être interprété par la réduction du volume poreux qui est moins importante après broyage à 10 Hz (Figure 44). Par conséquent, la fréquence de broyage peut être considéré comme un paramètre qui impacte de manière assez significative (>10%) la capacité de chargement des SBA-15. Des analyses similaires devront être menées sur d'autres principes actifs pour que ce résultat puisse être généralisé.

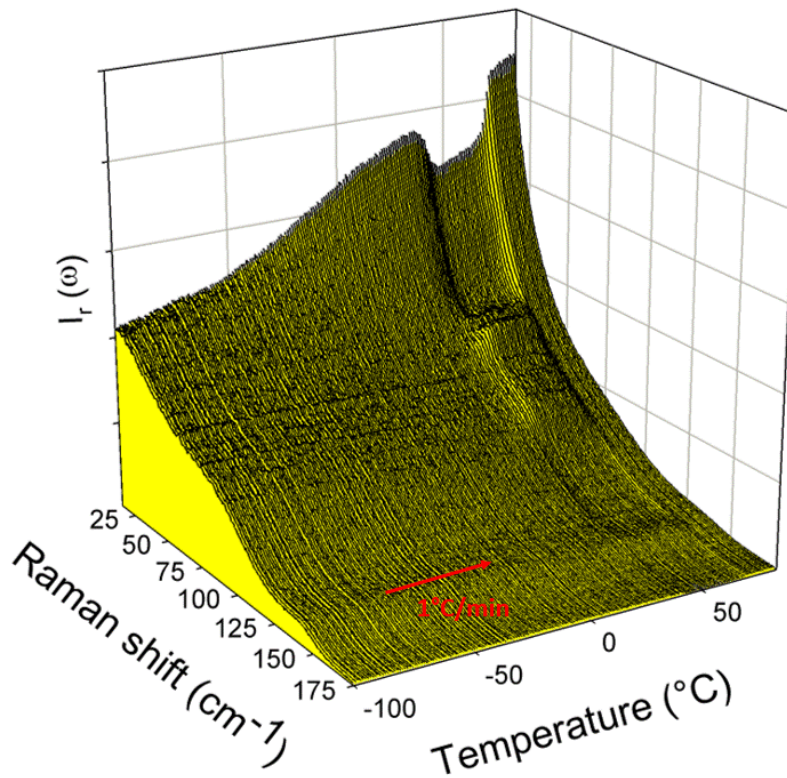
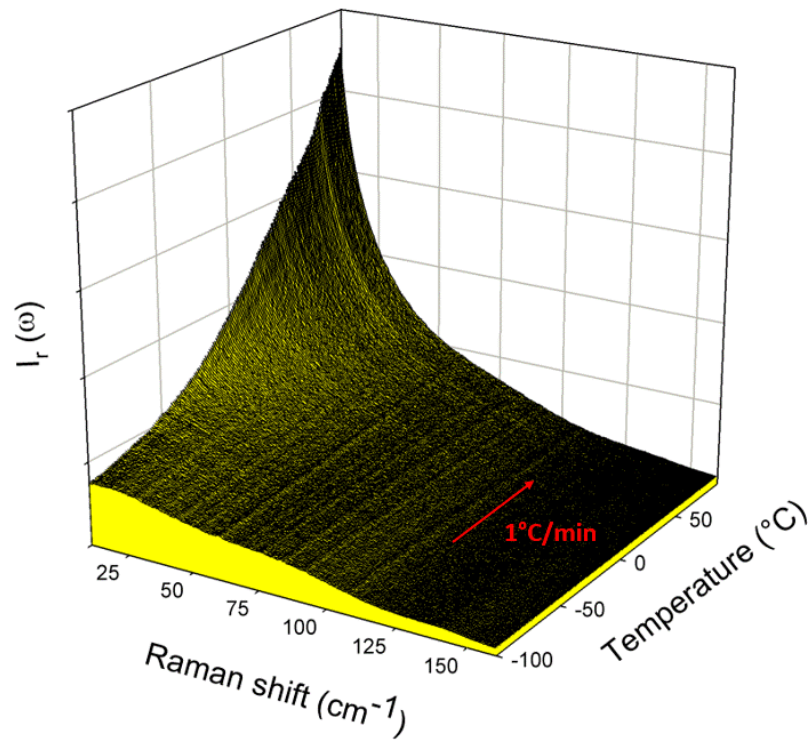


Figure 52: Spectres Raman de la seconde chauffe des composites (a) 42%IBP:SBA-15(10Hz) et (b) 43%IBP:SBA-15(10Hz).

III.2. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu montrer par MEB et par physisorption, que le broyage à 30 Hz, utilisé jusque-là lors du chargement par broyage, réduit considérablement la taille des particules mais ne modifie que peu la taille des pores, contrairement au broyage à 10 Hz qui préserve relativement la taille des particules, et ne modifie pas la taille des pores. Le volume poreux a été également évalué pour les SBA-15 broyés aux deux fréquences de broyage. Celui-ci est grandement diminué à l'issue d'un broyage à 30 Hz et préservé lors d'un broyage à 10 Hz. Cela induit une légère augmentation du taux maximal de chargement de l'ibuprofène lors d'un broyage à 10 Hz. (42%IBP avec un broyage à 10 Hz contre 37%IBP à 30 Hz). L'étude par spectroscopie Raman à basses et moyennes fréquences a mis en évidence la dépendance de l'état physique de l'ibuprofène confiné à la fréquence de broyage. Il a été montré qu'un broyage à 10 Hz permet de confiner jusqu'à 42% d'ibuprofène sous forme d'un mélange d'état amorphe et état nanocristallin coexistant à l'intérieur des pores. Cette étude a permis également d'évaluer le taux de cristallinité en fonction de la fréquence de broyage et a montré que plus la fréquence de broyage est faible, plus le taux de cristallinité est important. La fréquence de broyage pourrait donc être un paramètre qui modifie les profils de libération. Dans ce contexte, la modification de la chimie de surface des pores a fait partie des voies explorées dans cette thèse. En effet, la fonctionnalisation des matrices hôtes consiste à renforcer les interactions du principe actif avec les pores et prolonger ainsi sa libération. Dans le chapitre suivant, la fonctionnalisation des SBA-15 par un groupement amine et son impact sur l'état physique de l'ibuprofène confiné seront étudiés.

Références

1. Kanaujia P, Poovizhi P, Ng WK, Tan RBH. Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs. *Powder Technology*. 2015;285:2-15. doi:10.1016/j.powtec.2015.05.012
2. Peltonen L, Strachan CJ. Degrees of order: A comparison of nanocrystal and amorphous solids for poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;586:119492. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119492
3. Malfait B, Correia NT, Mussi A, Paccou L, Guinet Y, Hédoux A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;277:203-207. doi:10.1016/j.micromeso.2018.10.022
4. Malfait B, Correia NT, Ciotonea C, et al. Manipulating the physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: Impact of the loading degree. *J Chem Phys*. 2020;153(15):154506. doi:10.1063/5.0020992
5. Malfait B, Paccou L, Correia NT, Guinet Y, Hedoux A. Identification of an amorphous-amorphous two-step transformation in indomethacin embedded within mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2021;328:111502. doi:10.1016/j.micromeso.2021.111502
6. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques*. These de doctorat. Université de Lille (2018-2021); 2019. Accessed September 18, 2023. <https://theses.fr/2019LILUR051>
7. Guinet Y, Paccou L, Danède F, Hédoux A. Confinement of molecular materials using a solid-state loading method: a route for exploring new physical states and their subsequent transformation highlighted by caffeine confined to SBA-15 pores. *RSC Adv*. 2021;11(55):34564-34571. doi:10.1039/D1RA05757J
8. Zarinwall A, Maurer V, Pierick J, et al. Amorphization and modified release of ibuprofen by post-synthetic and solvent-free loading into tailored silica aerogels. *Drug Delivery*. 2022;29(1):2086-2099. doi:10.1080/10717544.2022.2092237
9. Kruk M, Jaroniec M, Ko CH, Ryoo R. Characterization of the Porous Structure of SBA-15. *Chem Mater*. 2000;12(7):1961-1968. doi:10.1021/cm000164e

10. Margolese D, Melero JA, Christiansen SC, Chmelka BF, Stucky GD. Direct Syntheses of Ordered SBA-15 Mesoporous Silica Containing Sulfonic Acid Groups. *Chem Mater*. 2000;12(8):2448-2459. doi:10.1021/cm0010304
11. Ravikovitch PI, Neimark AV. Characterization of Micro- and Mesoporosity in SBA-15 Materials from Adsorption Data by the NLDFT Method. *J Phys Chem B*. 2001;105(29):6817-6823. doi:10.1021/jp010621u
12. Donohue MD, Aranovich GL. Classification of Gibbs adsorption isotherms. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1998;76-77:137-152. doi:10.1016/S0001-8686(98)00044-X
13. An Adsorption-Based Method for the Characterization of Pore Networks Containing Both Mesopores and Macropores. doi:10.1021/la990159t
14. Murdande SB, Pikal MJ, Shanker RM, Bogner RH. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(3):1254-1264. doi:10.1002/jps.21903
15. Kawano Y, Chen S, Hanawa T. Solubility Enhancement of Ibuprofen by Adsorption onto Spherical Porous Calcium Silicate. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):767. doi:10.3390/pharmaceutics13060767
16. Galán CA, Ortiz AL, Guiberteau F, Shaw LL. Crystallite Size Refinement of ZrB₂ by High-Energy Ball Milling. *Journal of the American Ceramic Society*. 2009;92(12):3114-3117. doi:10.1111/j.1551-2916.2009.03352.x
17. Dupont A, Guerain M, Danède F, et al. Kinetics and mechanism of polymorphic transformation of sorbitol under mechanical milling. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119902. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119902
18. Hédoux A, Guinet Y, Paccou L, Danède F, Derollez P. Polymorphic Transformation of Anhydrous Caffeine upon Grinding and Hydrostatic Pressurizing Analyzed by Low-Frequency Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;102(1):162-170. doi:10.1002/jps.23346
19. Ruffel L, Soulié J, Coppel Y, et al. Ibuprofen loading into mesoporous silica nanoparticles using Co-Spray drying: A multi-scale study. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2020;291:109689. doi:10.1016/j.micromeso.2019.109689
20. Charnay C, Bégu S, Tourné-Péteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoisselle JM. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57(3):533-540. doi:10.1016/j.ejpb.2003.12.007
21. Lizoňová D, Mužík J, Šoltys M, Beránek J, Kazarian SG, Štěpánek F. Molecular-level insight into hot-melt loading and drug release from mesoporous silica carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;130:327-335. doi:10.1016/j.ejpb.2018.07.013
22. Mellaerts R, Jammaer JAG, Van Speybroeck M, et al. Physical State of Poorly Water Soluble Therapeutic Molecules Loaded into SBA-15 Ordered Mesoporous Silica Carriers: A Case Study with Itraconazole and Ibuprofen. *Langmuir*. 2008;24(16):8651-8659. doi:10.1021/la801161g

23. Dudognon E, Danède F, Descamps M, Correia NT. Evidence for a New Crystalline Phase of Racemic Ibuprofen. *Pharmaceutical research*. 2008;25(12):2853-2858. doi:10.1007/s11095-008-9655-7
24. Hédoux A, Paccou L, Guinet Y, Willart JF, Descamps M. Using the low-frequency Raman spectroscopy to analyze the crystallization of amorphous indomethacin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;38(2):156-164. doi:10.1016/j.ejps.2009.06.007
25. Hédoux A, Guinet Y, Derollez P, Dudognon E, Correia NT. Raman spectroscopy of racemic ibuprofen: Evidence of molecular disorder in phase II. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;421(1):45-52. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.015
26. Jubert A, Legarto ML, Massa NE, Tévez LL, Okulik NB. Vibrational and theoretical studies of non-steroidal anti-inflammatory drugs Ibuprofen [2-(4-isobutylphenyl)propionic acid]; Naproxen [6-methoxy- α -methyl-2-naphthalene acetic acid] and Tolmetin acids [1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrole-2-acetic acid]. *Journal of Molecular Structure*. 2006;783(1):34-51. doi:10.1016/j.molstruc.2005.08.018

Chapitre IV. : Fonctionnalisation des SBA-15 et étude du confinement de l'ibuprofène par broyage à 30 et à 10 Hz

Le prolongement de la libération d'un principe actif (PA) est un paramètre important à contrôler dans les systèmes de libération. Une des stratégies existantes est de renforcer l'affinité du PA avec la surface de la matrice hôte. Dans cette optique, la modification de la chimie de surface des matrices de silice mésoporeuses a fait l'objet de plusieurs études¹⁻⁹ dans le but de modifier les interactions entre le principe actif et la matrice. En effet, en plus de leur biocompatibilité, de l'uniformité de la taille des pores et de l'importance de leur volume poreux, les matrices de silice mésoporeuses possèdent des groupements silanols (...Si-OH) sur la surface, qui facilitent la fonctionnalisation de celle-ci par une large variété de molécules^{8,10-12}.

Afin d'étudier l'effet de la fonctionnalisation sur la libération, l'ibuprofène a été choisi comme molécule modèle de confinement, et le groupement aminopropyle ($C_3H_6-NH_2$) comme groupement de fonctionnalisation des SBA-15. Les matrices de silice mésoporeuses SBA-15 fonctionnalisées seront notées « SBA-15- NH_2 »

Dans ce chapitre, la méthode de fonctionnalisation et l'analyse des matrices fonctionnalisées SBA-15- NH_2 seront décrites dans un premier temps. Ensuite, les résultats des études par spectroscopie Raman et par physisorption du confinement par broyage de l'ibuprofène dans les SBA-15- NH_2 seront présentés. Les résultats seront comparés à ceux obtenus lors du confinement dans les SBA-15 afin de déterminer et comprendre l'impact de la fonctionnalisation.

IV.1 Synthèse et caractérisation de la matrice mésoporeuse fonctionnalisée : SBA-15-NH₂

D'une manière générale, la modification chimique de la surface des matrices de silice mésoporeuses peut être réalisée via deux voies de synthèse différentes: la *co-condensation* et la *silylation*¹³.

La première voie de synthèse (la *co-condensation*) permet de modifier chimiquement la surface des matrices mésoporeuses en une seule étape. C'est-à-dire que la synthèse des matrices a lieu en même temps que la modification de la surface. Tandis que la deuxième méthode (la *silylation*) permet de modifier des matrices de silice mésoporeuses qui sont préalablement synthétisées. Afin de comparer les résultats avec ceux obtenus avec les matrices de silice commerciales SBA-15, la fonctionnalisation a été réalisée via la silylation (Chapitre II).

Il est indispensable, après la synthèse des SBA-15-NH₂ de quantifier le taux de fonctionnalisation. Pour ce faire, des analyses thermogravimétriques ATG, des SBA-15 avant et après fonctionnalisation, ont été réalisées dans une gamme de température allant de la température ambiante jusqu'à 1000°C. Les courbes résultantes de cette analyse des SBA-15 commerciaux et des SBA-15 fonctionnalisés sont tracées sur la Figure 53.

La courbe correspondante aux SBA-15 montre une première perte de masse aux alentours de 90°C. Cette perte de masse correspond à la perte d'eau compte tenu du caractère hydrophile de ces matériaux induit par la présence des groupements silanols sur la surface. Une deuxième perte de masse, très étalée, est observée au-dessus de 200 °C. Elle correspond à la déshydroxylation^{14,15}, c'est-à-dire à l'élimination des groupes hydroxyles via la condensation des silanols¹⁶.

La courbe correspondant aux SBA-15-NH₂ présente quant à elle deux pertes de masse bien définies. La première a lieu à la même température que la première perte de masse des SBA-15 et correspond à la perte d'eau piégée

dans la matrice. La deuxième perte de masse qui a lieu entre 250 et 600 °C environ correspond à la dégradation du groupement aminopropyle^{16,17}. La mesure de cette deuxième perte de masse suggère un taux de fonctionnalisation d'environ 10% en masse.

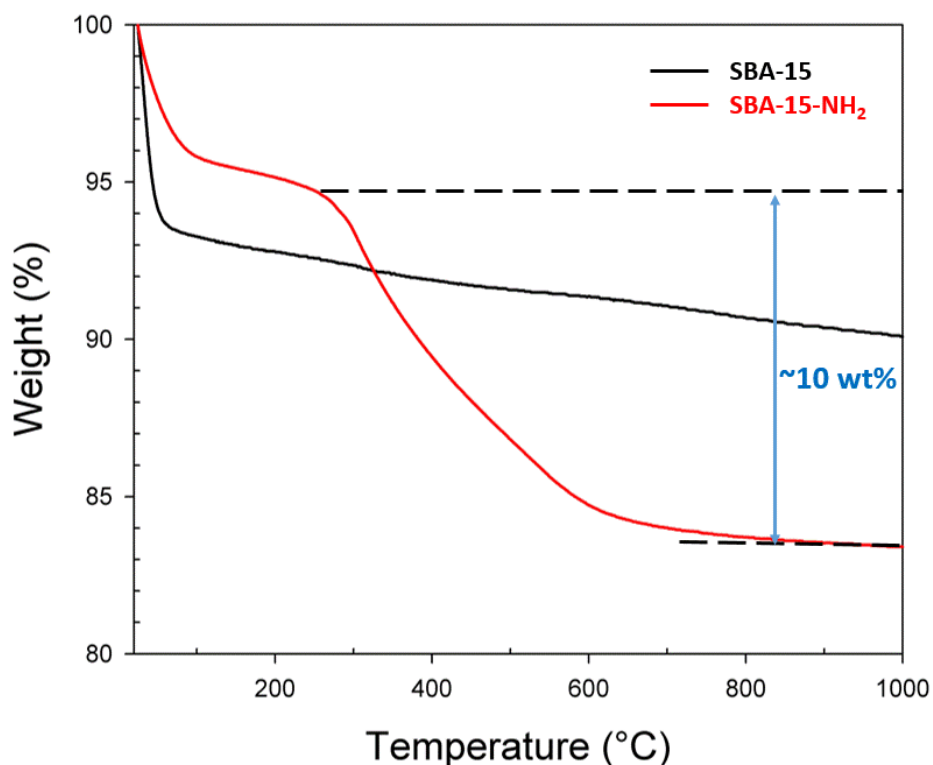


Figure 53: Courbes ATG des SBA-15 (en noir) et des SBA-15-NH₂ (en rouge)

Pour confirmer ce résultat, le taux de fonctionnalisation a été évalué par une analyse élémentaire CHN (Carbone, Hydrogène et Azote). Cette analyse permet de donner la composition en pourcentage massique de chaque élément. Les résultats sont présentés sur le Tableau 3 suivant.

Élément	C	H	N
Composition en pourcentage massique (wt%)	7.35	2	1.58

Tableau 3: Analyse élémentaire CHN: Composition en carbone, hydrogène et azote dans les SBA-15-NH₂

Le pourcentage massique total qui correspond au pourcentage du groupement fonctionnel dans l'échantillon est de 10.93% en masse. Le résultat de cette analyse corrobore le résultat obtenu en ATG et montre que la fonctionnalisation a été bel et bien effectuée.

Pour caractériser la matrice de silice mésoporeuse fonctionnalisée SBA-15-NH₂, des investigations de physisorption ont été menées. On rappelle ici que cette technique d'analyse permet de décrire la morphologie des pores, estimer leur taille moyenne, calculer la surface spécifique et évaluer le volume poreux total^{18,19}.

La Figure 54.a présente les isothermes d'adsorption-désorption des SBA-15 et des SBA-15-NH₂. Cette figure montre que leurs branches d'adsorption et désorption sont parallèles indiquant que l'hystérèse est de type H1 pour les deux échantillons selon la classification IUPAC^{14,15}. On montre ainsi que la morphologie des pores n'a pas été impactée par la modification chimique de la surface. La Figure 54 met en évidence également la diminution de la quantité de N₂ adsorbée à l'issue de la fonctionnalisation. Elle montre aussi que le début de l'hystérèse des SBA-15-NH₂ est légèrement décalé vers les basses pressions par rapport à celle des SBA-15. Ces deux observations suggèrent que la taille moyenne des pores a été modifiée après la fonctionnalisation comme cela a pu être observé dans des études antérieures^{1,20-23}. On détermine également que la surface spécifique S_{BET} diminue de 793 m² / g à 334 m² / g et le volume poreux de 0.80 cm³ / g à 0.40 cm³ / g

La distribution de la taille des pores des SBA-15 avant et après fonctionnalisation a été évaluée par la méthode BJH (Barett, Joyner et Halenda). Sur la Figure 54.b. la dérivée du volume poreux cumulatif par rapport à la taille des pores est tracée en fonction de la taille des pores pour les deux échantillons.

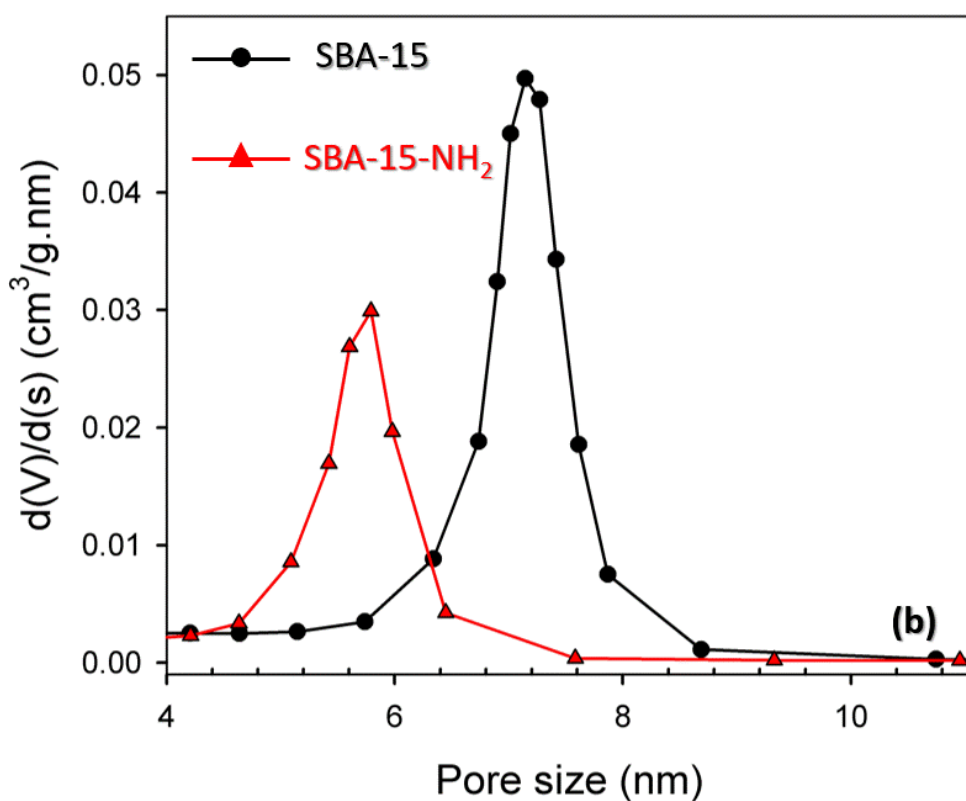
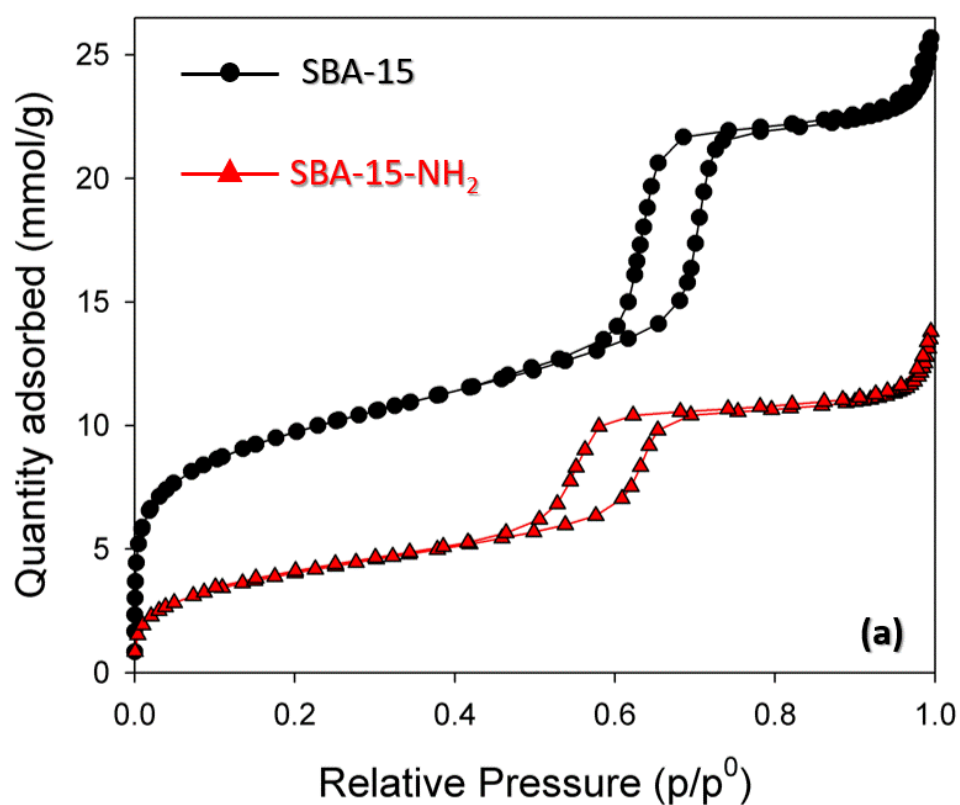


Figure 54: Caractérisation des matrices de silice mésoporeuses. (a) Isotherme d'adsorption désorption N₂ des SBA-15 et des SBA-15-NH₂. (b) Distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH (Barett, Joyner et Halenda)

Pour les SBA-15 et à l'instar des SBA-15-NH₂ les deux courbes se présentent sous forme de pic dont le maximum rend compte de la taille moyenne des pores. Pour les SBA-15, la taille moyenne des pores est d'environ 7 nm tandis que la taille moyenne des pores des SBA-15-NH₂ est de l'ordre de 5.7 nm. L'ajout d'un groupement fonctionnel sur la surface des pores induit une diminution de la taille des pores et donc une réduction du volume poreux.

IV.2 Etude de l'état physique de l'ibuprofène confiné dans les SBA-15-NH₂ par la méthode MAL à deux fréquences de broyage : 30 et 10 Hz

IV.2.1 Broyage à 30 Hz

Afin d'étudier l'impact de la fonctionnalisation sur l'état physique de l'ibuprofène confiné par co-broyage à 30 Hz, une composition de 35% en masse d'ibuprofène et 65% des SBA-15 a été choisie. Ce choix vient simplement du fait que 37% d'ibuprofène est le taux de chargement maximal dans les SBA-15 ($D_p = 7\text{ nm}$) avec un broyage à 30 Hz²⁴. De ce fait, nous avons choisi une composition en dessous de 37% pour s'assurer du confinement de la totalité d'ibuprofène dans le composite.

Pour étudier l'état physique de l'ibuprofène confiné dans les deux matrices mésoporeuses, les échantillons fraîchement préparés ont été analysés par spectroscopie Raman à basses fréquences. Les spectres sont présentés sur la Figure 55.

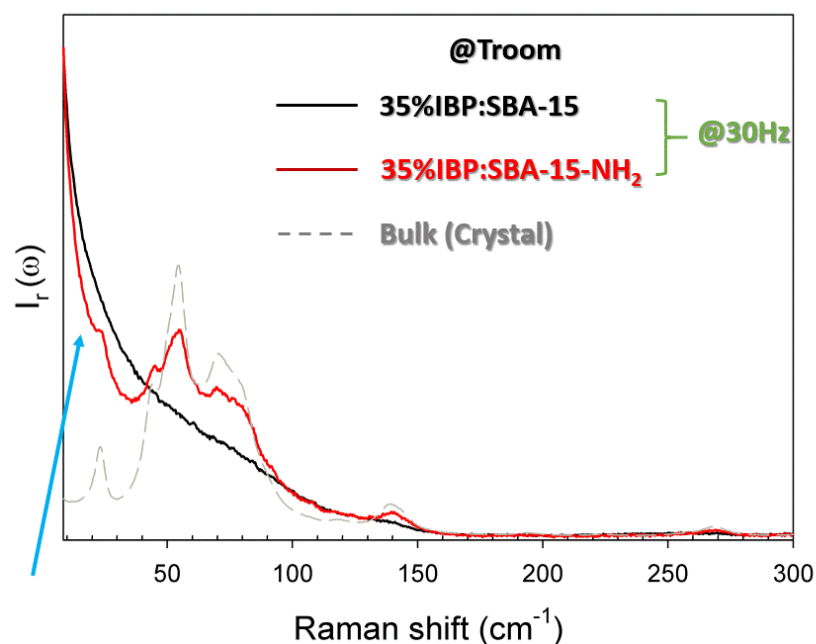


Figure 55: Spectres Raman à basses fréquences des composites 35%IBP:SBA-15 et 35%IBP:SBA-15-NH₂. Les deux composites ont été fraîchement préparés avec un broyage à 30 Hz

Comme cela a pu être observé dans une étude précédente²⁴, le spectre correspondant au composite 35%IBP:SBA-15 ne présente aucun pic de phonon, ce qui indique que la totalité d'ibuprofène a été confinée dans les SBA-15 dans un état amorphe. Contrastant avec cette absence de modes de réseau, le spectre correspondant au composite 35%IBP:SBA-15-NH₂ présente des pics caractéristiques de l'état cristallin. L'intensité quasiélastique (à très basse fréquence) indiquée par une flèche sur la Figure 55 témoigne de la présence de la matière amorphe (liquide sous-refroidi) dans le composite coexistant avec la matière cristalline. Cette figure met donc en évidence que le broyage à 30 Hz de 35% d'ibuprofène avec les SBA-15-NH₂ induit un mélange de cristal et d'amorphe. En revanche, il est important de démontrer que le cristal se situe bien à l'intérieur des pores. Pour cela, une première chauffe a été réalisée de la température ambiante jusqu'à 90°C. Cette première chauffe, comme on l'a vu dans le chapitre III, entraîne la fusion de la matière cristalline. L'échantillon est ensuite refroidi à -100°C puis chauffé une deuxième fois jusqu'à 90 °C. L'absence de recristallisation à très faible vitesse de chauffage (1 °C/min) est

l'indicateur d'un chargement total de l'ibuprofène à l'intérieur des pores, la nucléation étant inhibée par un diamètre de pores inférieur au rayon critique des noyaux.

La Figure 56 présente les spectres collectés lors des deux chauffe consécutives du composite 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz). Les spectres issus de la première chauffe sont présentés sur la Figure 56.a. Cette figure montre que les pics de phonons, situés entre 20 et 100 cm⁻¹, sont visibles sur les spectres du composite dans une gamme de température allant de 20 à environ 50°C, à partir de cette température, l'intensité de ces pics diminue ce qui marque le début de fusion des cristallites de plus petite taille. Avec la température, la diminution de l'intensité des pics est progressive. Aux alentours de 80 °C, ces pics de phonons disparaissent totalement. On rappelle ici que la température de fusion de l'ibuprofène en bulk est d'environ 75 °C. Par conséquent, la large plage de température de fusion de la part cristalline dans le composite indique une large distribution de tailles des cristallites.

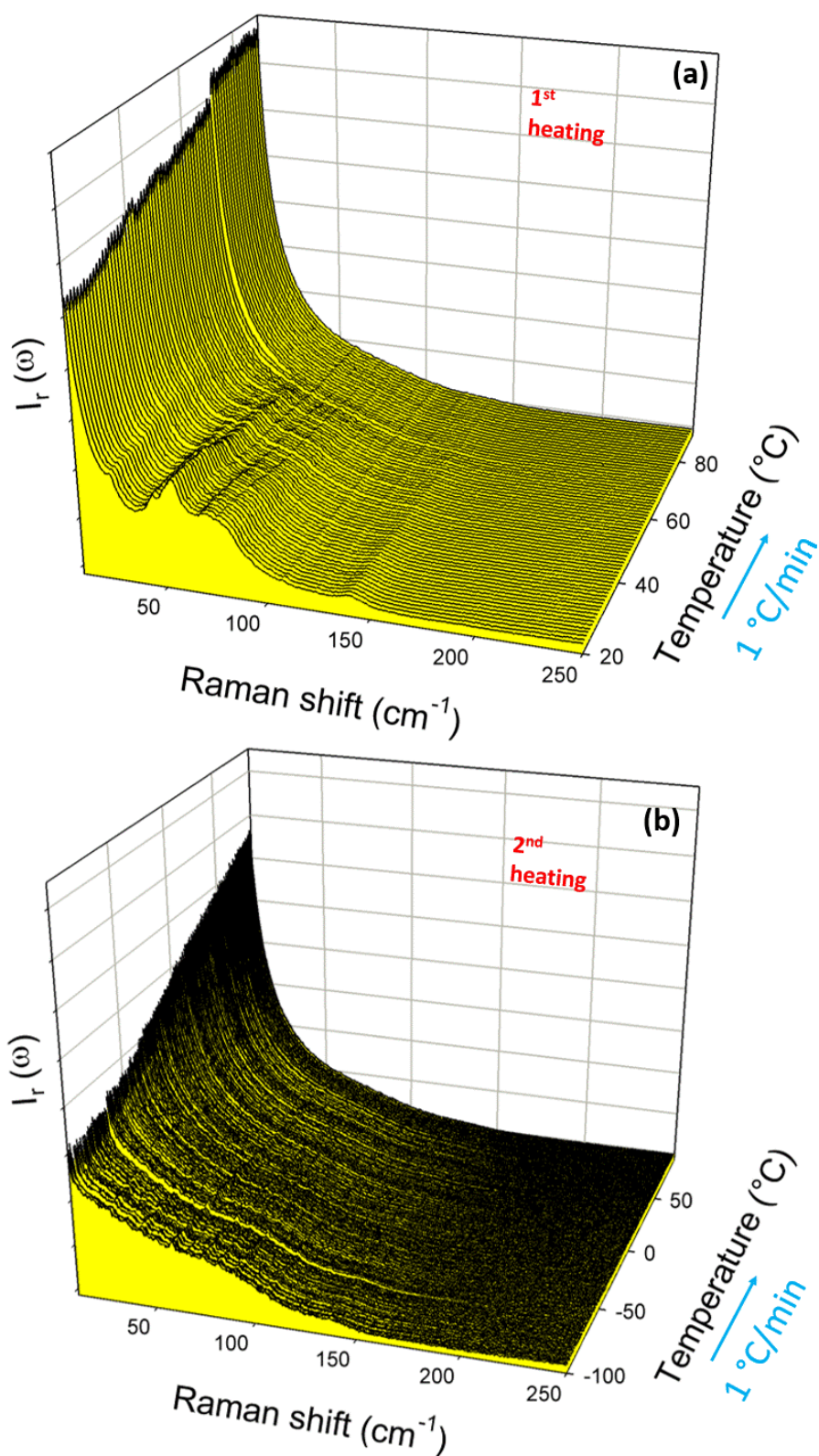


Figure 56: Spectres Raman à basses fréquences de 35%IBP:SBA-15-NH₂ broyé à 30 Hz collectés lors des deux chauffes à 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (a) Première chauffe allant de la température ambiante jusqu'à 90 $^{\circ}\text{C}$. (b) Deuxième chauffe allant de -100 jusqu'à 90 $^{\circ}\text{C}$

La Figure 56.b présente les spectres collectés lors de la deuxième chauffe du composite allant de -100 jusqu'à 90°C. Aucune recristallisation ne peut être détectée dans cette gamme de température. Compte tenu de l'extrême sensibilité de la spectroscopie Raman basse fréquence à la présence de matière nanocristalline dans une matrice amorphe^{25,26}, cette expérience confirme le chargement total de l'ibuprofène au sein des canaux, comme observé sans fonctionnalisation.

Ce résultat montre que la fonctionnalisation des SBA-15 engendre une modification de l'état physique de l'ibuprofène à l'intérieur des pores. En effet, pour la même teneur en ibuprofène, nous avons observé des différences de l'état physique selon le type des SBA-15 utilisés. Dans le cas des SBA-15, 35% d'ibuprofène est confiné dans un état amorphe. Dans le cas des SBA-15-NH₂, 35% d'ibuprofène est confiné sous forme d'un mélange dans lequel l'amorphe et les nanocristaux coexistent. La diminution de la taille des pores à l'issue de la fonctionnalisation induit une densité plus élevée de l'ibuprofène à l'intérieur de ceux-ci qui pourrait expliquer la présence de nanocristaux. Ce résultat est effectivement en accord avec une étude de l'effet du degré de chargement sur l'état physique de l'ibuprofène à l'intérieur des pores²⁷

Le degré de cristallinité du composite 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz) a été calculé par spectroscopie Raman à basses fréquences et par spectroscopie Raman à moyennes fréquences, à partir d'un jeu de données d'une cartographie. Ces deux méthodes utilisées pour quantifier le degré de cristallinité sont décrites dans le chapitre II.

À basses fréquences, la différence entre la susceptibilité Raman du composite 35%IBP:SBA-15-NH₂ (partiellement cristallisé) et la susceptibilité Raman du composite 35%IBP:SBA-15 (totalement amorphe) a été calculée. À partir de l'aire sous la courbe, le degré de cristallinité a été estimé à 68%.

À moyennes fréquences, une cartographie Raman de dimension 46×46 μm² a été réalisée (Figure 56). Le traitement des données de la cartographie a été

effectué par DCLS (combinaison linéaire des spectres de référence pour ajuster le spectre expérimental de chaque point de la cartographie). Cette méthode nécessite l'acquisition des spectres de référence, en l'occurrence les spectres de l'ibuprofène à l'état cristallin et à l'état amorphe. Les deux états se distinguent, comme on l'a vu dans le chapitre III, par une bande intense située aux alentours de 1607 cm^{-1} pour l'ibuprofène cristallin et à environ 1613 cm^{-1} pour l'ibuprofène amorphe et qui correspond aux vibrations C=C. Le traitement DCLS de cette cartographie permet de constituer une image présentée sur la Figure 56 en fonction du degré de cristallinité. Ainsi, les zones en rouge de l'image correspondent à des domaines à haut degré de cristallinité. À l'inverse, les zones en bleu correspondent à des degrés de cristallinité faibles. Les zones en bleu clair et vert clair sont, quant à elles, des zones à degré de cristallinité intermédiaire. Cette imagerie Raman nous montre bien la coexistence des deux états d'ibuprofène: amorphe et nanocristallin répartis d'une manière relativement hétérogène. Les couleurs dominantes sur l'image sont le vert et le jaune reflétant l'aspect nanocristallisé de l'ibuprofène à l'intérieur des pores.

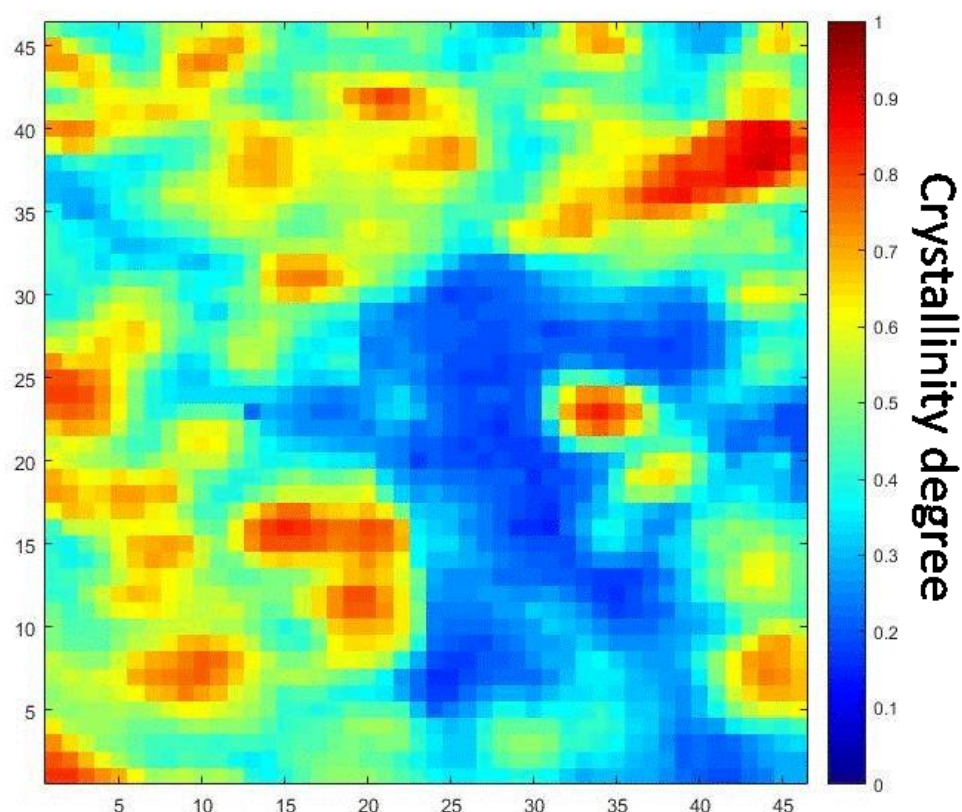


Figure 57: Analyse par la méthode «DCLS» de la cartographie Raman à moyennes fréquences du composite 35%IBP:SBA-15-NH₂

L'analyse quantitative DCLS de cette image donne une estimation de 44% de la part cristalline dans le mélange. Cette valeur est très différente de celle obtenue par la méthode de quantification à basses fréquences (68%). La différence entre les deux valeurs provient certainement du sous échantillonnage. En effet, dans la mesure où le mélange est hétérogène, la zone analysée à moyennes fréquences n'est certainement pas représentative de la totalité de l'échantillon.

Dans une étude précédente²⁸, la spectroscopie Raman a été employée pour étudier les interactions qui ont lieu entre l'ibuprofène et la surface des SBA-15. Il a été montré que le spectre Raman du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz) possède une bande située à environ 1710 cm⁻¹ non observable dans le spectre de l'ibuprofène amorphe en bulk. Cette bande, repérée par une flèche sur la

Figure 59, a été attribuée à un étirement de la liaison C=O du groupement carboxylique des molécules qui sont en interaction avec la surface des pores²⁸. L'analyse en température de la position de cette bande a permis de mettre en évidence une liaison hydrogène dans laquelle la double liaison C=O est impliquée²⁸, en l'occurrence, une liaison hydrogène entre le groupement carboxylique de l'ibuprofène et les groupes silanols de la surface²⁹.

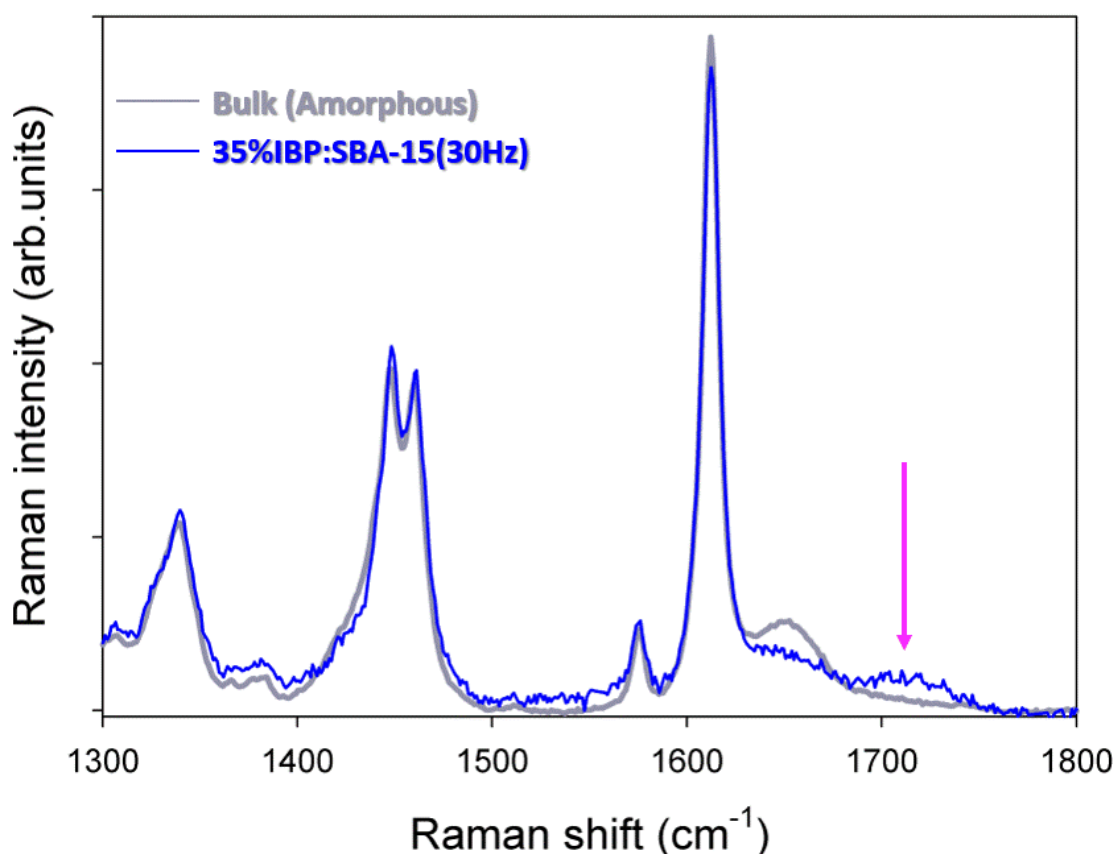


Figure 58: Spectre Raman à moyennes fréquences du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz) en comparaison avec le spectre de l'ibuprofène amorphe en bulk.

Afin de comparer les spectres à moyennes fréquences de l'ibuprofène confiné dans les SBA-15 et de l'ibuprofène confiné dans les SBA-15-NH₂, les deux spectres des échantillons fraîchement préparés sont tracés sur la Figure 59.a. On observe des différences notamment sur la bande située aux alentours de 1610 cm⁻¹. Cette bande, comme on l'a vu précédemment, permet de distinguer les deux états de l'ibuprofène : cristallin et amorphe. Ce résultat corrobore celui obtenu à basses fréquences. C'est-à-dire que dans le cas des SBA-15 fonctionnalisées, l'ibuprofène est dans un état où l'amorphe et le cristal coexistent.

Afin de comparer les deux composites dans le même état physique (amorphe). Le composite 35%IBP:SBA-15-NH₂ partiellement cristallisé a été chauffé dans un premier temps jusqu'à 90°C pour faire fondre les nanocristaux, ensuite, un refroidissement à -100 °C a été effectué. Le spectre tracé sur la Figure 59.b correspond donc au spectre collecté à 25°C durant la deuxième chauffe.

Sur la Figure 59, on note que les deux bandes vers 1610 cm⁻¹ se superposent. Ceci montre que les deux échantillons sont à l'état amorphe et que le composite 35%SBA-15-NH₂ n'a pas recristallisé au deuxième passage. Ce résultat est similaire à celui obtenu à basses fréquences (Figure 56). La seule différence significative entre les deux spectres se trouve au niveau de la bande à environ 1710 cm⁻¹ indiquée par une flèche sur la Figure 59. Cette bande, qui a été attribuée à l'étirement de la liaison C=O impliquée dans une liaison hydrogène avec les silanols de la surface est d'une faible intensité pour le composite 35%IBP:SBA-15-NH₂ par rapport au composite 35%IBP:SBA-15. Ceci est simplement dû à la faible quantité des silanols présents sur la surface interne des pores après la fonctionnalisation³⁰.

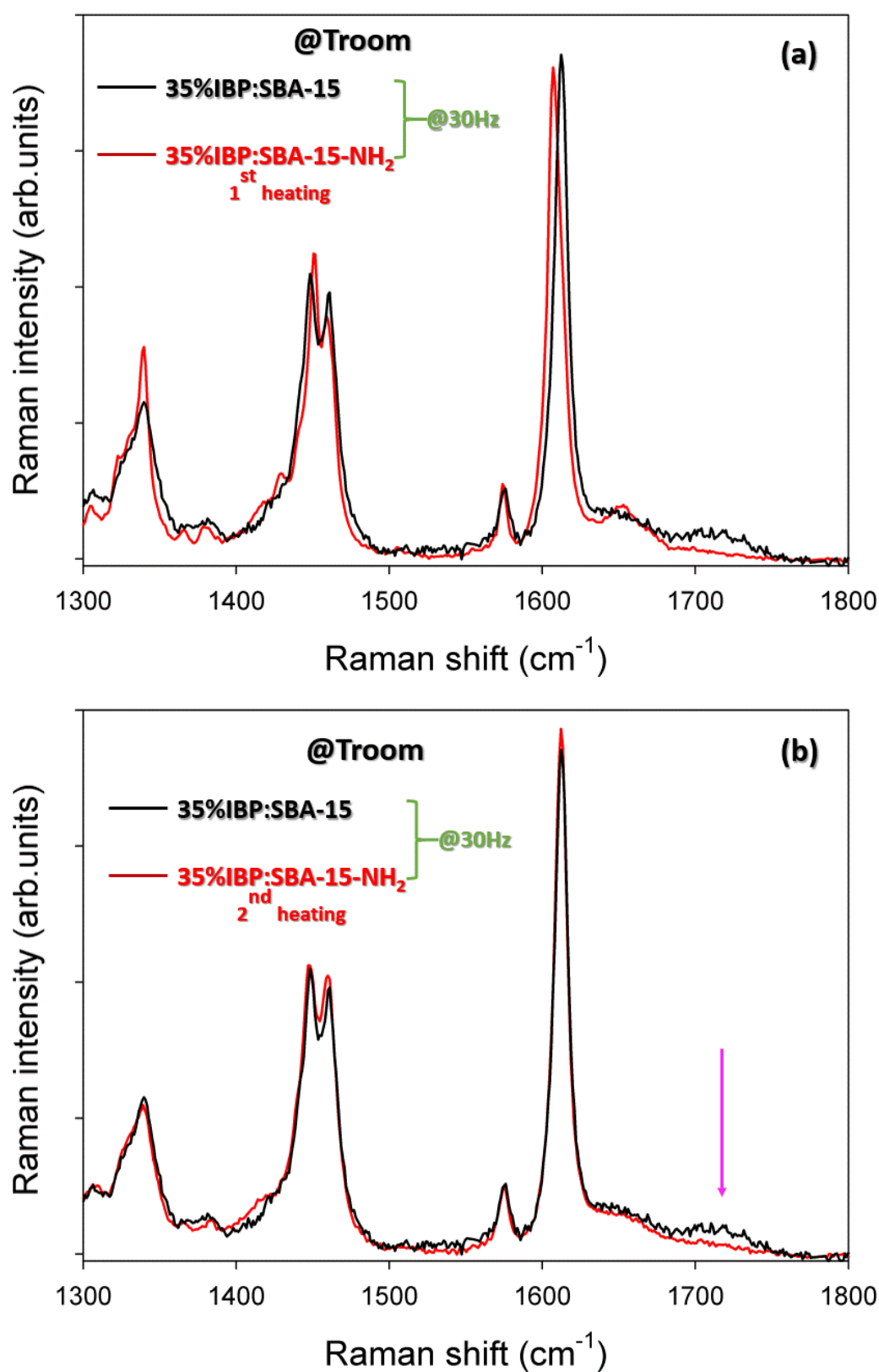


Figure 59: Comparaison des spectres Raman à moyennes fréquences des composites 35%IBP:SBA-15 et 35%IBP:SBA-15-NH₂ lorsque (a) L'ibuprofène dans les SBA-15-NH₂ est partiellement cristallisé, et l'ibuprofène dans les SBA-15 est dans un état amorphe. Et (b) Lorsque les deux échantillons ont le même état physique (amorphe)

Pour comprendre la façon avec laquelle le remplissage se fait à l'intérieur des pores des SBA-15-NH₂, deux composites à faible pourcentage d'ibuprofène ont été préparés. Les spectres de ces deux composites sont tracés sur la Figure 60. Le spectre correspondant au composite 20%IBP:SBA-15-NH₂ possède la bande caractéristique de l'amorphe située aux alentours de 1613 cm⁻¹. Cette bande est décalée vers les basses fréquences dans le cas du composite 25%IBP:SBA-15-NH₂. Ceci montre deux états d'ibuprofène différents selon le degré du chargement. C'est-à-dire que le remplissage se fait d'abord sur les parois internes des pores sous forme d'une couche amorphe puis au centre, indiquant que les nanocristaux se situent au cœur des pores des SBA-15-NH₂ conformément à la littérature²⁷.

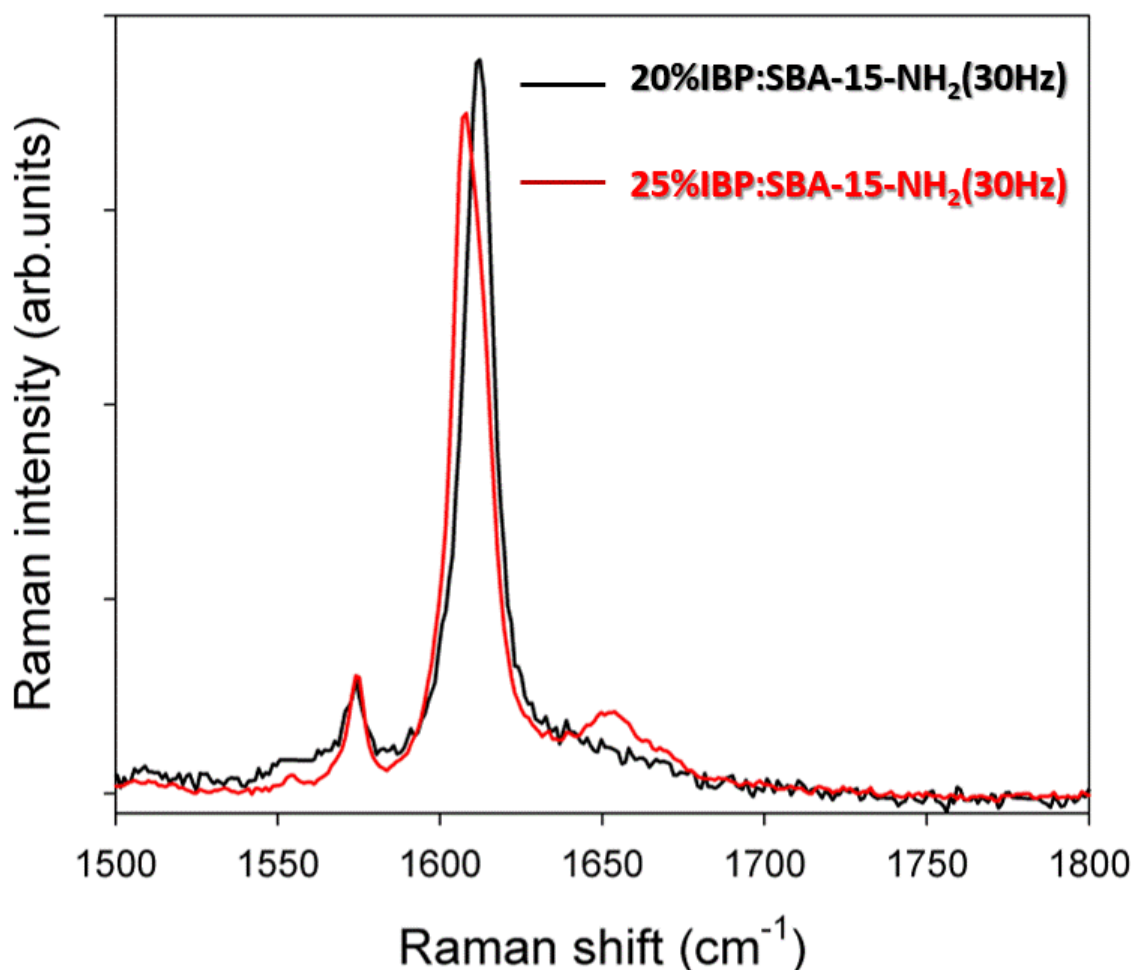


Figure 60: Comparaison des spectres Raman à moyennes fréquences des composites 20%IBP:SBA-NH₂ et 25%IBP:SBA-15-NH₂

IV.2.2 Broyage à 10 Hz

L'effet d'un broyage à 10 Hz sur les matrices mésoporeuses SBA-15 et sur l'état physique de l'ibuprofène confiné a été étudié dans le chapitre III. Nous avons conclu que la fréquence de broyage impacte non seulement la taille des particules des SBA-15 mais aussi l'état physique de l'ibuprofène confiné. Dans cette partie, nous allons étudier l'impact d'un broyage à 10 Hz et de la fonctionnalisation sur l'état physique de l'ibuprofène. Pour cela, un mélange (35% d'ibuprofène, 65% de SBA-15-NH₂) a été cobroyé à 10 Hz. Des investigations en physisorption ont été menées afin de vérifier le chargement de l'ibuprofène. Les isothermes d'adsorption-désorption de la matrice non chargée et de la matrice chargée en ibuprofène sont tracées sur la Figure 61. Cette figure montre la réduction drastique de la quantité de N₂ adsorbée dans la matrice chargée en comparaison avec la matrice hôte. En plus la surface spécifique S_{BET} a été évaluée. Celle-ci diminue de 334 à 9 m²/g à l'issue du chargement de l'ibuprofène. Ceci indique que les molécules d'ibuprofène occupent la quasi-totalité de l'espace poreux.

Ce résultat nécessite des investigations supplémentaires par spectroscopie Raman à basses fréquences pour s'assurer que la totalité des 35% d'ibuprofène est à l'intérieur des pores et qu'il n'y a pas de la matière à l'extérieur des pores. La Figure 62 présente le spectre Raman à basses fréquences du composite 35%IBP:SBA-15 broyé à 10 Hz et le spectre du même composite broyé à 30 Hz à titre de comparaison. En raison des intensités des pics des phonons, cette figure met en évidence un degré de cristallinité relativement élevé du composite broyé à 10 Hz comparé à celui broyé à 30 Hz. Ce degré de cristallinité a été estimé à 78%, à partir des susceptibilités Raman (Voir Chapitre II).

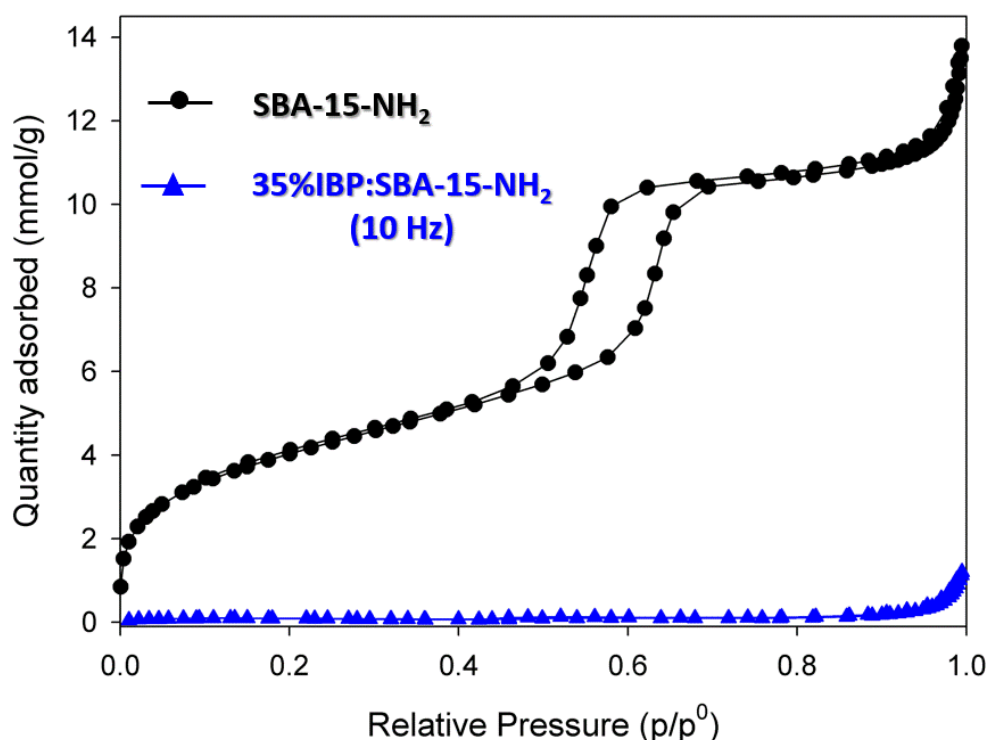


Figure 61: Isothermes d'adsorption-désorption des SBA-15-NH₂ (courbe en noir) et du composite 35%IBP:SBA-15-NH₂ broyé à 10 Hz (courbe en bleu).

Ce résultat corrobore celui obtenu dans le chapitre III, c'est-à-dire que la fréquence de broyage a un impact direct sur l'état physique de l'ibuprofène confiné. En effet, le broyage à 10 Hz préserve la longueur des canaux des matrices mésoporeuses, ceci engendre la cristallisation de l'ibuprofène selon l'axe des z des canaux cylindriques. Le degré de cristallinité de l'ibuprofène à l'intérieur des SBA-15-NH₂ avec un broyage à 10 Hz est donc dépendant de deux paramètres différents: Une plus forte densité de l'ibuprofène confiné due à la réduction de la taille des pores (par l'effet de la fonctionnalisation), et à une longueur des canaux plus importante (préservée par un broyage de moins forte intensité).

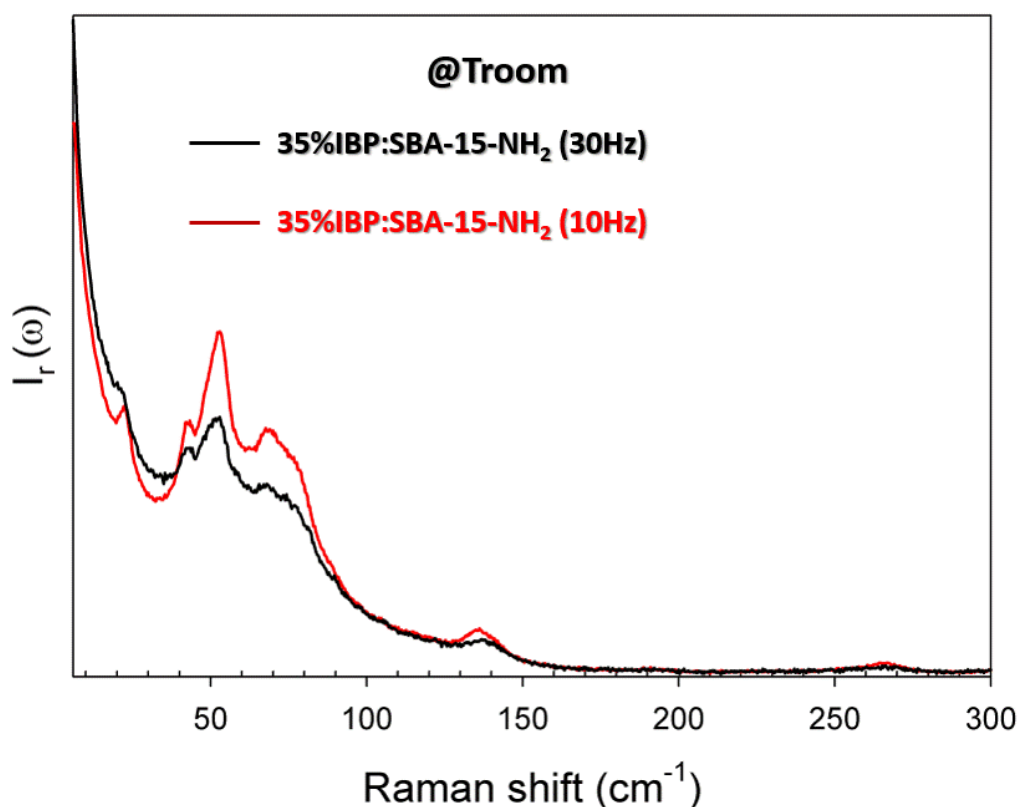


Figure 62: Spectres Raman à basses fréquences des composites 35%IBP:SBA-15-NH₂ broyés à 30 Hz (courbe en noire) et à 10 Hz (courbe en rouge).

Pour vérifier que l'intégralité d'ibuprofène est à l'intérieur des pores, deux chauffe ont été effectuées. Les spectres collectés lors de la première chauffe sont présentés sur la Figure 63.a. Cette figure montre bien la fusion des nanocristaux, étalée dans une gamme de température allant de ~45 à ~70 °C.

Les spectres collectés durant la deuxième chauffe, après avoir refroidi le liquide à -100 °C sont présentés sur la Figure 63.b. Cette figure ne montre aucune recristallisation dans cette gamme de température indiquant le chargement total de 35% d'ibuprofène dans les SBA-15-NH₂.

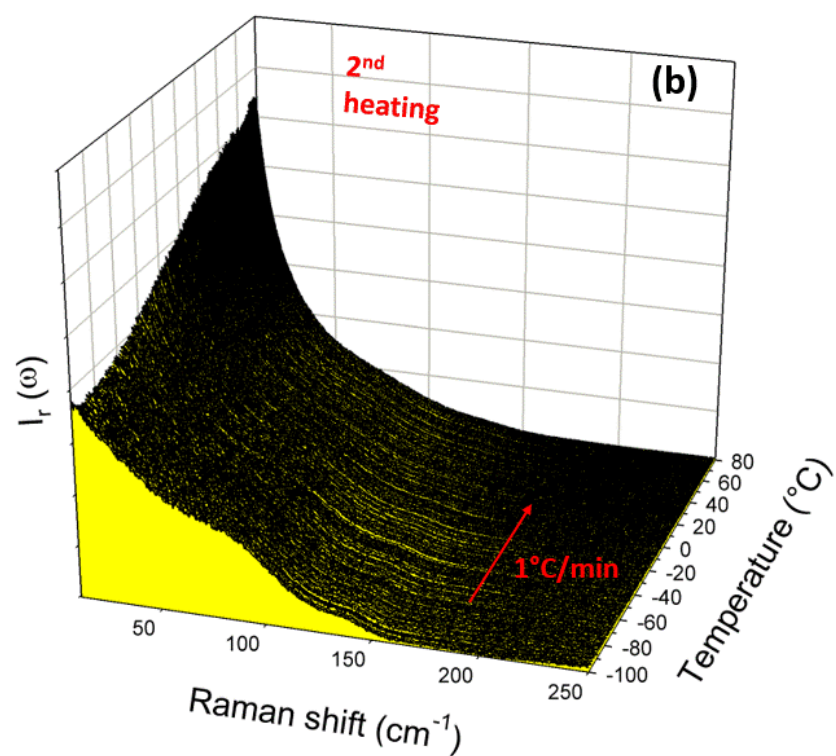
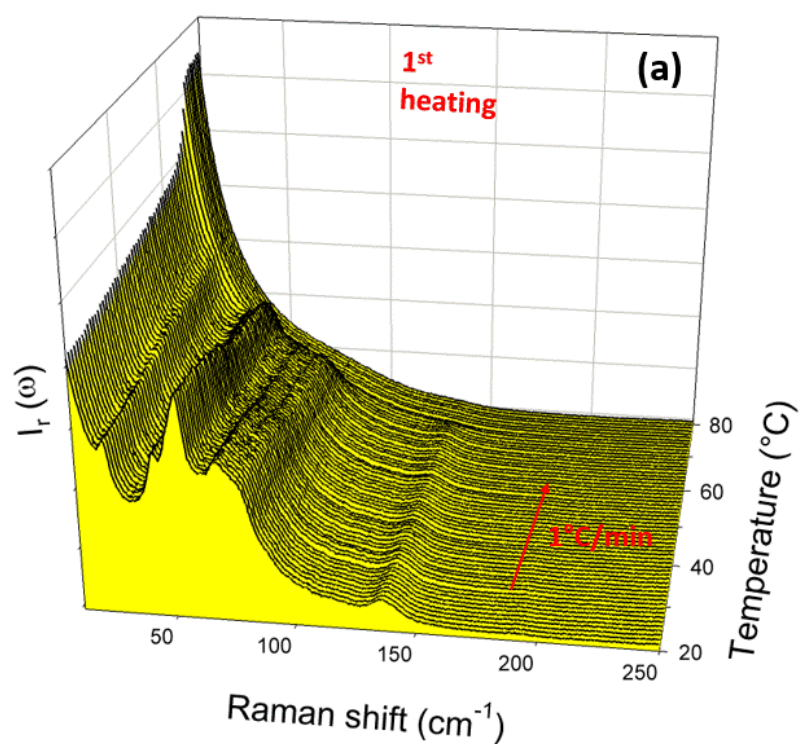


Figure 63: Spectres Raman à basses fréquences de 35%IBP:SBA-15-NH₂ broyé à 10 Hz collectés lors des deux chauffe à 1 °C/min. (a) Première chauffe allant de la température ambiante jusqu'à 90 °C. (b) Deuxième chauffe allant de -100 jusqu'à 90°C

IV.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu caractériser les matrices fonctionnalisées SBA-15-NH₂. Nous avons montré que la fonctionnalisation induit une réduction de la taille moyenne des pores, impactant le volume poreux et la surface spécifique. Les résultats d'ATG et de l'analyse élémentaire ont permis de quantifier la part du groupement fonctionnel qui a été estimée à 10% en masse des SBA-15-NH₂.

Ensuite, les résultats de deux études de confinement dans les SBA-15-NH₂ à deux fréquences de broyage (30 et 10Hz) ont été présentés. Les résultats de ces deux études ont pu montrer que la fonctionnalisation favorise la présence de matière cristallisée à l'intérieur des pores. Cette cristallinité est pilotée à la fois par la densité de l'ibuprofène à l'intérieur des pores et par la longueur des canaux qui est plus ou moins préservée selon la fréquence de broyage. La cristallinité à l'intérieur des pores des matrices mésoporeuses fonctionnalisées n'a jamais été étudiée auparavant car elle est essentiellement inhérente à la méthode de chargement à l'état solide.

Dans le chapitre suivant, les profils de libération seront discutés afin de comprendre l'impact de la fonctionnalisation et de la fréquence de broyage sur la libération de l'ibuprofène dans un milieu acide.

Références

1. Maria Chong AS, Zhao XS. Functionalization of SBA-15 with APTES and Characterization of Functionalized Materials. *J Phys Chem B*. 2003;107(46):12650-12657. doi:10.1021/jp035877+
2. Freitas LBDO, Bravo IJG, Macedo WADA, De Sousa EMB. Mesoporous silica materials functionalized with folic acid: preparation, characterization and release profile study with methotrexate. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2016;77(1):186-204. doi:10.1007/s10971-015-3844-8
3. Szewczyk A, Prokopowicz M, Sawicki W, Majda D, Walker G. Aminopropyl-functionalized mesoporous silica SBA-15 as drug carrier for cefazolin: adsorption profiles, release studies, and mineralization potential. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;274:113-126. doi:10.1016/j.micromeso.2018.07.046
4. Song SW, Hidajat K, Kawi S. Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix–Drug Interactions. *Langmuir*. 2005;21(21):9568-9575. doi:10.1021/la051167e
5. Jangra S, Chhokar V, Tomer VK, Sharma AK, Duhan S. Influence of functionalization type on controlled release of emodin from mesoporous silica. *J Porous Mater*. 2016;23(4):1047-1057. doi:10.1007/s10934-016-0162-7
6. Hwang DH, Lee D, Lee H, Choe D, Lee SH, Lee K. Surface functionalization of SBA-15 particles for ibuprofen delivery. *Korean J Chem Eng*. 2010;27(4):1087-1092. doi:10.1007/s11814-010-0225-4
7. Izquierdo-Barba I, Sousa E, Doadrio JC, et al. Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2009;50(3):421-429. doi:10.1007/s10971-009-1932-3
8. Barczak M. Functionalization of mesoporous silica surface with carboxylic groups by Meldrum's acid and its application for sorption of proteins. *J Porous Mater*. 2019;26(1):291-300. doi:10.1007/s10934-018-0655-7
9. Chaudhary V, Sharma S. An overview of ordered mesoporous material SBA-15: synthesis, functionalization and application in oxidation reactions. *J Porous Mater*. 2017;24(3):741-749. doi:10.1007/s10934-016-0311-z
10. Mercier L, Pinnavaia TJ. Direct Synthesis of Hybrid Organic–Inorganic Nanoporous Silica by a Neutral Amine Assembly Route: Structure–Function

Control by Stoichiometric Incorporation of Organosiloxane Molecules. *Chem Mater*. 2000;12(1):188-196. doi:10.1021/cm990532i

11. Lin VSY, Lai CY, Huang J, Song SA, Xu S. Molecular Recognition Inside of Multifunctionalized Mesoporous Silicas: Toward Selective Fluorescence Detection of Dopamine and Glucosamine. *J Am Chem Soc*. 2001;123(46):11510-11511. doi:10.1021/ja016223m

12. Hall SR, Fowler CE, Mann S, Lebeau B. Template-directed synthesis of bi-functionalized organo-MCM-41 and phenyl-MCM-48 silica mesophases. *Chem Commun*. 1999;(2):201-202. doi:10.1039/a809008d

13. Da Silva FDCM, Costa MJDS, Da Silva LKR, Batista AM, Da Luz GE. Functionalization methods of SBA-15 mesoporous molecular sieve: a brief overview. *SN Appl Sci*. 2019;1(6):654. doi:10.1007/s42452-019-0677-z

14. Witoon T, Chareonpanich M, Limtrakul J. Effect of acidity on the formation of silica–chitosan hybrid materials and thermal conductive property. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2009;51(2):146-152. doi:10.1007/s10971-009-1986-2

15. Wang L, Yang RT. Increasing Selective CO₂ Adsorption on Amine-Grafted SBA-15 by Increasing Silanol Density. *J Phys Chem C*. 2011;115(43):21264-21272. doi:10.1021/jp206976d

16. Zhang D, Li J. Ordered SBA-15 mesoporous silica with high amino-functionalization for adsorption of heavy metal ions. *Chin Sci Bull*. 2013;58(8):879-883. doi:10.1007/s11434-012-5594-0

17. Hernández-Morales V, Nava R, Acosta-Silva YJ, Macías-Sánchez SA, Pérez-Bueno JJ, Pawelec B. Adsorption of lead (II) on SBA-15 mesoporous molecular sieve functionalized with –NH₂ groups. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2012;160:133-142. doi:10.1016/j.micromeso.2012.05.004

18. Chen CY, Li HX, Davis ME. Studies on mesoporous materials. *Microporous Materials*. 1993;2(1):17-26. doi:10.1016/0927-6513(93)80058-3

19. Thommes M, Smarsly B, Groenewolt M, Ravikovitch PI, Neimark AV. Adsorption Hysteresis of Nitrogen and Argon in Pore Networks and Characterization of Novel Micro- and Mesoporous Silicas. *Langmuir*. 2006;22(2):756-764. doi:10.1021/la051686h

20. Verma P, Kuwahara Y, Mori K, Raja R, Yamashita H. Functionalized mesoporous SBA-15 silica: recent trends and catalytic applications. *Nanoscale*. 2020;12(21):11333-11363. doi:10.1039/D0NR00732C

21. Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M. A molecular model to explain the controlled release from SBA-15

functionalized with APTES. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2014;195:43-49. doi:10.1016/j.micromeso.2014.04.019

22. Miao H, Li M, Wang F, Li J, Lin YW, Xu J. Surface Functionalization of SBA-15 for Immobilization of Myoglobin. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10. Accessed November 21, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.907855>

23. Szegedi A, Popova M, Goshev I, Mihály J. Effect of amine functionalization of spherical MCM-41 and SBA-15 on controlled drug release. *Journal of Solid State Chemistry*. 2011;184(5):1201-1207. doi:10.1016/j.jssc.2011.03.005

24. Malfait B, Correia NT, Mussi A, Paccou L, Guinet Y, Hédoux A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;277:203-207. doi:10.1016/j.micromeso.2018.10.022

25. Wypych A, Guinet Y, Hédoux A. Isothermal transformation of supercooled liquid n -butanol near the glass transition: Polyamorphic transitions in molecular liquids investigated using Raman scattering. *Phys Rev B*. 2007;76(14):144202. doi:10.1103/PhysRevB.76.144202

26. Hédoux A, Guinet Y, Descamps M. Raman signature of polyamorphism in triphenyl phosphite. *Phys Rev B*. 1998;58(1):31-34. doi:10.1103/PhysRevB.58.31

27. Malfait B, Correia NT, Ciotonea C, et al. Manipulating the physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: Impact of the loading degree. *J Chem Phys*. 2020;153(15):154506. doi:10.1063/5.0020992

28. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques*. These de doctorat. Université de Lille (2018-2021); 2019. Accessed September 18, 2023. <https://theses.fr/2019LILUR051>

29. Zhu Y fang, Shi J lin, Li Y sheng, Chen H rong, Shen W hua, Dong X ping. Storage and release of ibuprofen drug molecules in hollow mesoporous silica spheres with modified pore surface. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;85(1-2):75-81. doi:10.1016/j.micromeso.2005.06.015

30. Deshpande N, Chen JY, Kobayashi T, et al. Investigating the impact of micropore volume of aminosilica functionalized SBA-15 on catalytic activity for amine-catalyzed reactions. *Journal of Catalysis*. 2022;414:356-364. doi:10.1016/j.jcat.2022.09.016

Chapitre V : Étude des profils de libération de l'ibuprofène confiné

Le confinement dans des matrices de silice mésoporeuses de principes actifs (PA) très faiblement hydrosolubles vise à améliorer leur solubilité en stabilisant des états métastables voir instables de ceux-ci au sein de la matrice poreuse^{1,2}. On peut ainsi concevoir des systèmes à libération prolongée ou contrôlée³⁻⁸. Les études par spectroscopie Raman présentées dans les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence des états physiques de l'ibuprofène confiné par broyage allant de l'état amorphe à des états nanostructurés. Ces états physiques sont très dépendants de la fréquence de broyage et du type des matrices mésoporeuses utilisées (SBA-15 ou SBA-15-NH₂). Dans ce chapitre, les profils de libération dans un milieu acide (pH =1) de l'ibuprofène confiné seront présentés et interprétés en fonction des conditions expérimentales de chargement (fréquence de broyage, et type des matrices mésoporeuses utilisé) en faisant le lien avec les résultats précédemment présentés sur les états physiques de l'ibuprofène confiné.

V.1 Conditions expérimentales

Les expériences de libération de l'ibuprofène sont généralement effectuées dans des milieux dont le pH est aux alentours de 7⁹⁻¹² et dans des milieux à pH acide^{2,9,10,12-14}. Ces milieux permettent de simuler respectivement un milieu intestinal et un milieu gastrique. Néanmoins, l'ibuprofène possède une cinétique de libération particulièrement rapide dans un milieu à pH = 7^{15,16}. Cette particularité a nécessité de réaliser les expériences de libération dans un milieu acide (solution d'acide chlorhydrique à 0.1 molaire, pH = 1) dans lequel

l'ibuprofène se libère moins rapidement^{15,16}, afin de mettre en évidence des différences des profils de libération.

Les expériences de libération ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre UV. Le pic d'absorbance de l'ibuprofène se situant à 220 nm, les acquisitions ont été enregistrées à chaque fois dans une gamme spectrale allant de 200 à 250 nm. Il est important de rappeler ici, que durant ces expériences de libération les conditions Sink (Chapitre II) ont été respectées afin d'éviter un ralentissement de la dissolution dû à une saturation du milieu. En plus, toutes les expériences de libération ont été réalisées sur des composites à base de 35% en masse d'ibuprofène. Ceci permet non seulement d'avoir la cinétique de libération de l'ibuprofène totalement confiné mais également de pouvoir comparer les profils entre eux dans la mesure où le taux de chargement a une influence sur l'état physique du principe actif et donc sur la libération¹⁵. Ces expériences de libération ont été répétées 3 fois (n=3).

V.2 Libération de l'ibuprofène confiné à 30 Hz

V.2.1 Confinement dans les SBA-15

Le profil de libération du composite broyé à 30Hz et noté 35%IBP:SBA-15(30Hz) a été étudié et tracé sur la Figure 64. Cette figure met en évidence une libération s'effectuant en deux grandes étapes. La première étape correspond à une libération très rapide aux premiers instants de l'expérience suivie d'une deuxième étape dans laquelle la libération est plus lente. Ce comportement a déjà été observé dans la littérature^{2,10,14,17,18}. L'effet de libération rapide est appelée « Burst effect »¹⁹⁻²² et correspond à la libération des molécules qui se situent au cœur des canaux. En effet, la pénétration du solvant dans les pores facilite la diffusion de ces molécules vers le milieu. La seconde étape de libération est plus lente et est relative aux molécules d'ibuprofène interagissant avec les groupements silanol (...Si-OH) de la surface interne des matrices mésoporeuses. Il est important de noter ici que l'écart type

des premiers points de l'expérience est important. En effet la libération aux premiers instants est tellement rapide qu'un simple décalage du temps de prélèvement pour la mesure fait varier énormément le taux d'ibuprofène libéré.

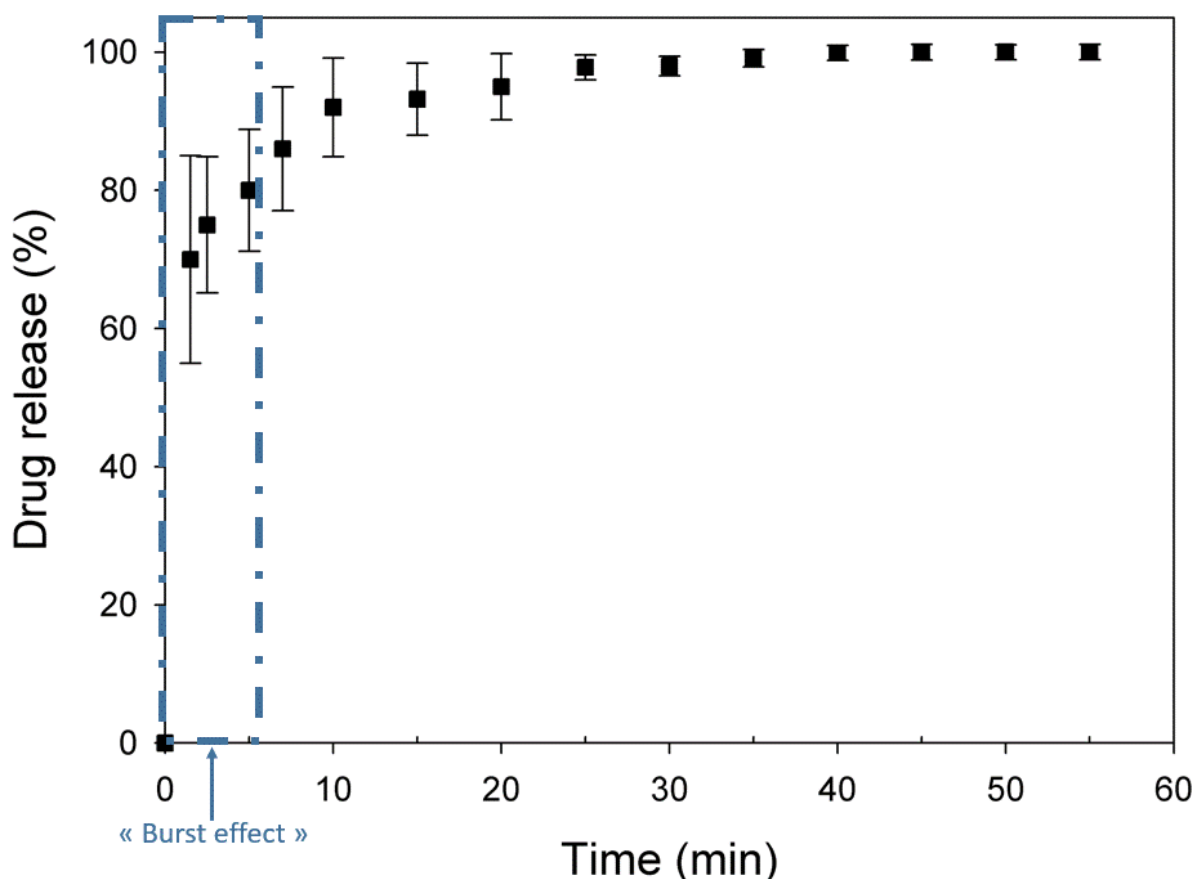


Figure 64: Profil de libération du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz). Moyenne $\pm$ écart type, $n=3$. « Burst effect » correspond à la libération rapide de l'ibuprofène en contact avec le solvant.

V.2.2 Confinement dans les SBA-15-NH₂

Le profil de libération du composite 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz) est présenté sur la

Figure 65. Le profil de libération du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz) est également représenté en vue de déterminer l'effet de la fonctionnalisation sur la libération. On observe que les deux profils suivent les mêmes étapes de libération. C'est-à-dire une première libération rapide « burst effect » suivie d'une libération plus ou moins lente. Bien que ces deux profils possèdent le

même comportement qu'on retrouve dans les systèmes confinés, il existe une légère différence entre ces deux courbes. En effet, cette figure met en évidence une libération plus lente pour l'ibuprofène confiné dans les SBA-15-NH₂. Ceci peut être expliqué par la présence des nanocristaux dans le composite 35%IBP: SBA-15-NH₂(30Hz)²³ comme cela a pu être démontré dans le chapitre IV qui induirait un retardement de la libération dû au temps nécessaire pour dissoudre le cristal. On rappelle ici que l'ibuprofène au sein du composite 35%IBP:SBA-15(30Hz) est totalement amorphe¹ (chapitre III).

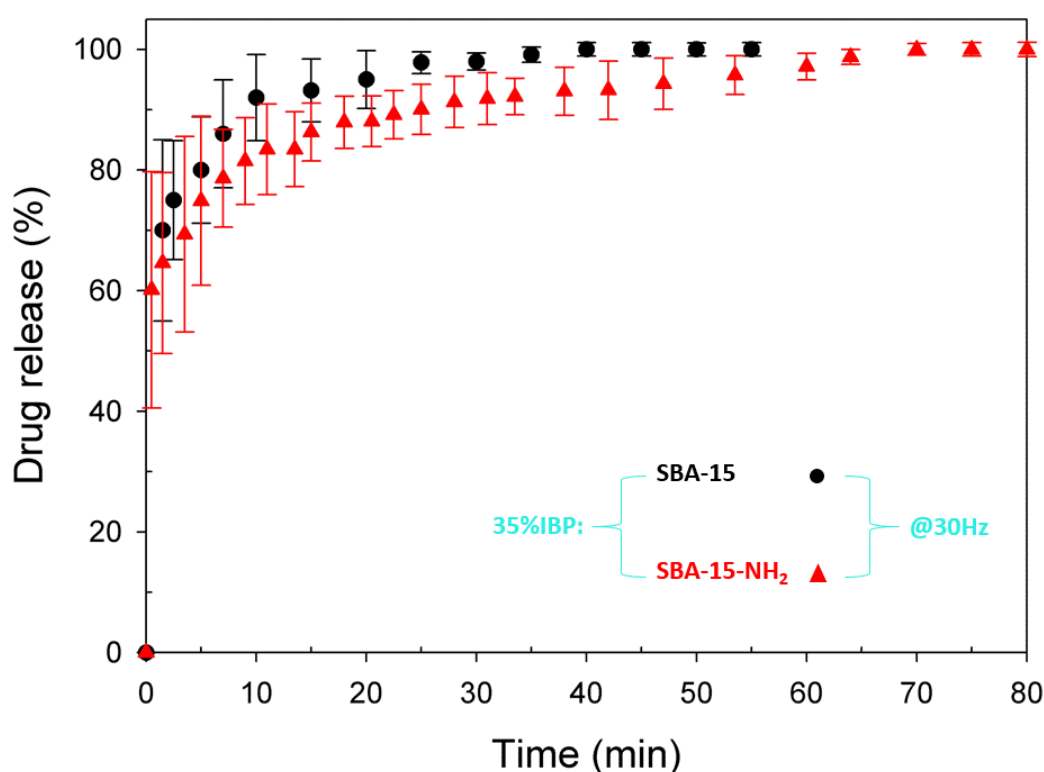


Figure 65: Profils de libération des composites 35%IBP:SBA-15(30Hz) et 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz)

V.3 Libération de l'ibuprofène confiné à 10 Hz

Afin de déterminer l'effet de la fréquence de broyage sur la libération, les profils de libération des composites 35%IBP:SBA-15(10Hz) et 35%IBP:SBA-15-NH₂(10Hz) ont été étudiés et comparés aux profils de libération des mêmes composites préparés à 30 Hz. Les résultats sont tracés sur la Figure 66. Afin de faciliter la lecture de cette Figure 66, chaque point expérimental est représenté

par la moyenne de trois mesures ($n=3$). Les profils de libération des composites 35%IBP:SBA-15(30Hz) et 35%IBP:SBA-15(10Hz) sont tracés sur la Figure 66.a. Cette Figure 66 montre deux comportements de libération différents qui semblent être dépendants de la fréquence de broyage. Afin de bien illustrer cette différence, le temps nécessaire pour libérer 80% d'ibuprofène a été étudié. Pour le composite 35%IBP:SBA-15(30Hz), totalement amorphe¹, 80% d'IBP est libéré après seulement 5 min. Ceci montre la libération très rapide de l'ibuprofène dès les premiers instants de l'expérience. Le même taux d'IBP est cette fois libéré après 15 min pour le composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) partiellement amorphe²³. Ce comportement a été également observé sur les profils de libération des composites 35%IBP:SBA-15-NH₂ présentés sur la Figure 66.b. En effet, 80% d'IBP est libéré après une vingtaine de minutes du début de l'expérience pour le composite broyé à 10 Hz tandis que cela prend seulement 10 minutes environ, pour le composite broyé à 30 Hz. Ce comportement dû à la fréquence de broyage et observé sur deux types de matrices mésoporeuses (SBA-15 et SBA-15-NH₂) est induit par la taille des particules qui comme il a été vu dans le chapitre III est impactée par la fréquence de broyage. En effet, comme schématisé sur la Figure 67, le broyage à 30 Hz réduit la taille des particules des SBA-15 et de ce fait la longueur des canaux cylindriques, ce qui induit une libération rapide vers le milieu. Tandis qu'un broyage à 10 Hz préserve plus ou moins la taille des canaux. Cette conséquence due à la fréquence de broyage, couplée à l'état amorphe de l'ibuprofène confiné, induit une diffusion rapide dans le cas d'un cobroyage à 30 Hz alors qu'une libération plus progressive est observée dans le cas d'un cobroyage à 10 Hz. La Figure 67 rappelle l'état physique de l'ibuprofène confiné selon la fréquence de broyage qui a été discuté dans le chapitre III.

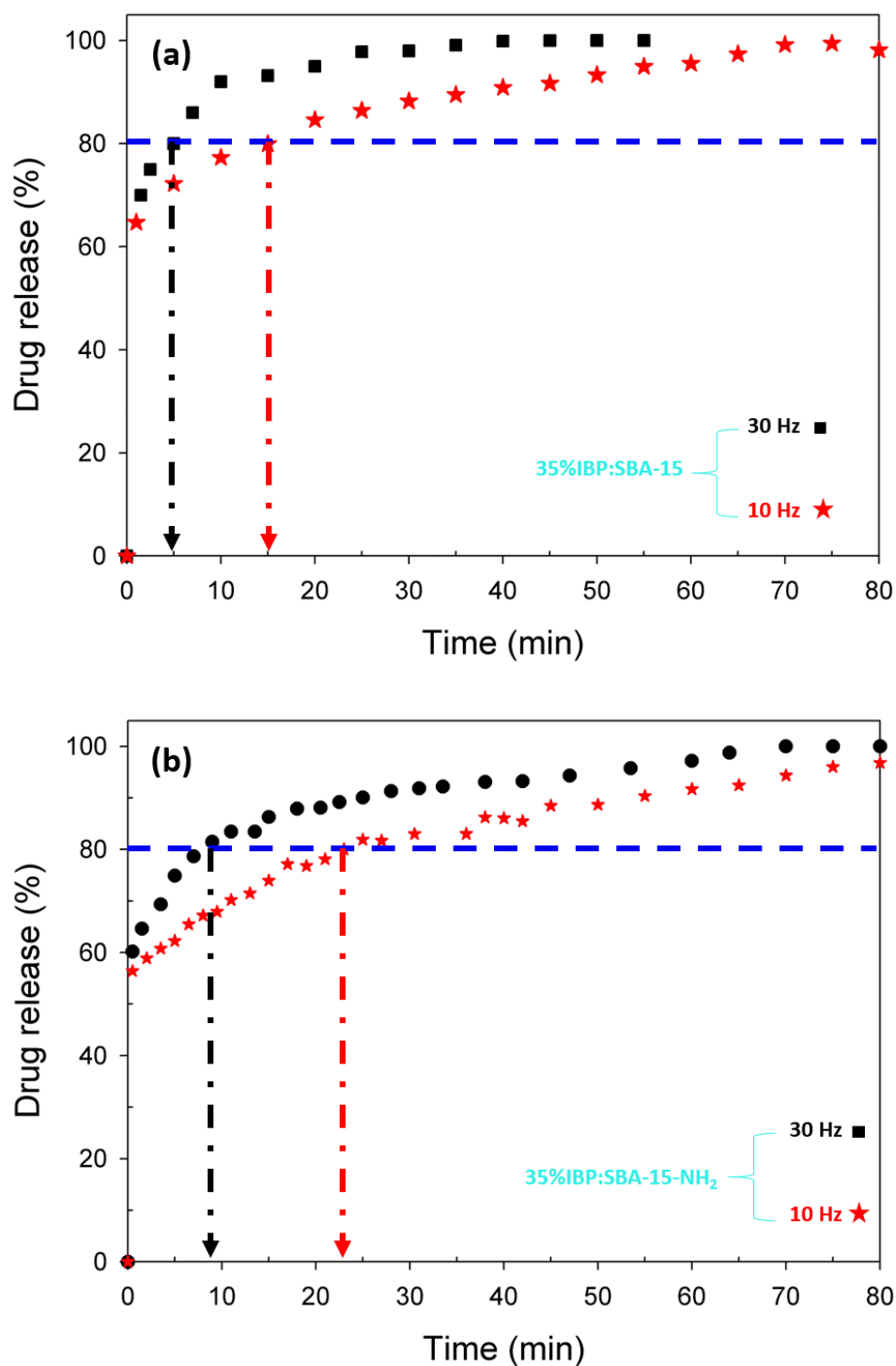


Figure 66: Effet de la fréquence de broyage sur la libération. a) Profils de libération des deux composites 35%IBP:SBA-15(30Hz) et 35%IBP:SBA-15(10Hz) et b) Profils de libération des deux composites 35%IBP:SBA-15-NH₂(30Hz) et 35%IBP:SBA-15-NH₂(10Hz). La ligne en pointillée à 80% de libération met en évidence la libération prolongée pour les composites broyés à 10 Hz.

En effet, comme schématisé sur la Figure 67, le broyage à 30 Hz réduit la taille des particules des SBA-15 et de ce fait la longueur des canaux cylindriques, ce qui induit une libération rapide vers le milieu. Tandis qu'un broyage à 10 Hz préserve plus ou moins la taille des canaux. Cette conséquence due à la fréquence de broyage, couplée à l'état amorphe de l'ibuprofène confiné, induit une diffusion rapide dans le cas d'un cobroyage à 30 Hz alors qu'une libération plus progressive est observée dans le cas d'un cobroyage à 10 Hz. La Figure 67 rappelle l'état physique de l'ibuprofène confiné selon la fréquence de broyage qui a été discuté dans le chapitre III.

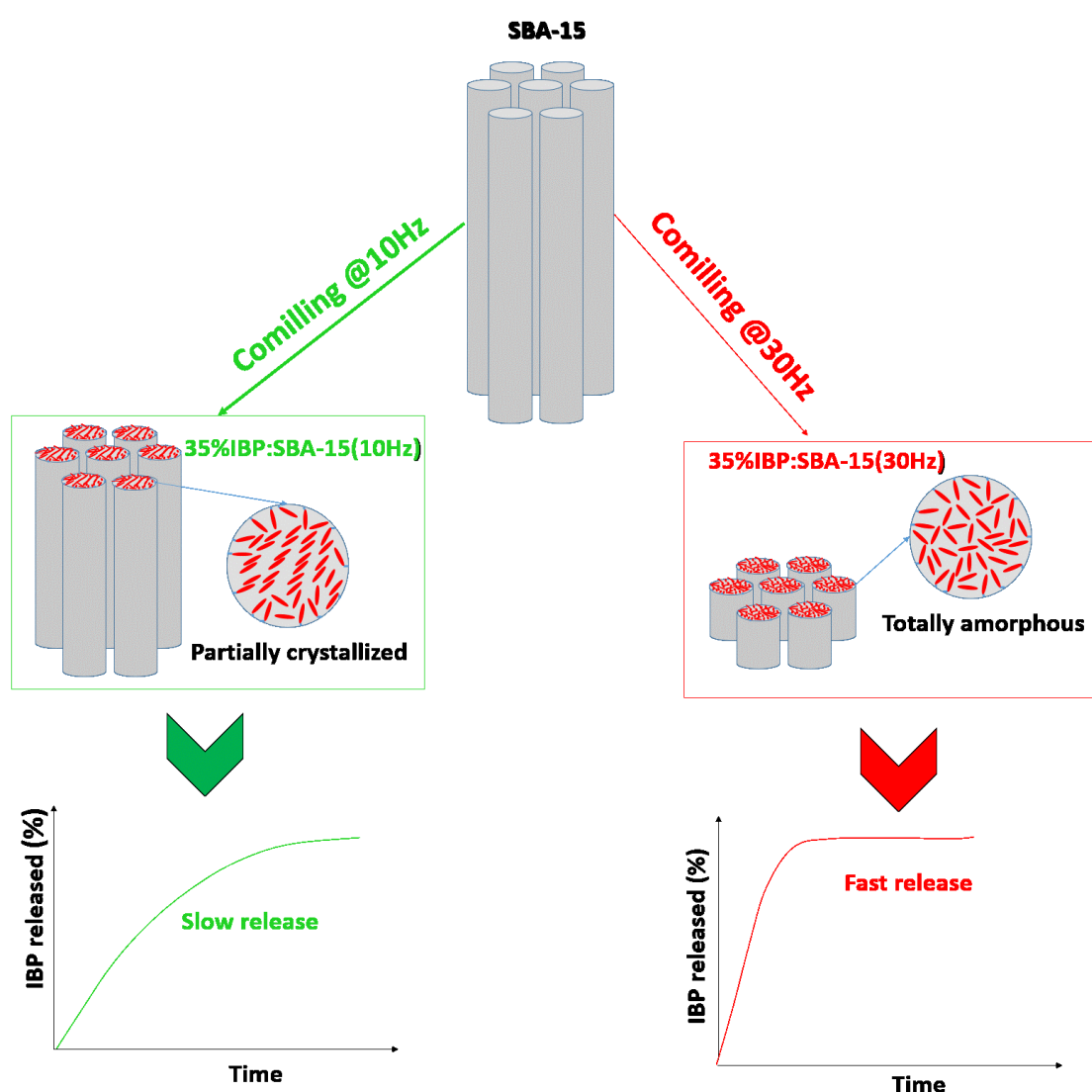


Figure 67: Schéma présentant l'effet de la fréquence de broyage sur la taille des canaux des SBA-15 et montrant l'état de l'ibuprofène confiné ainsi que sa libération.

V.4 Conclusion

Dans ce chapitre, l'effet de la fonctionnalisation des matrices mésoporeuses et l'effet de la fréquence de broyage sur la libération ont été étudiés. Il a été montré que la taille des particules des SBA-15 et particulièrement la longueur des canaux est un paramètre important qui modifie les profils de libération. En effet, les résultats montrent qu'un confinement à 10 Hz permet une libération progressive de l'ibuprofène contrairement à un confinement à 30 Hz qui induit une libération très rapide vers le milieu. Ceci a été interprété par la réduction importante de la longueur des canaux lors d'un broyage à 30 Hz. Ce comportement a été observé lors des travaux de thèse de B.Malfait lors d'une étude comparant les profils de libération de l'ibuprofène chargé par solution et de l'ibuprofène confiné par broyage à 30 Hz¹⁵.

Bien que la fonctionnalisation et la fréquence de broyage impactent l'état physique de l'ibuprofène confiné, leur effet sur la libération demeure négligeable. Afin de concevoir un système à libération prolongée, une des pistes qui peut être explorée à cet effet consiste en l'enrobage des particules de silice chargée par une pellicule de polymère biodégradable qui assurera la libération prolongée par érosion de la matrice²⁴⁻²⁷.

Références

1. Malfait B, Correia NT, Mussi A, Paccou L, Guinet Y, Hédoux A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;277:203-207. doi:10.1016/j.micromeso.2018.10.022
2. Malfait B, Correia NT, Ciotonea C, et al. Manipulating the physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: Impact of the loading degree. *J Chem Phys*. 2020;153(15):154506. doi:10.1063/5.0020992
3. Pathan S, Solanki P, Patel A. Functionalized SBA-15 for controlled release of poorly soluble drug, Erythromycin. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2018;258:114-121. doi:10.1016/j.micromeso.2017.09.012
4. Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M. A molecular model to explain the controlled release from SBA-15 functionalized with APTES. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2014;195:43-49. doi:10.1016/j.micromeso.2014.04.019
5. Doadrio AL, Sousa EMB, Doadrio JC, Pérez Pariente J, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004;97(1):125-132. doi:10.1016/j.jconrel.2004.03.005
6. Yu H, Zhai QZ. Mesoporous SBA-15 molecular sieve as a carrier for controlled release of nimodipine. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009;123(1-3):298-305. doi:10.1016/j.micromeso.2009.04.013
7. Tian B, Liu S, Wu S, et al. pH-responsive poly (acrylic acid)-gated mesoporous silica and its application in oral colon targeted drug delivery for doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;154:287-296. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.024
8. Gao Q, Xu Y, Wu D, Sun Y, Li X. pH-Responsive Drug Release from Polymer-Coated Mesoporous Silica Spheres. *J Phys Chem C*. 2009;113(29):12753-12758. doi:10.1021/jp9043978
9. Charnay C, Bégu S, Tourné-Péteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoisselle JM. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57(3):533-540. doi:10.1016/j.ejpb.2003.12.007

10. Hwang DH, Lee D, Lee H, Choe D, Lee SH, Lee K. Surface functionalization of SBA-15 particles for ibuprofen delivery. *Korean J Chem Eng.* 2010;27(4):1087-1092. doi:10.1007/s11814-010-0225-4
11. Lang Y, Finn DP, Pandit A, Walsh PJ. Pharmacological activity of ibuprofen released from mesoporous silica. *J Mater Sci: Mater Med.* 2012;23(1):73-80. doi:10.1007/s10856-011-4488-z
12. Ofokansi KC, Kenekwukwu FC. Formulation Development and Evaluation of Drug Release Kinetics from Colon-Targeted Ibuprofen Tablets Based on Eudragit RL 100-Chitosan Interpolyelectrolyte Complexes. *ISRN Pharmaceutics.* 2013;2013:1-8. doi:10.1155/2013/838403
13. Mellaerts R, Jammaer JAG, Van Speybroeck M, et al. Physical State of Poorly Water Soluble Therapeutic Molecules Loaded into SBA-15 Ordered Mesoporous Silica Carriers: A Case Study with Itraconazole and Ibuprofen. *Langmuir.* 2008;24(16):8651-8659. doi:10.1021/la801161g
14. Izquierdo-Barba I, Sousa E, Doadrio JC, et al. Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2009;50(3):421-429. doi:10.1007/s10971-009-1932-3
15. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques.* These de doctorat. Université de Lille (2018-2021); 2019. Accessed September 18, 2023. <https://theses.fr/2019LILUR051>
16. Xu W, Gao Q, Xu Y, et al. Controllable release of ibuprofen from size-adjustable and surface hydrophobic mesoporous silica spheres. *Powder Technology.* 2009;191(1):13-20. doi:10.1016/j.powtec.2008.09.001
17. Shen S, Ng WK, Chia L, Dong Y, Tan RBH. Stabilized Amorphous State of Ibuprofen by Co-Spray Drying With Mesoporous SBA-15 to Enhance Dissolution Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010;99(4):1997-2007. doi:10.1002/jps.21967
18. Gackowski M, Ruggiero-Mikołajczyk M, Duraczyńska D, Hinz A, Bzowska M, Szczepanowicz K. The role of water in the confinement of ibuprofen in SBA-15. *J Mater Chem B.* 2021;9(36):7482-7491. doi:10.1039/D1TB01498F
19. Yoo J, Won YY. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(11):6053-6062. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c01228

20. Mohsenzadeh E, Khenoussi N, Hekmati AH, et al. Influence of SBA-15-type ordered mesoporous silica on ibuprofen loading and releasing of electrospun polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Textile Engineering & Fashion Technology*. Published online January 2019. doi:10.15406/jteft.2019.05.00174
21. Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, et al. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;344(1):53-61. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.05.066
22. Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*. 2004;27(1):1-12. doi:10.1007/BF02980037
23. Moutamenni B, Tabary N, Mussi A, et al. Milling-Assisted Loading of Drugs into Mesoporous Silica Carriers: A Green and Simple Method for Obtaining Tunable Customized Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):390. doi:10.3390/pharmaceutics15020390
24. Ouerghemmi S, Degoutin S, Maton M, et al. Core-Sheath Electrospun Nanofibers Based on Chitosan and Cyclodextrin Polymer for the Prolonged Release of Triclosan. *Polymers*. 2022;14(10):1955. doi:10.3390/polym14101955
25. Bibi A, Sadiq-ur-Rehman, Akhtar T, Akhtar K, Farooq M, Shahzad MI. Alginate-chitosan/MWCNTs nanocomposite: a novel approach for sustained release of Ibuprofen. *J Polym Res*. 2020;27(12):363. doi:10.1007/s10965-020-02342-8
26. Patel BK, Parikh RH, Aboti PS. Development of Oral Sustained Release Rifampicin Loaded Chitosan Nanoparticles by Design of Experiment. *Journal of Drug Delivery*. 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/370938
27. Sobocinski J, Laure W, Taha M, et al. Mussel Inspired Coating of a Biocompatible Cyclodextrin Based Polymer onto CoCr Vascular Stents. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(5):3575-3586. doi:10.1021/am405774v

Chapitre VI : Apport de la méthode de chargement à l'état solide (MAL) des molécules et des biomolécules : Stabilité des nanocristaux confinés, confinement d'acides aminés hydrophobes et de protéines dans les matrices de silice mésoporeuses

La méthode de chargement à l'état solide connue sous le nom de MAL pour Milling-Assisted Loading a été développée au sein du laboratoire UMET en 2019¹. L'optimisation de cette méthode, en particulier la fréquence de broyage, a fait l'objet des premiers chapitres de ce manuscrit. La première partie de ce chapitre sera consacrée à l'apport de la méthode de chargement par broyage sur la compréhension des propriétés physiques de la matière confinée à l'état solide, en particulier la stabilité des nano-cristaux. Il est notable que cette étude ne peut être effectuée qu'après chargement du matériau à l'état solide pour des diamètres de pores inférieurs à 10 nm. Il a été montré dans le chapitre III que le cobroyage à 10 Hz de l'ibuprofène avec les matrices de silice mésoporeuses permet de confiner jusqu'à 42% en masse d'ibuprofène dans un état où l'amorphe (Liquide sous-refroidi) et les nanocristaux coexistent. L'étude de la stabilité de ces nanocristaux confinés sera présentée dans ce chapitre.

Un autre apport de la méthode MAL concerne le confinement des matériaux hydrophobes et des matériaux biomoléculaires. En effet, les matrices de silice mésoporeuses ont suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs afin de les utiliser en tant que matrices hôtes pour le confinement et la stabilisation des enzymes²⁻⁷ mais également pour concevoir des systèmes de libération pour les protéines⁸⁻¹¹. Aujourd'hui, les travaux reportés dans la littérature montrent des méthodes

de chargement qui reposent essentiellement sur la mise en solution de la protéine avec les matrices mésoporeuses. Ce procédé nécessite la modification du pH du milieu pour favoriser les interactions électrostatiques attractives entre la protéine et les matrices. Néanmoins, la modification du pH du milieu peut être source de dénaturation de la protéine. Afin de s'affranchir de ce problème, la méthode de chargement par broyage sera appliquée à une protéine modèle choisie pour effectuer cette étude : le lysozyme. Une étape préliminaire au confinement du lysozyme a été de confiner le principal acide aminé (L-tryptophane, L-trp) constituant la protéine.

Ainsi, ce chapitre s'articulera en trois sous parties. La première sera consacrée à l'étude de la stabilité des nanocristaux d'ibuprofène confiné. La deuxième sera dédiée à l'étude de confinement par broyage de l'acide aminé L-tryptophane, et la dernière à l'étude de confinement du lysozyme.

VI.1 Stabilité des nanocristaux confinés

Le cobroyage à 10 Hz de l'ibuprofène avec les SBA-15 a permis de confiner l'ibuprofène dans un état physique mixte où la matière nanocristalline coexiste avec la matière amorphe dans des proportions dépendant de la concentration d'ibuprofène. Cette proportion peut être détectée facilement en traçant les spectres basse-fréquence tracés sur la Figure 68 pour une concentration massique d'ibuprofène variant de 20 à 35 %. En dessous de 20 % le signal Raman de l'ibuprofène devient très bruité vu la faible quantité analysée. Le domaine très basse fréquence localisé par le cadre dans la Figure 68, fait ressortir la contribution de l'ibuprofène amorphe, via la composante quasiélastique inhérente à l'état liquide sous-refroidi.

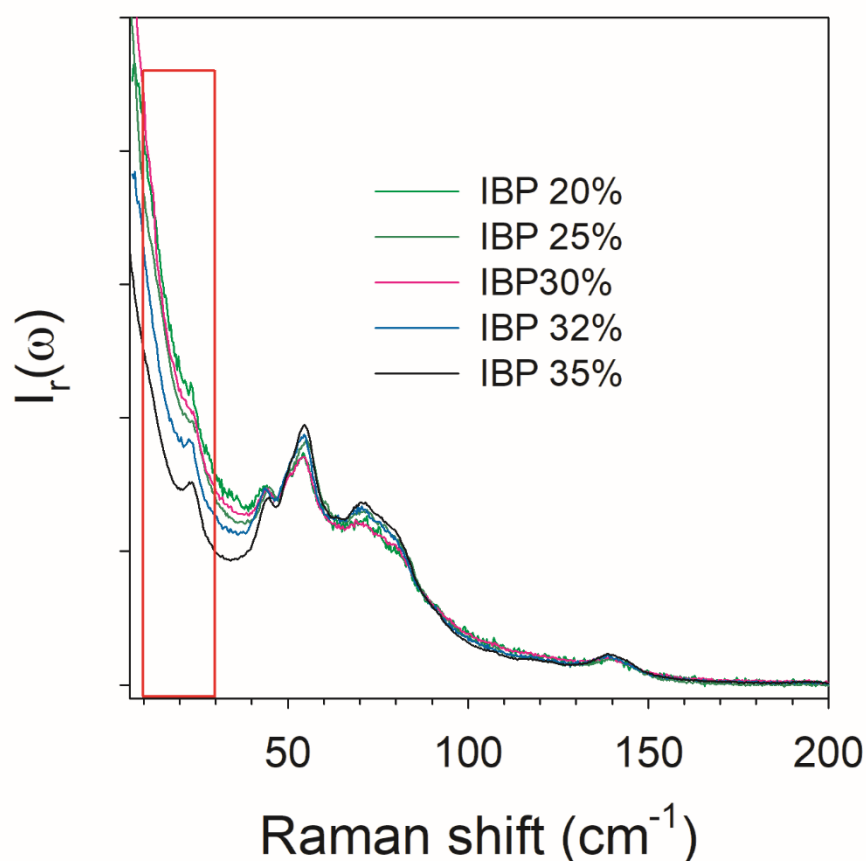


Figure 68: Spectres Raman basse-fréquence collectés dans les composites immédiatement après chargement à l'état solide pour différentes concentrations d'ibuprofène.

De récentes études¹² menées sur l'indométacine confiné dans des matrices MCM-41 en utilisant la méthode « MAL » ont révélé un phénomène de croissance des nano-cristaux à l'intérieur des pores puis un phénomène de dissolution des nano-cristaux qui devenaient instables. Cette instabilité a été interprétée comme résultant d'une surface spécifique très élevée imposée par la géométrie du confinement. De ce fait des études cinétiques ont été réalisées sur les composites de concentration massique en ibuprofène variant de 20 à 35 %. Les spectres collectés à température ambiante sont présentés sur la Figure 69.

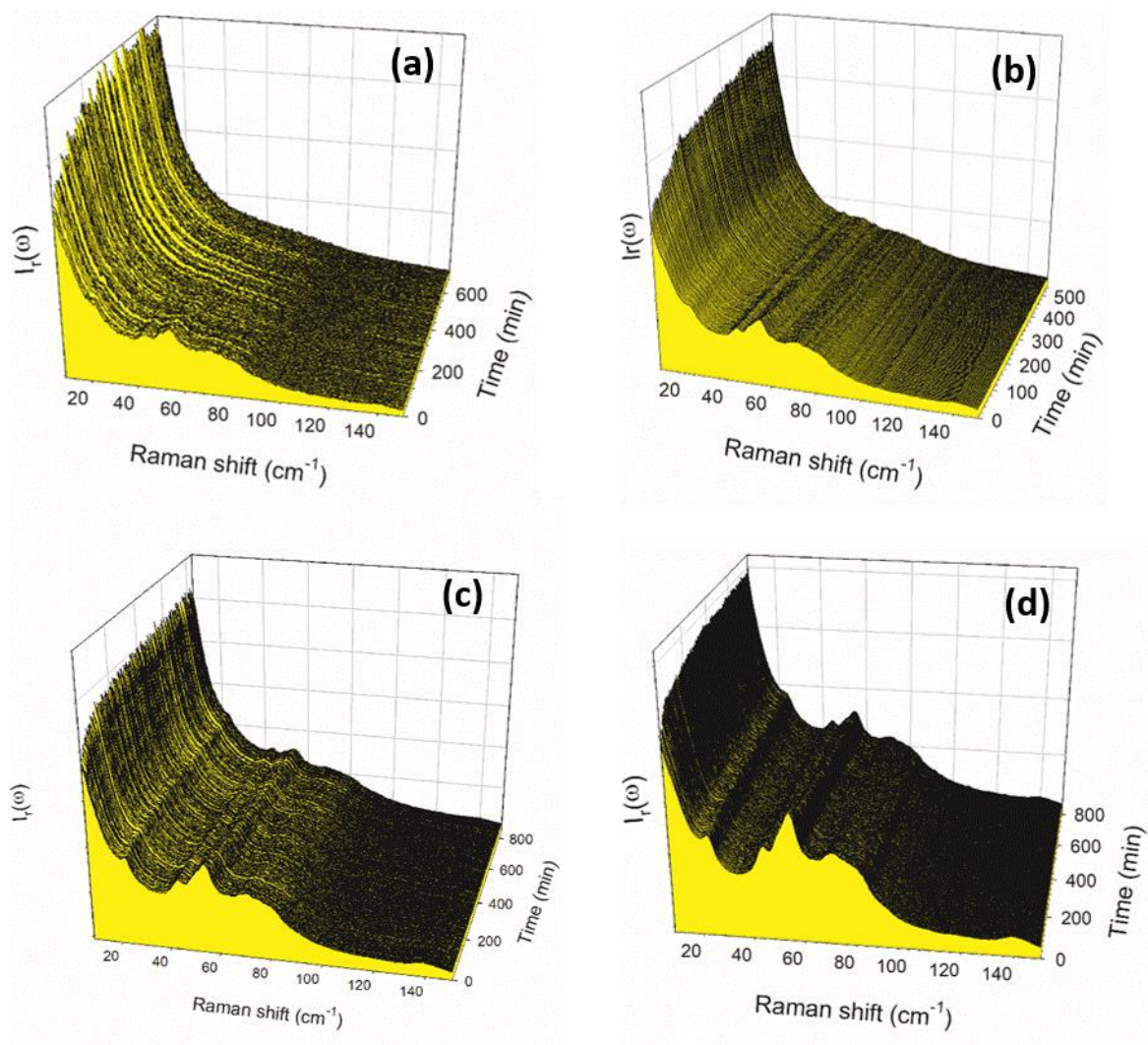


Figure 69: Évolution temporelle du spectre Raman basse-fréquence collecté à température ambiante dans les composites contenant a) 20%, b) 25%, c) 30% et d) 35% d'ibuprofène

Une analyse visuelle de la Figure 69 permet de relever des modifications spectrales communes aux 3 composites. On remarque d'abord une augmentation en fonction du temps de l'intensité quasiélastique à très basse fréquence marquant la transformation des nanocristaux vers l'état liquide sous-refroidi, dans la mesure où la température reste constante. On observe également un élargissement notable des modes de réseau qui indique une diminution du volume cristallin, confirmant ainsi le passage des nano-cristaux à l'état amorphe. La totalité du volume nanocristallin est pratiquement transformée dans le composite contenant la plus faible concentration en

ibuprofène (20%), alors que pour le composite contenant 35% d'ibuprofène, la matière nanocristalline donne une contribution significative au spectre après 800 minutes, l'intensité quasiélastique n'augmentant quasiment plus. Les spectres des composites de concentrations extrêmes, 20 et 35 %, ont été tracés en début de cinétique (t_0) et après 20 heures sur la Figure 70 et la Figure 71. La Figure 70 montre clairement l'absence de modes de réseau au bout de 20 heures à température ambiante, ainsi qu'une augmentation significative de l'intensité quasiélastique, confirmant la transformation complète des nanocristaux en matière amorphe liquide sous-refroidi.

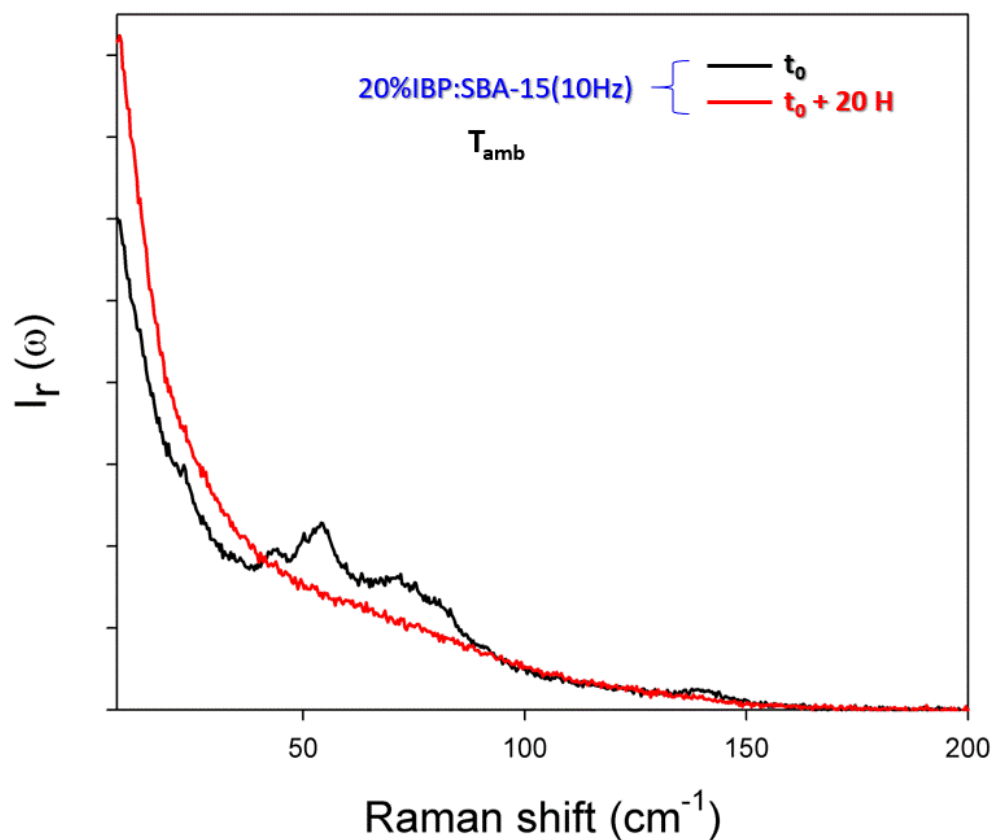


Figure 70 : Spectres Raman à basses fréquences du composite 20%IBP:SBA-15(10Hz) à t_0 (courbe en noire) et à t_0+20H (courbe en rouge)

La Figure 71 montre à contrario une transformation incomplète des nanocristaux, 20 heures après la préparation du composite, via l'observation des modes de réseau coexistant avec une composante quasiélastique amplifiée par rapport à celle détectée à t_0 .

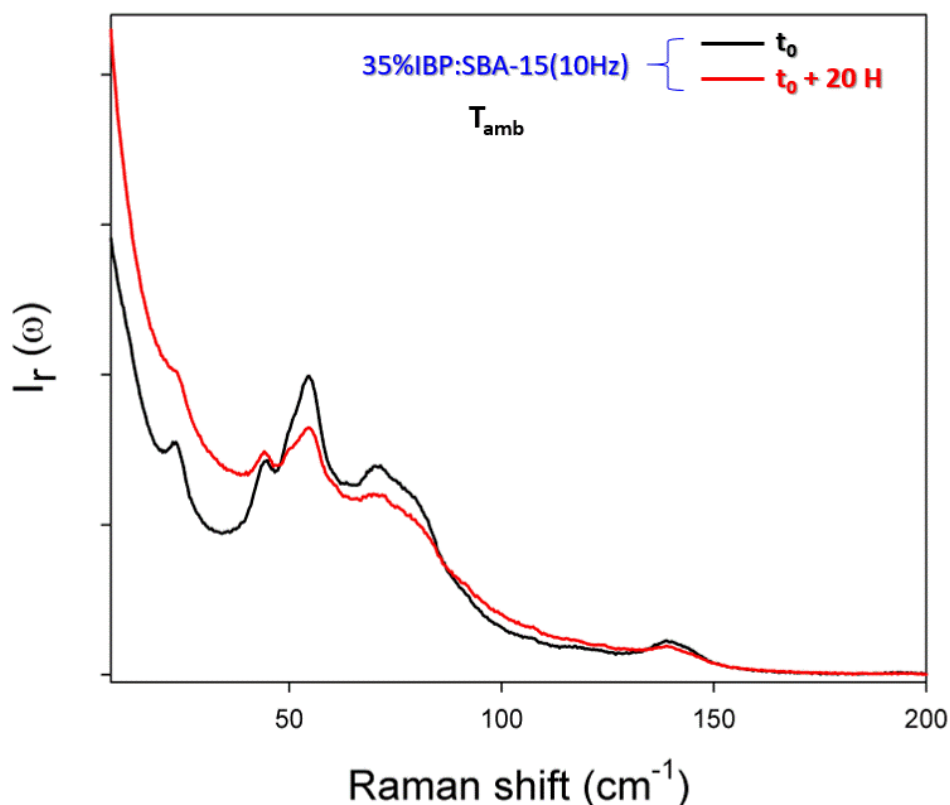


Figure 71: Spectres Raman à basses fréquences du composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) à t_0 et à t_0+20H

Le composite contenant 20% d'ibuprofène a été analysé par DSC, afin de mieux décrire la transformation des nano-cristaux, compte tenu que la Figure 69.a montre une transformation complète des nano-cristaux vers l'état liquide sous-refroidi. Le thermogramme correspondant est présenté sur la Figure 72.

Cette figure montre un pic endothermique tronqué aux premiers instants d'acquisition, confirmant une transformation très étalée observée par spectroscopie Raman. La nature de cette transformation lente ne peut donc pas être décrite comme une fusion mais plutôt comme une dissolution des nano-cristaux dans le liquide sous-refroidi qui débiterait certainement au cours du chargement.

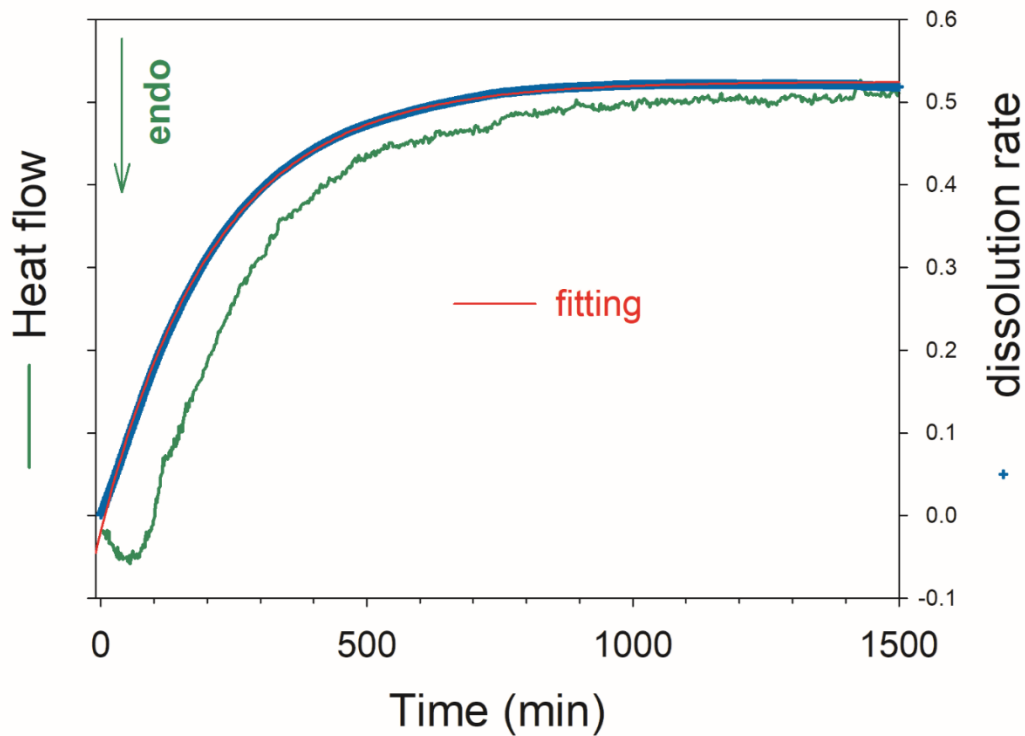


Figure 72: Thermogramme du composite 20%IBP:SBA-15(10Hz) à la température ambiante, collecté pendant 25 heures (Courbe verte). Taux de dissolution obtenu en normalisant l'aire sous le pic endothermique à un instant t par l'aire totale du pic endothermique (Courbe bleue). Une procédure d'ajustement du taux de dissolution a été effectuée à partir de l'équation Noyes & Whitney¹³ (Courbe rouge)

La cinétique de transformation peut être interprétée à partir de l'équation Noyes & Whitney¹³ énoncé ci-dessous :

$$\frac{dc}{dt} = K \cdot (C_s - c)$$

21

K, étant considéré comme une constante qui s'exprime comme :

$$K = \frac{D \cdot S}{V \cdot h}$$

22

D correspondant au coefficient de diffusion, S la surface spécifique, V le volume du milieu de dissolution et h l'épaisseur de la couche de diffusion. C_s correspond à la solubilité saturée.

La courbe DSC a été convertie en taux de transformation en normalisant l'aire sous le pic endothermique à un instant t par l'aire totale du pic endothermique. L'endotherme étant tronqué ce taux de transformation ne sera pas réellement égal à la proportion de nano-cristaux convertie à l'état liquide sous-refroidi mais sa variation pourra être considérée comme correspondant à un taux de dissolution. Afin d'ajuster la loi de Noyes & Whitney à ce taux de dissolution, l'équation différentielle a été intégrée permettant d'obtenir la loi cinétique suivante :

$$c = C_s - \alpha \cdot \exp(-Kt)$$

23

Où C_s représente la solubilité saturée, α une constante d'intégration et K la constante précédemment définie. On observe sur la Figure 72 un bon accord ($R=0.9998$) entre les courbes expérimentale et théorique conduisant à la valeur de $K = 0.0047 \pm 7 \times 10^{-5}$. Cet ajustement confirme l'interprétation de nos observations comme correspondant à une cinétique de dissolution des nanocristaux d'ibuprofène dans le liquide sous-refroidi. Ce phénomène est relativement rare bien que récemment observé sur l'indométacine confiné dans une matrice MCM-41 après chargement à l'état solide¹². Les paramètres physiques responsables de ce type de transformation sont contenus dans la constante K exprimée dans l'équation (23).

Afin d'établir les lois des cinétiques de transformation des nanocristaux vers l'état liquide sous-refroidi, des traitements des spectres basse-fréquence tracés sur la Figure 69 ont été réalisés en quantifiant la contribution quasiélastique inhérente au liquide sous-refroidi. Cette composante a été déterminée par intégration du signal dans le domaine très basse fréquence (entre 10 et 30 cm^{-1}) dans lequel la contribution des modes de vibration est négligeable par rapport à celle des mouvements relaxationnels caractéristiques du liquide

d'ibuprofène. L'intégration a été effectuée sur chaque spectre collecté au cours des cinétiques pour chaque composite. L'évolution de l'intensité quasiélastique en fonction du temps peut être considérée comme proportionnelle au taux de dissolution des nanocristaux. Les courbes $I_{QES}(t)$ ont été tracées sur la Figure 73 pour les composites étudiés contenant des concentrations massiques d'ibuprofène entre 20 et 35%. La loi 23 a également été utilisée pour ajuster les lois cinétiques expérimentales. Les lois expérimentales et théoriques ajustées sont tracées sur la Figure 73.

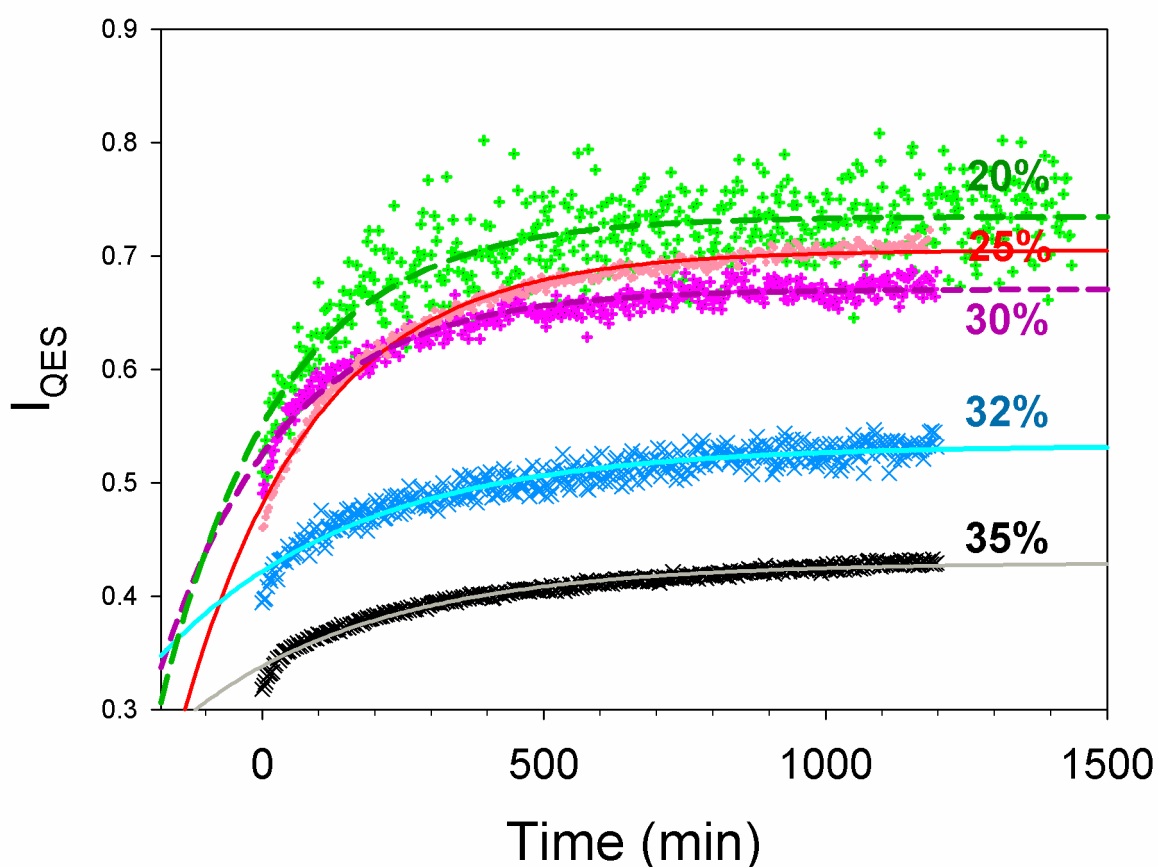


Figure 73: Cinétiques de 24 heures sur des composites avec des concentrations d'ibuprofène allant de 20 à 35% exprimées en fonction de $I_{QES}(t)$. La loi de Noyes & Whitney¹³ a été intégrée puis ajustée aux courbes expérimentales.

La Figure 73 montre une dispersion importante des points expérimentaux déterminés par l'analyse du composite chargé à 20% d'ibuprofène. On note un écart entre les courbes expérimentale et théorique aux premiers instants de

l'analyse qui s'accroît avec la concentration en ibuprofène. Cet écart peut être lié à une légère augmentation de la température causée par le faisceau incident ($P=200$ mW en sortie de laser) qui favoriserait la dissolution des nanocristaux. Les valeurs de la constante K sont reportées dans le tableau 1 pour les différents composites étudiés. On remarque que K décroît significativement lorsque la concentration en ibuprofène est supérieure à 30%.

Concentration massique d'ibuprofène	Facteur de reliabilité R	Valeur de K
20%	0.8276	0.0047 ± 0.0005
25%	0.9945	0.0043 ± 0.00005
30%	0.9695	0.0046 ± 0.0001
32%	0.9580	0.0029 ± 0.0001
35%	0.9930	0.0030 ± 0.00001

Tableau 4 : Valeurs de la constante K pour chaque composite

Afin de déterminer l'origine du phénomène de dissolution des nanocristaux une étude a été menée sur le confinement de l'ibuprofène au sein d'une matrice MCM-41. Compte tenu que la taille des pores et la concentration de la matière confinée ont une influence sur la proportion de nanocristaux confinés, une concentration de 35% d'ibuprofène a été choisie pour cette étude. Les résultats pourront être comparés avec ceux obtenus sur le composite 35%IBP:SBA-15. La dépendance temporelle du spectre basse fréquence du composite 35%IBP:MCM-41(10Hz) est tracé sur la Figure 74. Cette figure montre clairement que le signal du liquide sous-refroidi est prépondérant devant celui des nanocristaux.

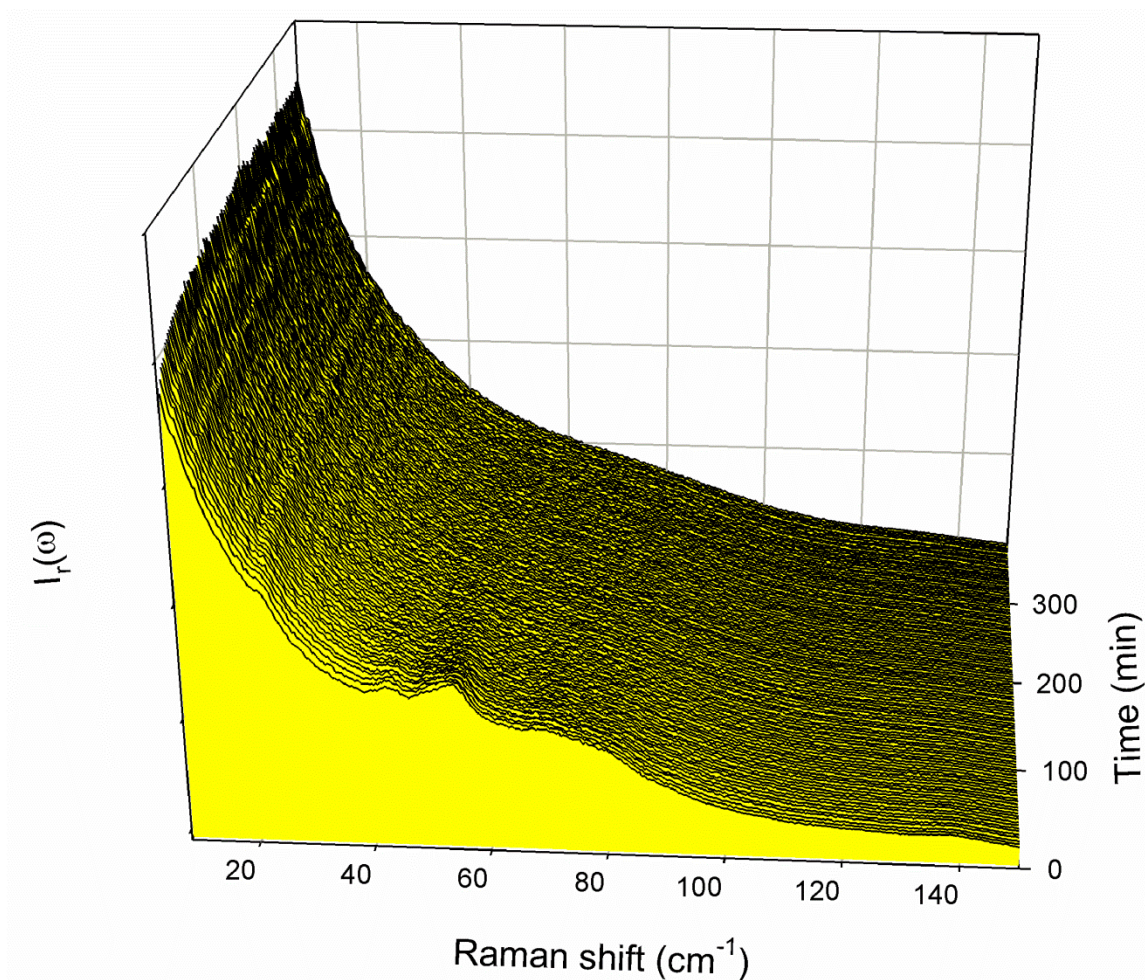


Figure 74: Spectres Raman à basse fréquence collectés lors d'une cinétique du composite 35%IBP:MCM-41(10Hz)

Au bout d'un temps relativement court (inférieur à 300 minutes), le spectre Raman est typique d'un état liquide, avec absence de modes de réseau et forte intensité quasiélastique. Il est intéressant de comparer les spectres des composites contenant 35% d'ibuprofène dans les matrices SBA-15 et MCM-41, aux premiers instants d'acquisition des données (t_0) et aux instants considérés comme fin de transformation (t_f). Ces comparaisons sont présentées sur la Figure 75.

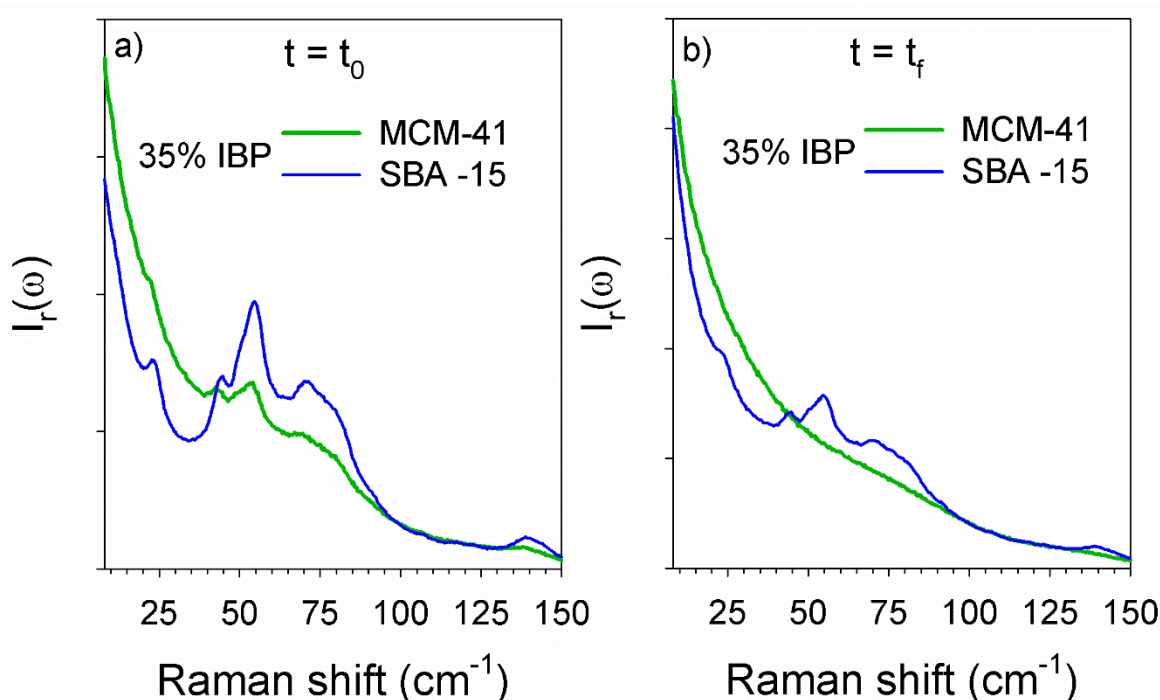


Figure 75: Comparaison des spectres à basse fréquence des composites 35%IBP:SBA-15(10Hz) et 35%IBP:MCM-41(10Hz) à a) $t=t_0$ et à b) $t=t_f$

La Figure 75.a révèle une proportion de nanocristaux beaucoup plus faible dans la matrice MCM-41 que dans la matrice SBA-15. A concentration égale, cette différence résulte uniquement de la géométrie de confinement, en particulier de la taille des pores. La Figure 75.b montre que le spectre du composite IBP :SBA-15 collecté en saturation de solubilité ($t_f = 20$ heures après sa préparation) correspond grossièrement à celui du spectre du composite IBP :MCM-41 collecté juste après sa préparation (Figure 75.a). Il est intéressant de comparer les cinétiques de dissolution des nanocristaux dans les deux composites. Cette comparaison est présentée sur la Figure 76, les données expérimentales obtenues sur le composite 35%IBP :MCM-41 ont également été ajustées par l'équation 23.

On note un bon accord ($R = 0.9883$) entre les données expérimentales et la loi 23 pour le composite IBP :MCM-41 conduisant à la valeur $K = 0.0175 \pm 6.10^{-4}$. Le coefficient K est donc environ 6 fois plus important dans les matrices MCM-41 par rapport aux matrices SBA-15 (voir Tableau 4).

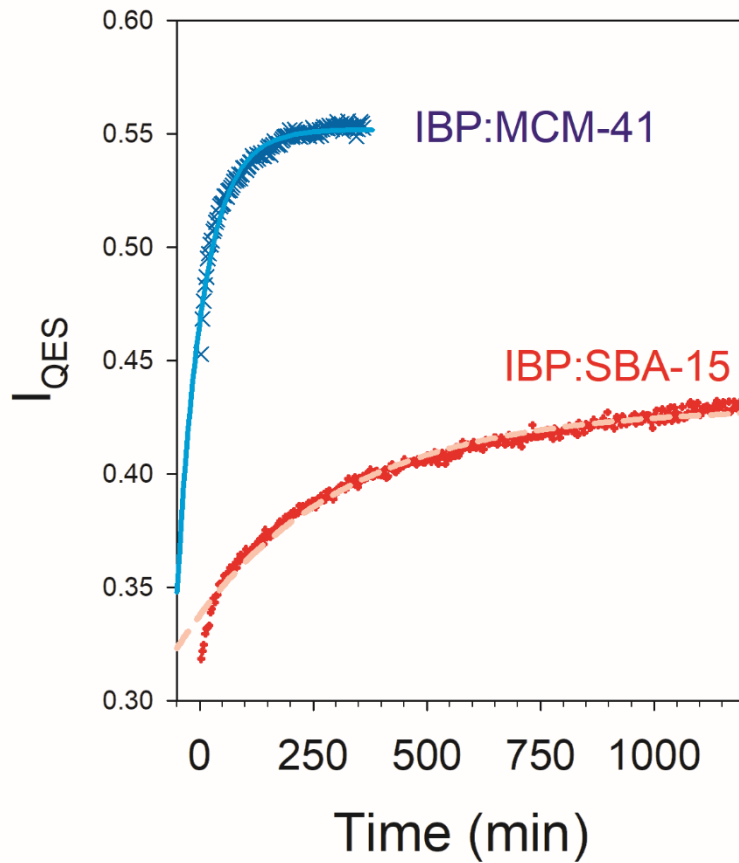


Figure 76: Comparaison des cinétiques de dissolution des nanocristaux des deux composites 35%IBP:MCM-41(10Hz) et 35%IBP:SBA-15(10Hz)

À la vue de l'expression 22 de K, la variation de K peut être considérée comme reflétant principalement celle du rapport $\frac{S}{V}$. On peut considérer que V correspond grossièrement aux volumes des canaux cylindriques et que K varie donc comme $\frac{S}{\varnothing^2}$, $\varnothing$ étant le rayon des pores cylindriques. Si on prend en compte uniquement les caractéristiques des matrices mésoporeuses déterminées expérimentalement (Tableau 5), on obtient

$$\frac{K_{MCM}}{K_{SBA}} \approx 6$$

24

Bien que la surface spécifique ne soit pas exactement celle des nanocristaux, la correspondance des valeurs de K obtenues par ajustement des lois cinétiques et par les caractéristiques physiques des matrices, montre que la

géométrie de confinement est un paramètre qui pilote en partie le phénomène de dissolution des nanocristaux.

Matrice	Surface spécifique	Diamètre de pore
SBA-15	793 m ² /g	7.1 nm
MCM-41	1033 m ² /g	3.6 nm

Tableau 5 : Surfaces spécifiques et diamètres de pore des SBA-15 et des MCM-41.

Une étude plus approfondie de la Figure 76 montre une légère déviation des points expérimentaux par rapport à la loi théorique 20 heures après la préparation du composite 35%IBP:SBA-15. Ceci indique que les nanocristaux continuent à se dissoudre très lentement. Compte tenu de la forme de la courbe expérimentale, la transformation complète des nanocristaux pourrait être observée au bout d'une période 'infiniment' longue, non mesurable. Ceci semble indiquer que la proportion de nanocristaux ne doit pas être trop importante pour que ceux-ci puissent se dissoudre dans un volume de liquide sous-refroidi suffisamment important. Il est également reconnu qu'une surface spécifique trop importante des nanocristaux engendre leur instabilité et favorise leur dissolution. Ce phénomène de dissolution des nanocristaux dans le liquide sous-refroidi n'est certainement pas observable en grand volume.

Ce phénomène de dissolution des nanocristaux a été analysé à partir d'expériences de rayons X couvrant à la fois les domaines des petits et grands angles. Une concentration de 30% a été choisie pour être chargée dans une matrice de SBA-15, dans la mesure où la cinétique de dissolution a été observée sur une période suffisamment longue pour être analysée à l'aide d'une technique qui demande des temps d'acquisition nettement plus importants que ceux correspondant à l'acquisition d'un spectre Raman. De premiers essais ont été réalisés sur un composite de matrice SBA-15 chargé à 30% d'ibuprofène par broyage à 30Hz, ne contenant de ce fait, que du liquide sous-refroidi. Le temps d'acquisition a été estimé à une vingtaine de minutes pour avoir un signal de suffisamment bonne qualité et aussi pour assurer un suivi de la cinétique.

L'intensité diffusée par la matrice SBA-15 et le composite 30%IBP:SBA-15 préparé par broyage à 30 Hz sont tracées sur la Figure 77.

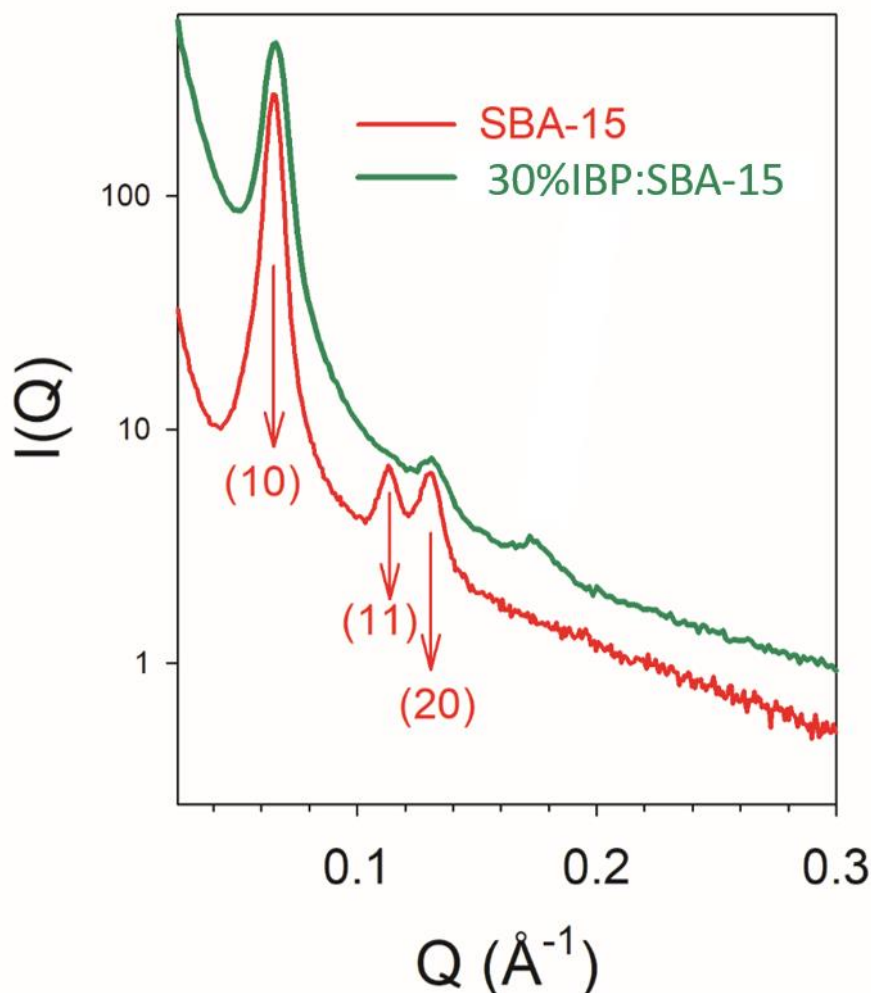


Figure 77: Intensité diffusée par SBA-15 broyé à 30 Hz et 30%IBP:SBA-15 préparé par cobroyage à 30 Hz.

Cette Figure 77 montre les 3 pics de Bragg de la structure bidimensionnelle hexagonale compacte formée par les canaux cylindriques des matrices de silice mésoporeuses SBA-15^{14,15}. Ce réseau hexagonal de symétrie P6mm peut être indexé pour les trois premières raies comme indiqué sur l'insert de la figure. C'est-à-dire : (10) (11) et (20). Uniquement les raies (10) et (20) sont observées dans l'intensité diffusée par le composite. L'absence du pic (11) marque la présence de l'ibuprofène à l'état amorphe. Par contre, on observe clairement un pic large situé à $0.175 \text{ \AA}^{-1}$ correspondant à la position de la raie (21) du réseau

hexagonal de la matrice de silice. Des analyses aux petits angles ont été réalisées également dans l'ibuprofène liquide sous-refroidi à l'intérieur d'un capillaire. L'intensité diffusée par l'ibuprofène est présentée sur la Figure 78.

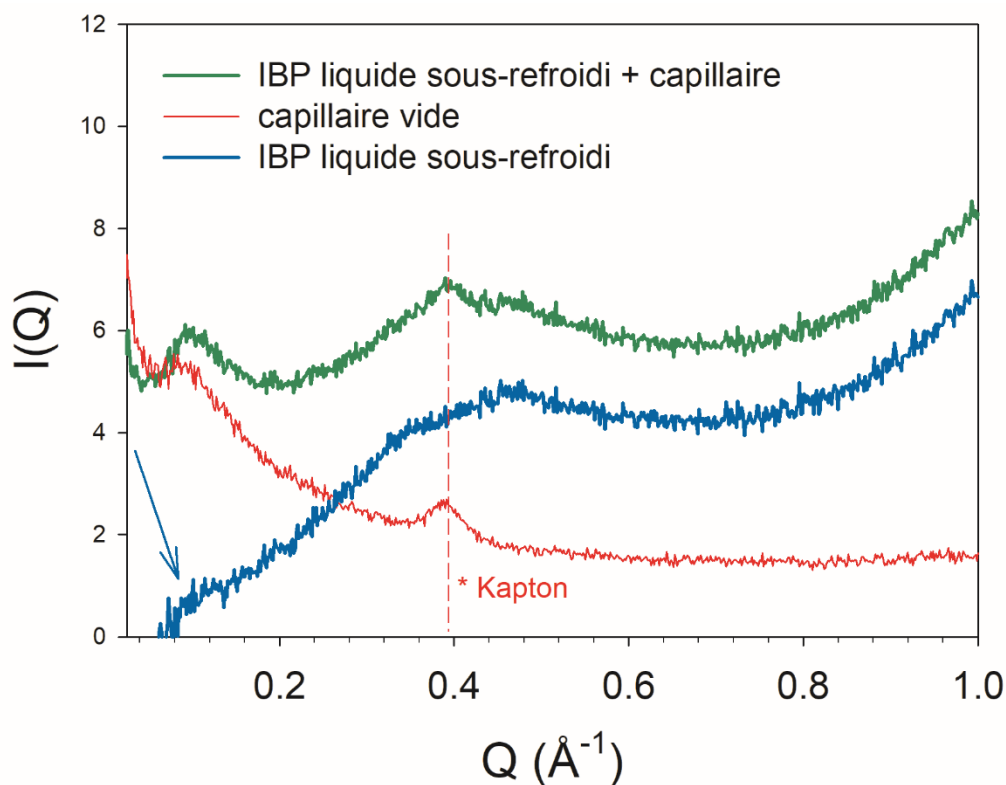


Figure 78: Intensité diffusée par l'ibuprofène liquide sous-refroidi obtenue après soustraction de l'intensité diffusée par le capillaire de l'intensité diffusée par le capillaire contenant l'ibuprofène

Le profil de l'intensité diffusée par l'ibuprofène seul a été obtenu par différence entre l'intensité diffusée par le capillaire contenant l'ibuprofène et celle diffusée par le capillaire vide. L'intensité diffusée ainsi obtenue met en évidence un pic large, peu intense, repéré par la flèche autour de $0.1 \text{ \AA}^{-1}$ qui ne correspond pas au pic détecté à $0.175 \text{ \AA}^{-1}$. Ceci conduit à confirmer que ce pic (détecté à $0.175 \text{ \AA}^{-1}$) est lié à la matrice. L'intensité des raies de diffraction de la matrice est modulée par un facteur de forme (cylindre de rayon r , longueur infini) en fonction de Q . L'intensité $I(Q)$ diffusée par la matrice chargée d'ibuprofène va dépendre du contraste de densité des deux matériaux qui impacte l'intensité du facteur de forme. De ce fait, suivant la position des minima d'intensité du facteur de forme, l'intensité de certains pics de la matrice peut drastiquement diminuer

(coïncidence d'un pic de Bragg avec un minimum d'intensité du facteur de forme) ou augmenter (contraste de densité).

Les profils d'intensité diffusée par le composite 30%IBP:SBA-15(10Hz) collectés pendant 20 heures à température ambiante sont présentés sur la Figure 79.

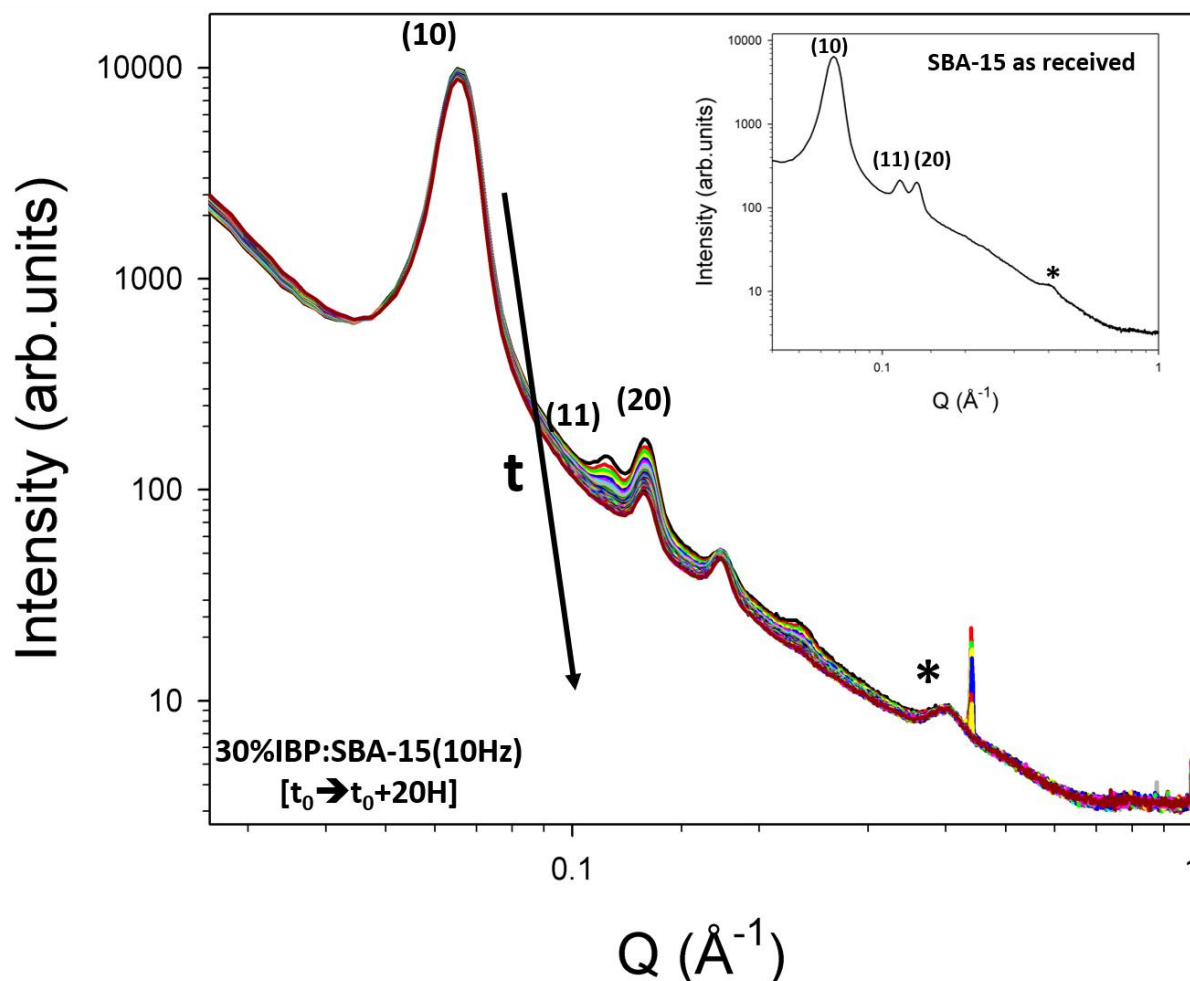


Figure 79: Cinétique de 20 heures du composite 30%IBP:SBA-15 cobroyé à 10 Hz. Diagramme de diffraction des rayons X aux petits angles. L'étoile indique la signature du Kapton utilisé pour fixer l'échantillon sur le porte échantillon.

Comme attendu après les analyses Raman à basse-fréquence d'un composite préparé par broyage à 10 Hz, la coexistence entre matière amorphe et nanocristallisée aux premiers instants de l'étude, est observée via le pic (11) dont l'intensité décroît en fonction du temps au fur et à mesure que l'intensité du premier pic de Bragg de l'ibuprofène¹⁶ décroît, marquant la transformation des nanocristaux en liquide sous-refroidi.

Il est notable qu'un pic diffus est également observé vers $0.23 \text{ \AA}^{-1}$, non existant dans le profil d'intensité par le liquide sous-refroidi tracé sur la Figure 78. Pour avoir une description plus claire des modifications du profil d'intensité diffusée aux petits angles, le premier et le dernier profil ont été tracés sur la Figure 80.

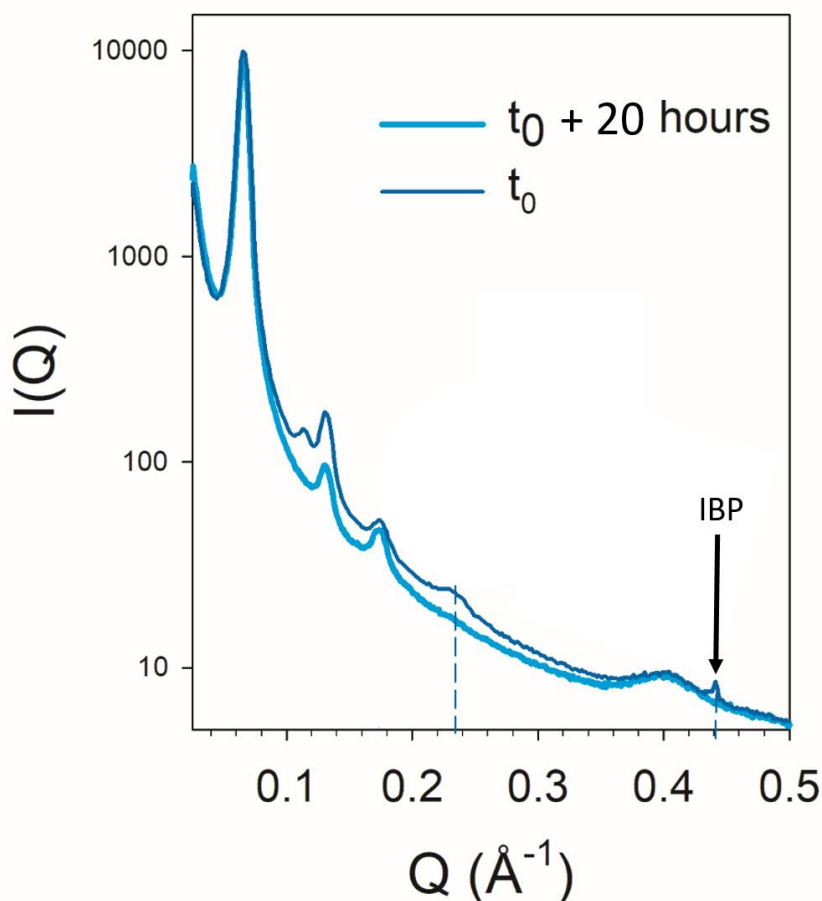


Figure 80: Comparaison des profils d'intensité diffusée par le composite 35%IBP:SBA-15(10Hz) à t_0 et à t_0+20h

La Figure 80 présente clairement les modifications du profil d'intensité diffusée aux petits angles, à la fois au niveau de l'intensité diffusée par l'ibuprofène confiné et de celle diffusée par la matrice. Le pic de Bragg et le pic diffus situé à $0.23 \text{ \AA}^{-1}$ ne sont plus détectés en fin de cinétique montrant la dissolution des nanocristaux. On peut également constater une correspondance entre la position du pic observé seulement en présence des nanocristaux et la position de la raie (30) correspondant au réseau hexagonal de la matrice. Il est notable

que les cinq raies observées dans nos expériences effectuées lorsque la matrice est chargée en ibuprofène, peuvent être observées lorsque la matrice SBA-15 est non chargée. Une étude récente³⁶ effectuée dans des conditions différentes ($P = 1200$ W au lieu de $P = 30$ W dans nos analyses) a montré que les cinq raies étaient systématiquement présentes dans les profils d'intensité des matrices SBA-15 non chargées et chargées d'urée. On peut effectivement deviner dans l'insert de la Figure 79 la présence des deux raies dans la matrice non chargée. Il est donc logique de considérer que les variations d'intensité des cinq raies de la matrice SBA-15 sont liées au facteur de forme dépendant de l'état physique de l'ibuprofène, et donc de sa densité.

Les caractéristiques du pic diffus ont été comparées sur des composites préparés par broyage à 30 Hz et à 10 Hz après dissolution des nanocristaux. Les profils d'intensité diffusée par ces 2 composites sont tracés sur la Figure 81.

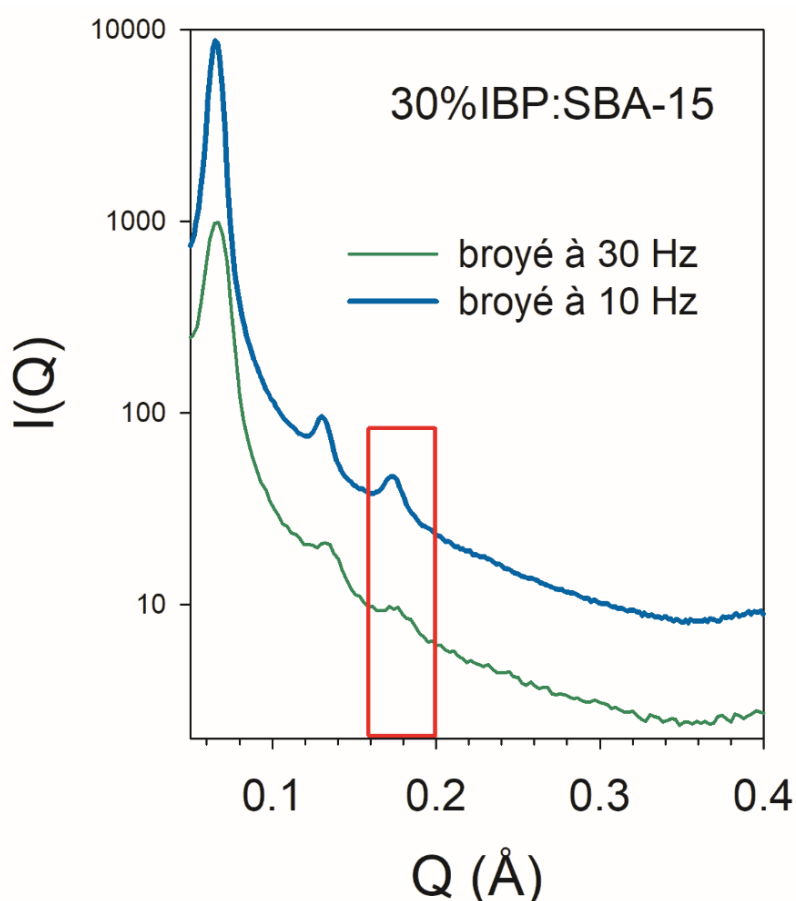


Figure 81: Comparaison des profils d'intensité diffusée des composites 30%IBP:SBA-15(30Hz) et 30%IBP:SBA-15(10Hz) après dissolution des nanocristaux. Le rectangle rouge montre que le pic diffus à $0.175 \text{ \AA}^{-1}$ est mieux résolu dans le cas d'un broyage à 10 Hz.

On observe dans le domaine encadré en rouge de la Figure 81 que le pic diffus est mieux résolu avec une intensité au pic plus marqué dans le profil du composite préparé à 10 Hz. Cet effet doit être relié à la taille de grains de la matrice SBA-15 qui est préservée lors d'un broyage à 10 Hz, contrairement à l'effet d'un broyage à 30 Hz.

On remarque aussi sur la Figure 80 que la dissolution des nanocristaux induit une décroissance de l'intensité des pics de Bragg, principalement (11) et (20), correspondant à l'organisation des canaux en nids d'abeilles. En particulier, le pic (11) n'est plus détecté après dissolution des nanocristaux. Ceci montre que l'intensité diffusée aux petits angles par l'ibuprofène non-organisé (amorphe) masque l'intensité diffractée par la matrice mésoporeuse. Ceci peut être mis en

évidence sur les différences des profils d'intensité entre un instant t et l'instant t_0 , tracées sur la Figure 82.

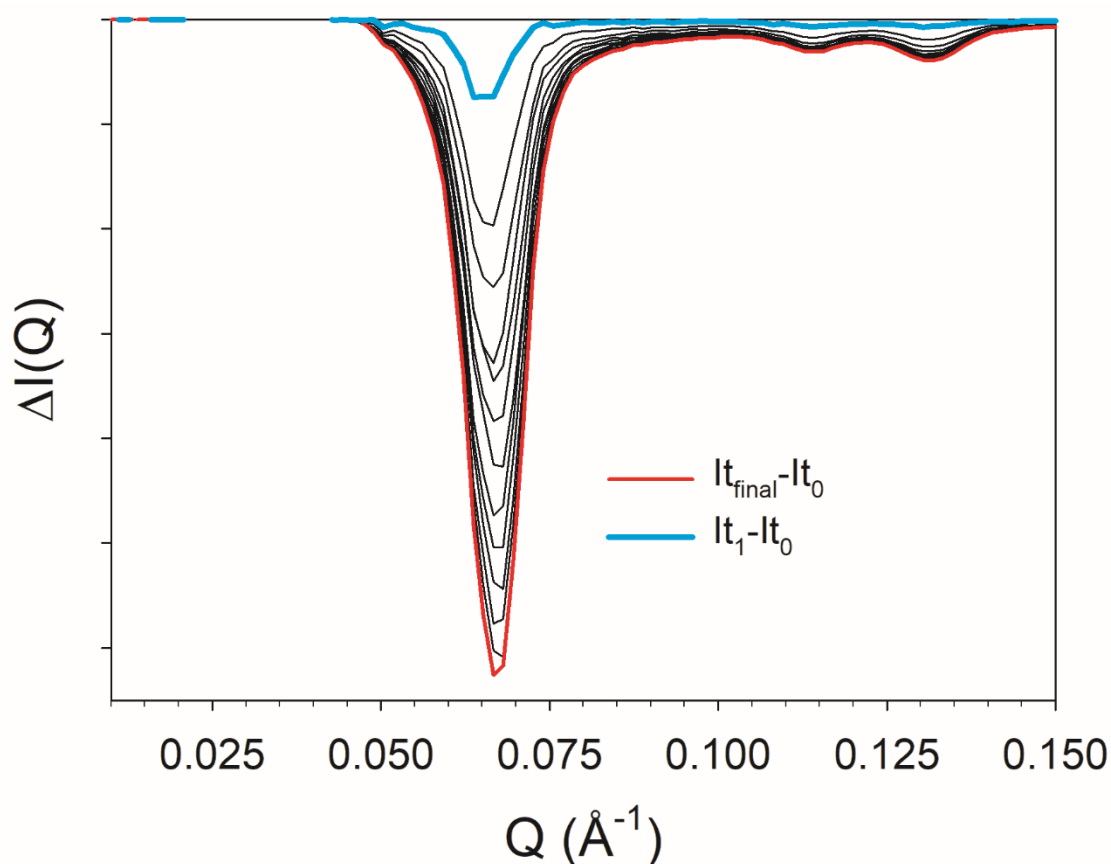


Figure 82: Différences de l'intensité diffusée entre un instant t et l'instant t_0 .

La Figure 82 montre bien que l'intensité des 3 pics de Bragg décroît dans le temps, bien que le phénomène apparaisse plus marquant sur le pic (11) car celui-ci n'est plus détecté après dissolution des nanocristaux.

La technique de chargement du principe actif à l'état solide au sein de matrices SBA-15 permet de manipuler l'état physique du principe actif confiné, soit en modifiant l'architecture des matrices mésoporeuses (principalement le diamètre des pores), soit en agissant sur les paramètres de la technique de chargement. Dans ce dernier cas, il est possible d'ajuster la concentration de principe actif à confiner ou bien la fréquence de broyage qui sont des paramètres facilement contrôlables. L'action sur ces différents types de paramètres a permis le confinement des nanocristaux à l'intérieur de pores de diamètre 3.6 nm pour les

matrices MCM-41 et environ 7 nm pour les matrices SBA-15, ce qui n'a jamais été observé à partir de chargement basé sur d'autres méthodes. Dans certains cas, une dissolution plus ou moins complète des nanocristaux coexistant avec le liquide sous-refroidi, a été mise en évidence par différentes techniques d'analyse qui ont permis de collecter des informations de différente nature sur ce phénomène. Il ressort des analyses menées sur les cinétiques de dissolution des informations sur l'origine de ce phénomène.

Ce phénomène de dissolution de nanocristaux au sein du liquide sous-refroidi est uniquement observable sous confinement à l'échelle nanométrique et piloté en partie par la géométrie de confinement. La comparaison des lois cinétiques obtenues par spectroscopie Raman, montre que les paramètres qui varient d'une expérience à l'autre (surface spécifique et volume du milieu de dissolution) gouvernent en partie le mécanisme de dissolution, en accord avec le comportement prédit par l'équation 23.

Il a été montré que la croissance des nanocristaux d'IMC au sein d'une matrice MCM-41 à partir d'un certain stade, plaçait les nanocristaux en situation d'instabilité à cause d'une surface spécifique très importante¹². Il est donc notable que la géométrie de confinement favorise l'instabilité des nanocristaux se développant obligatoirement suivant la direction axiale des canaux.

La proportion de nanocristaux par rapport au volume de liquide sous-refroidi est un autre paramètre qui pilote le mécanisme de dissolution. Une dissolution complète est observée lorsque la proportion de liquide sous-refroidi est importante par rapport à celle occupée par les nanocristaux (ex : 35% IBP dans MCM-41). Compte tenu que ce rapport est inversé dans le composite 35%IBP:SBA-15, la géométrie de confinement (diamètre des pores) a une influence sur ce paramètre V_L/V_{nano} (volume de liquide sur volume nanocristallin).

Cette étude a révélé un phénomène original de dissolution des nanocristaux d'ibuprofène dans le liquide sous-refroidi 60° en dessous de la température de

fusion du bulk. Ce phénomène mis en évidence sous certaines géométries de confinement ne peut être observé qu'à partir d'un chargement de l'ibuprofène par la méthode de chargement à l'état solide.

VI.2 Confinement du L-Tryptophane

Le confinement du L-tryptophane a fait l'objet de plusieurs études en raison des effets thérapeutiques qu'il possède. Il est généralement utilisé pour soigner la dépression, les troubles de comportement, les troubles de sommeil et l'anxiété²⁰⁻²².

VI.2.1 Caractérisation du L-Tryptophane

Des investigations ont été menées par spectroscopie Raman à basses fréquences et par calorimétrie afin de caractériser l'état physique et les transformations du L-tryptophane (L-Trp) en grand volume. Les spectres Raman du L-tryptophane sous sa forme cristalline et sous sa forme amorphe obtenue par cryobroyage de la forme commerciale sont présentés sur la Figure 83.a. Ces deux spectres sont représentés en susceptibilité Raman à partir des intensités réduites I_r du L-tryptophane sous ses deux formes (Voir chapitre II). Cette figure montre les bandes de phonons caractéristiques d'une phase cristalline pour le L-Trp commercial et un continuum d'états vibrationnels (densité d'états de vibration) pour la forme amorphe inhérente à l'absence de périodicité.

La Figure 83.b présente la susceptibilité Raman du L-tryptophane broyé seul et du L-tryptophane cobroyé avec l'aérosil. Les deux broyages ont été effectués à une fréquence de 30 Hz pendant 30 minutes. L'aérosil étant de la silice non poreuse, l'étude de ce dernier mélange permet de montrer le comportement du L-tryptophane cobroyé en présence de la silice. Cette figure met en évidence l'élargissement des pics de phonons du L-tryptophane à l'issue du broyage. Ceci peut être interprété par une diminution de la taille des cristallites induite par le processus du broyage. Ces résultats montrent que d'une part, le broyage

à 30 Hz du L-tryptophane induit uniquement une faible réduction de la taille des cristallites, et d'autre part, que la silice n'a que peu d'influence sur l'état physique du L-tryptophane au cours du broyage. Aucune signature d'amorphisation n'est détectée.

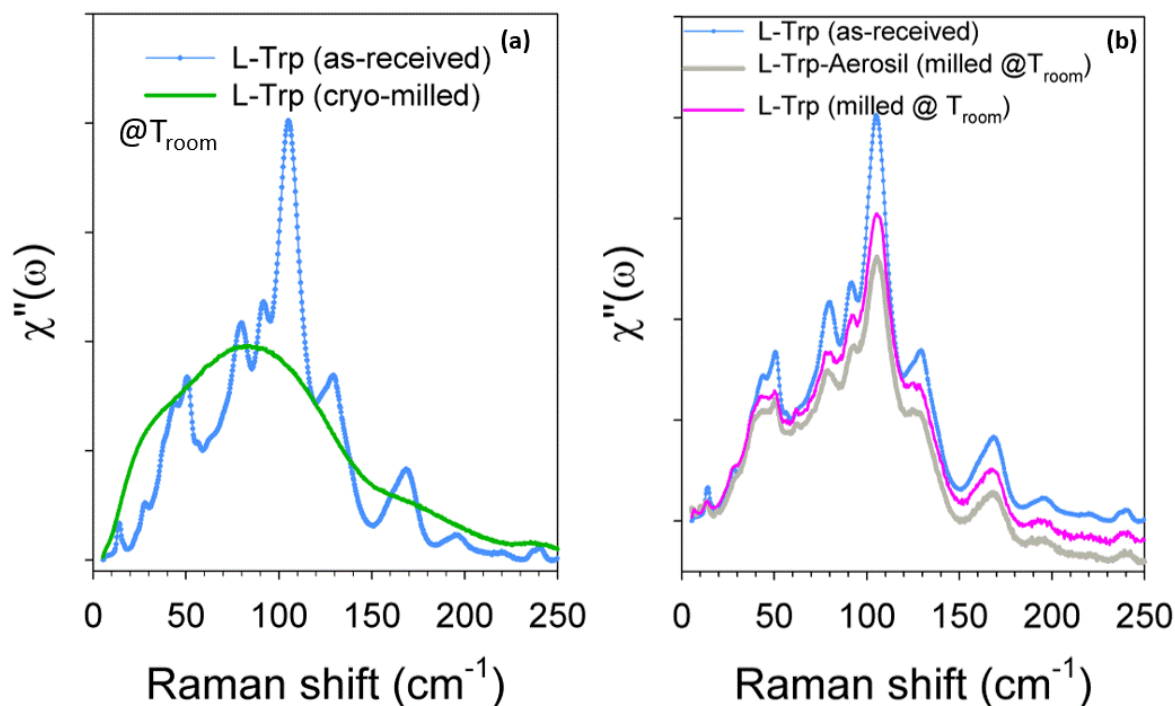


Figure 83: Comparaison des états physique du L-trp à partir des spectres Raman basse fréquence a) Comparaison des spectres Raman du L-Trp dans sa forme commerciale et dans sa forme amorphe. b) Spectres Raman du L-Trp broyé et du L-Trp cobroyé avec l'aérosil en comparaison avec le spectre Raman du L-trp commercial

D'un point de vue thermodynamique, le point de fusion du L-tryptophane a été évalué par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Sur la Figure 84, le thermogramme du L-tryptophane commerciale a été tracé. Ce thermogramme obtenu lors d'une chauffe à 5°C/min du L-Trp montre un pic endothermique dont le maximum est aux alentours de 291°C marquant la fusion du cristal à cette température.

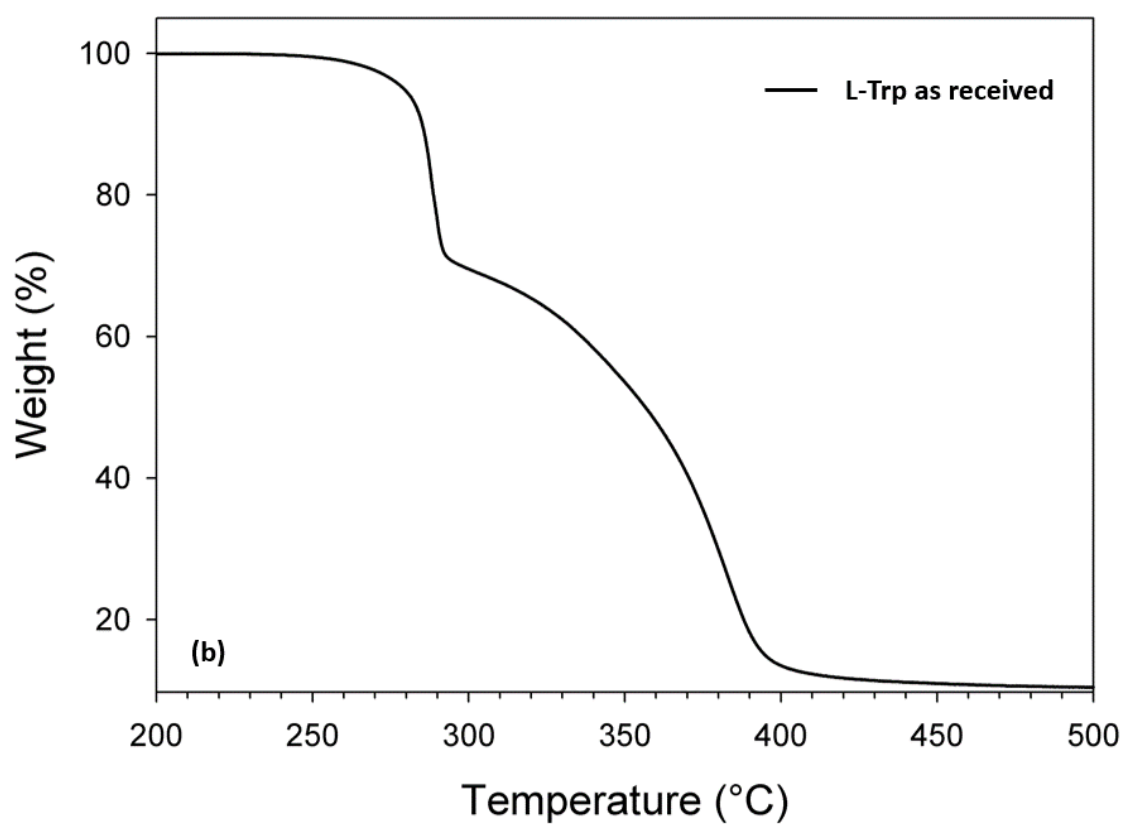
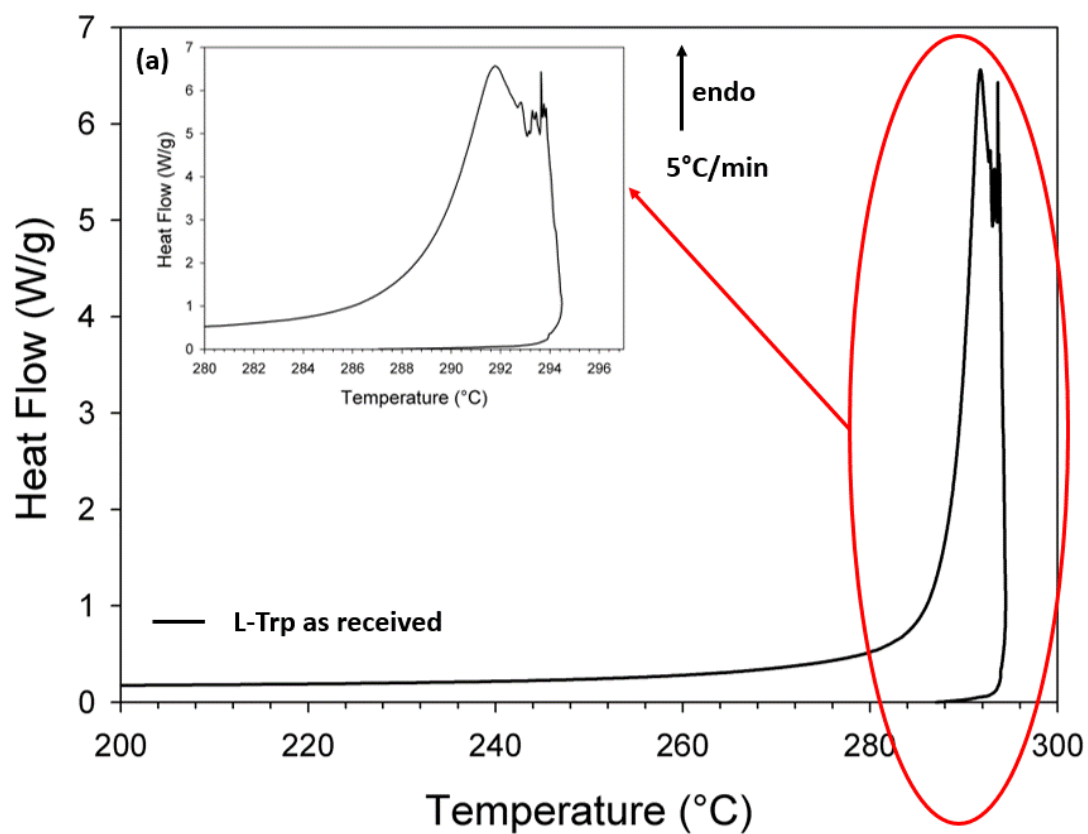


Figure 84: Analyse de la stabilité de L-trp cristallin a) Thermogramme DSC et b) Courbe ATG.

Cette fusion est directement suivie d'une dégradation du composé à une température très proche de la température de fusion du L-Trp. Cette température correspond bien à la température de la première dégradation du L-Trp mise en évidence par une analyse thermogravimétrique (ATG) du même composé (Figure 84.b). Étant donné la température élevée de fusion et la dégradation rapide du matériau, toutes les expériences par spectroscopie Raman ont été réalisées à la température ambiante.

VI.2.2 Capacité de chargement et état physique du L-tryptophane confiné

Afin d'étudier le confinement du L-Tryptophane par broyage dans les MCM-41, plusieurs composites de différentes concentrations en L-Trp, notés $X\%$ L-Trp:MCM-41(30Hz), ont été préparés. X étant le pourcentage massique du L-Trp qui varie de 30 à 50% dans le cadre de ce travail. Ces composites fraîchement préparés ont été analysés par spectroscopie Raman à basses fréquences. Sur la Figure 85, les spectres Raman de ces composites sont tracés en les translatant arbitrairement suivant l'axe Y pour une meilleure lecture de la figure. On observe clairement que tous ces spectres possèdent une signature similaire à l'amorphe, c'est-à-dire absence des pics de phonons qui représentent la signature d'une forme cristalline périodique. Néanmoins, une subtile structuration est observée entre 90 et 110 cm^{-1} sur la Figure 85. Ce résultat montre que le L-Trp a été chargé dans les MCM-41 dans un état nanocristallisé dans la mesure où le broyage du L-Trp (sans ou avec aerosil) n'induit pas des modifications de spectres si importantes.

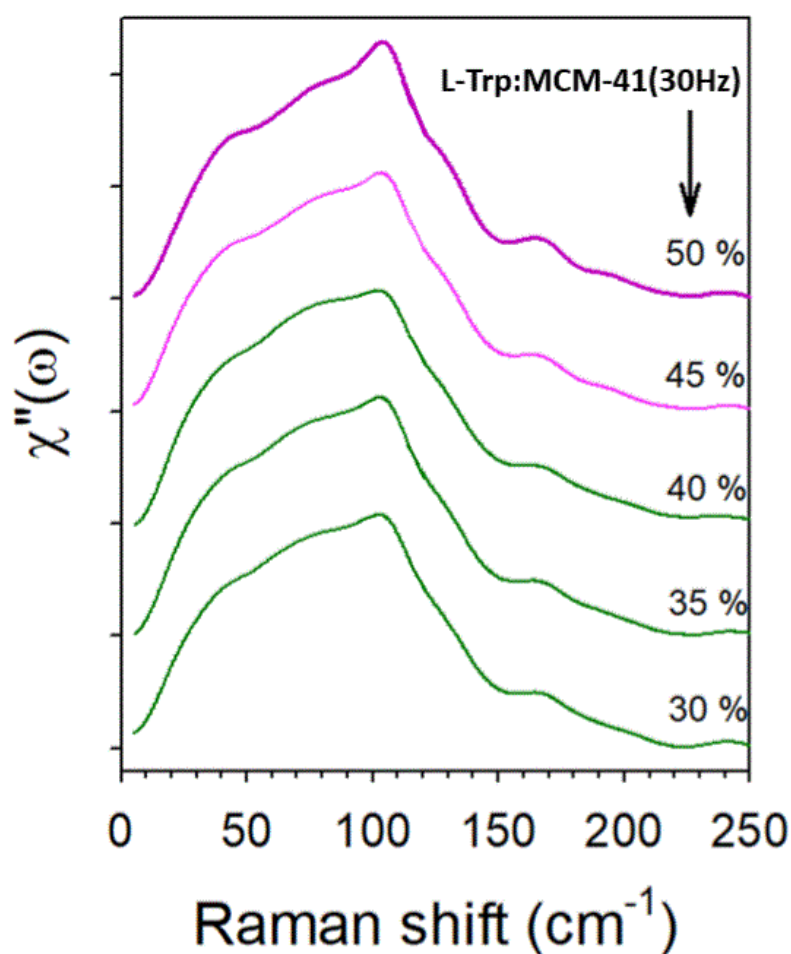


Figure 85: Susceptibilités Raman à température ambiante des composites L-Trp:MCM-41(30Hz) tracés pour 30, 35, 40, 45 et 50% massique du L-Tryptophane.

Afin de définir le taux de chargement maximal qu'il est possible d'atteindre avec ce système, une analyse fine des spectres a été réalisée. Sur la Figure 86, les susceptibilités Raman des composites 40, 45 et 50%L-Trp :MCM-41 sont comparées aux susceptibilités Raman du L-Trp dans sa forme cristalline et du L-Trp dans sa forme amorphe (cryobroyé). Cette figure montre que la signature cristalline du L-Trp augmente à partir de 45% de L-Trp. Ceci montre qu'au-delà de cette limite, des molécules de L-Trp se trouvent à l'extérieur des pores. Ainsi, la capacité de chargement est très proche de 45% en masse de L-Trp. Ce résultat valorise cette méthode de chargement à l'état solide (MAL) qui permet d'atteindre un taux de chargement élevé comparé à la méthode de chargement

en solution. En effet, une étude précédente a montré qu'en raison de l'hydrophobicité du L-Trp, il est nécessaire de modifier la chimie de surface interne des pores pour atteindre une capacité de chargement maximale proche de 10% en masse du L-Trp²³.

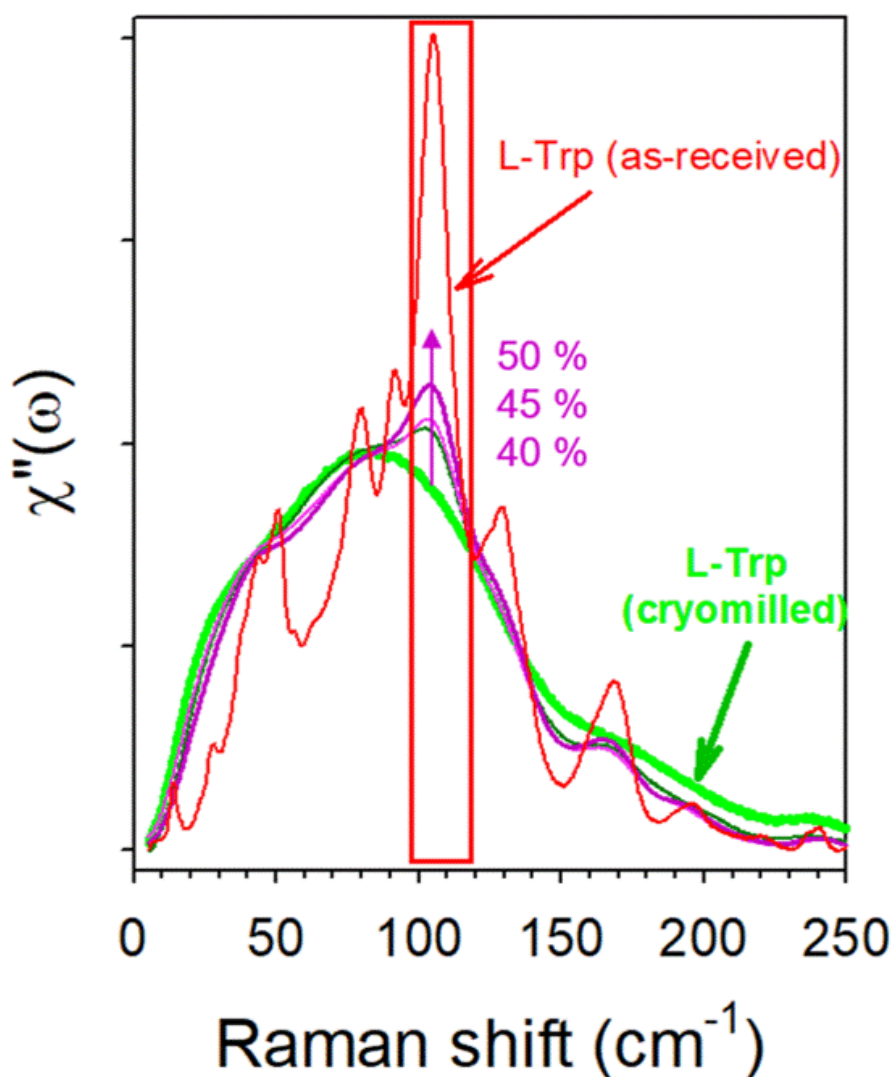


Figure 86: Comparaison des susceptibilités Raman des composites 40, 45 et 50%L - Trp :MCM-41 avec les susceptibilités Raman des L-Trp commercial et L-Trp cryobroyé pour définir une limite de chargement.

VI.2.3 Étude des interactions du L-tryptophane confiné avec les MCM-41

La spectroscopie Raman à moyennes fréquences est une excellente technique pour caractériser l'affinité du principe actif (PA) confiné avec les

matrices mésoporeuses en cherchant la signature des liaisons hydrogène qui pourraient avoir lieu entre le PA et les groupements silanols ($--Si-OH$)¹⁹. Dans ce contexte et afin de caractériser les interactions du L-Trp avec les silanols des MCM-41, il est nécessaire dans un premier temps d'analyser les spectres de référence (L-Trp commercial, L-Trp cryobroyé et le L-Trp broyé). Sur la Figure 87, les spectres de ces échantillons sont présentés. Le spectre du L-Trp commercial ressemble très fortement à celui du L-Trp broyé à 30 Hz. Ceci montre qu'un broyage à 30 Hz du L-Trp n'induit pas des changements importants sur l'état physique du L-Trp comme cela a pu être montré dans le paragraphe précédent. Néanmoins, des décalages et un élargissement des bandes ont été notés pour le spectre du L-Trp cryobroyé (amorphe) comparé au spectre du L-Trp commercial (cristallin). Cet élargissement et ces décalages des bandes sont dus à l'état très désordonné du L-Trp cryobroyé. Une analyse fine de la région spectrale allant de 1500 à 1650 cm^{-1} a été réalisée. Les résultats sont présentés sur la Figure 87.b. L'agrandissement de cette région spectrale permet de mettre en évidence des décalages en fréquence et l'élargissement des bandes. Pour mieux comprendre ces changements, des calculs utilisant le logiciel TmoleX et la théorie de la fonctionnelle de la densité DFT ont été réalisés. Ce logiciel permet de simuler des spectres Raman et d'attribuer chaque bande à la vibration d'une liaison intramoléculaire ou d'un groupement d'atomes. Ces calculs appliqués sur la molécule du L-Trp ont permis de montrer que les bandes situées autour de 1550 cm^{-1} et 1620 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations du groupement NH_2 et aux étirements de la double liaison $C=O$ impliqués dans les liaisons hydrogène dans le cristal²⁴.

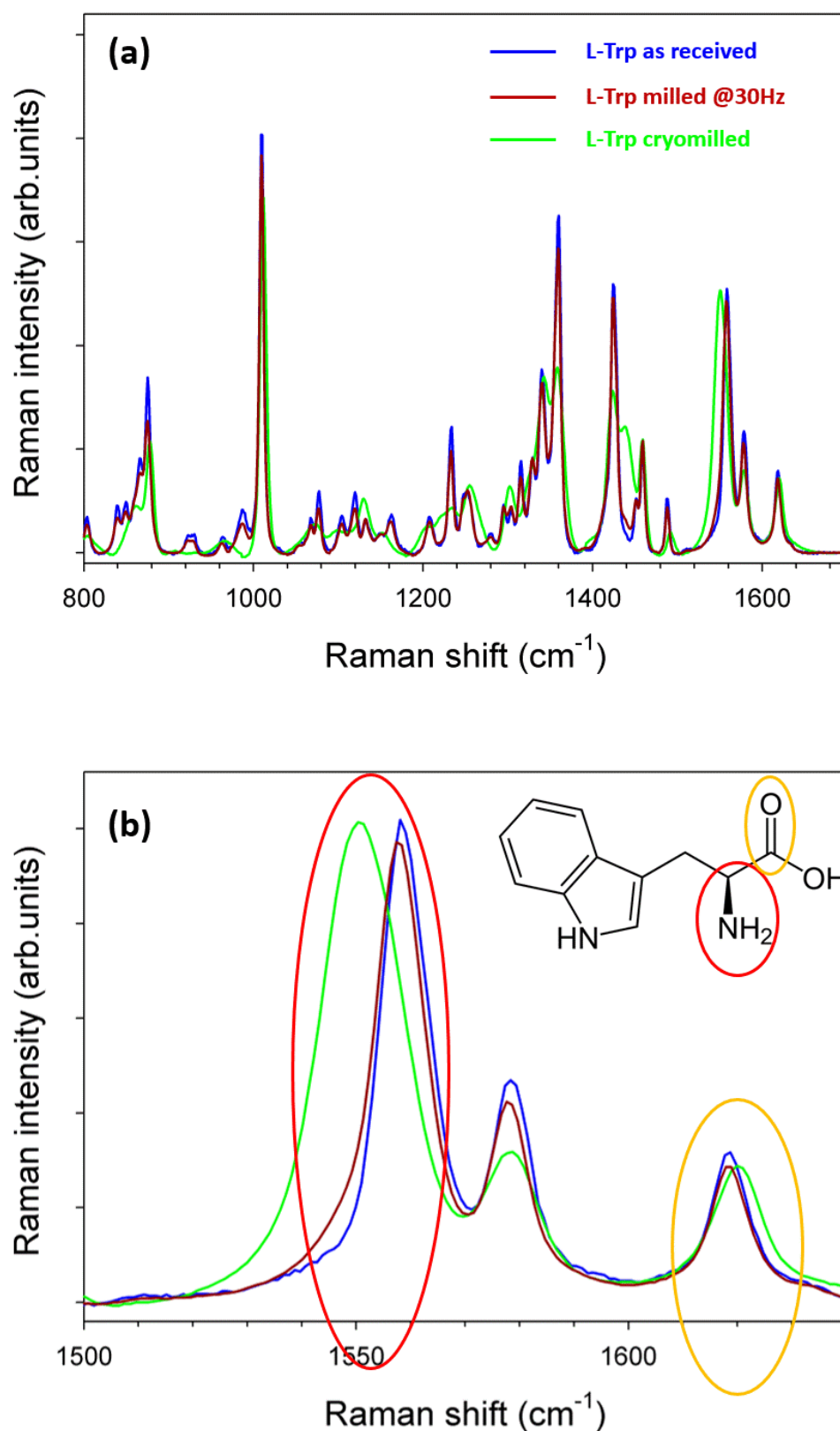


Figure 87: Spectres Raman à moyennes fréquences du L-trp commercial, L-Trp broyé à 30 Hz et L-Trp cryobroyé. a) dans la région spectrale allant de 800 à 1640 cm⁻¹ et b) dans la région spectrale de 1500 à 1640 cm⁻¹. Les ellipses indiquent avec un code couleur les groupements impliqués dans les vibrations.

Sur la Figure 87.b, nous observons le décalage de la bande située à environ 1620 cm^{-1} ainsi que son élargissement. Ce phénomène serait induit par la rupture des liaisons hydrogène dans l'état amorphe qui rend plus difficile l'étirement de la liaison C=O à l'inverse de la vibration NH_2 qui se décale vers les basses fréquences probablement impactée par l'environnement moléculaire dû au désordre.

Afin de caractériser l'interaction du L-Trp avec les matrices mésoporeuses, le composite 40%L-Trp:MCM-41 fraîchement préparé a été analysé par spectroscopie Raman à moyennes fréquences et comparé au spectre du L-Trp cryobroyé. La Figure 88.a permet de montrer l'absence de différence entre les deux spectres reflétant une conformation moléculaire du L-trp en grand volume similaire à celle du L-Trp sous confinement. Il est important de rappeler ici que 40%L-Trp:MCM-41 est dans un état nanocristallin. Cet état ne peut pas être distingué de l'amorphe à moyennes fréquences. Ceci met en évidence la haute sensibilité de la spectroscopie Raman à basses fréquences pour détecter des traces subtiles de nanocristallisation. Sur la Figure 88.b, un léger décalage de l'étirement C=O est observé.

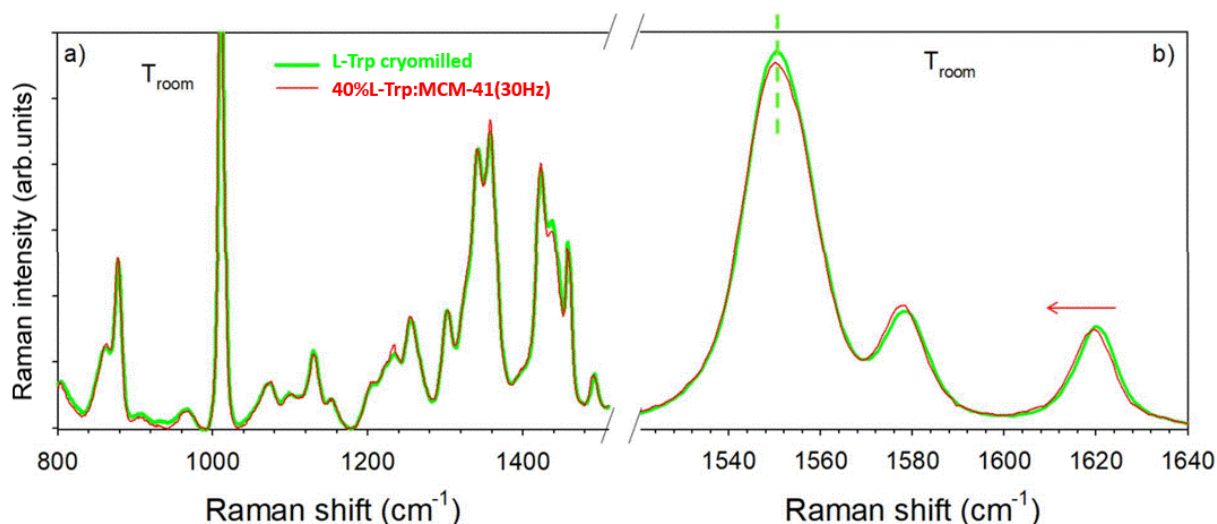


Figure 88: Comparaison entre le spectre du composite 40% L-Trp:MCM-41 et le spectre du L-Trp cryobroyé (amorphe). a) dans la région spectrale allant de 800 à 1500 cm^{-1} et (b) dans la région spectrale allant de 1500 à 1640 cm^{-1} . La flèche horizontale permet de montrer le décalage vers les basses fréquences de l'étirement C=O dans le spectre du composite.

Ce décalage peut être expliqué par l'interaction du L-Trp avec les matrices mésoporeuses à travers des liaisons hydrogène ayant lieu entre le groupement C=O du L-Trp et le groupement Si-OH des MCM-41. Étant donné le faible décalage en fréquence de la bande d'étirement C=O, cette interaction est considérée très faible.

VI.2.4 L'impact de la jarre de broyage sur l'état physique du L-Tryptophane confiné

Dans le chapitre III, les résultats de l'étude de l'impact de la fréquence de broyage sur l'état physique de l'ibuprofène confiné ont été présentés. Il a été montré que la fréquence de broyage modifie non seulement l'état physique de l'ibuprofène confiné mais impacte également la taille des particules des matrices mésoporeuses et modifie la capacité de chargement²⁵. Dans cette partie, nous présenterons les résultats d'une analyse de l'impact de la jarre utilisée lors de la préparation du composite. La Figure 89 présente les susceptibilités Raman de deux composites de même concentration en L-Trp. L'un des deux a été préparé dans un tube en plastique (eppendorf) et l'autre a été préparé dans une jarre en acier avec les mêmes paramètres de broyage (intensité et temps). Cette figure montre que la nanostructuration du composite 40%L-Trp:MCM-41 préparé dans un tube en plastique (eppendorf) n'est pas observable dans le composite 40%L-Trp :MCM-41 préparé dans une jarre en acier. En effet le spectre du composite préparé dans une jarre en acier est similaire à celui de l'état amorphe en grand volume avec absence des structurations reflétant l'état cristallin.

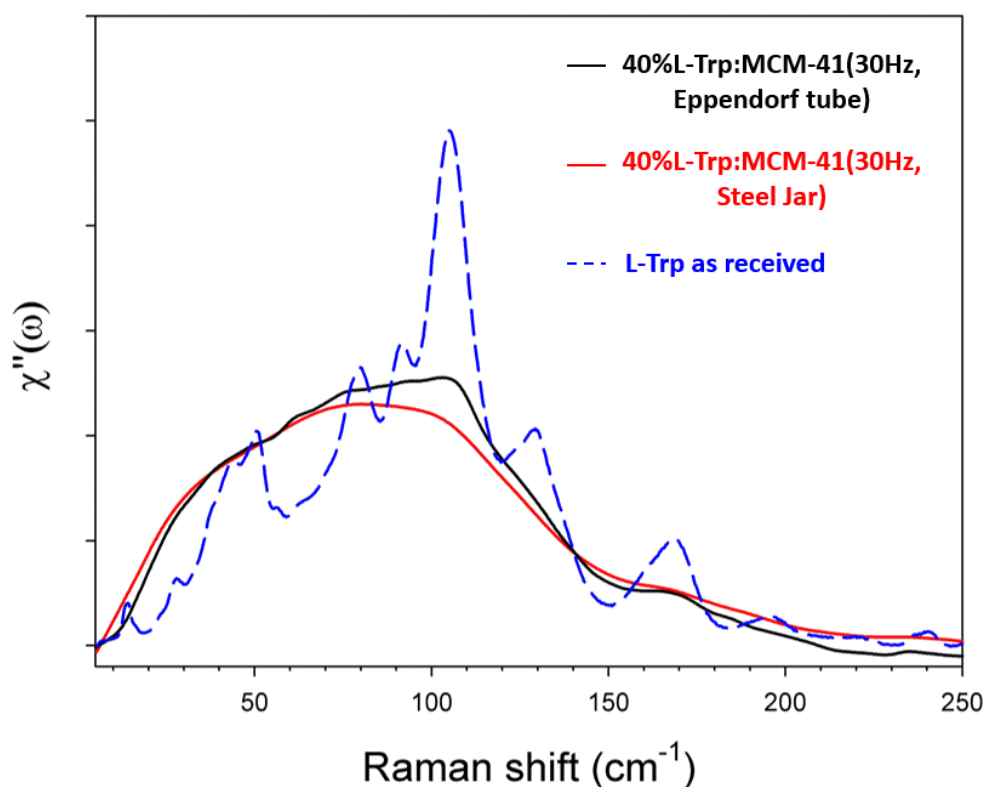


Figure 89: Susceptibilités Raman du L-Trp commercial, du L-trp cobroyé dans un tube en plastique (eppendorf) et du L-Trp cobroyé dans une jarre en acier.

Ce résultat montre que 40% du L-Trp a été chargé à l'intérieur des MCM-41 dans un état amorphe. Bien que, d'après la littérature²⁶, l'amorphisation du L-trp (non confiné) n'est possible, à température ambiante, qu'après 6 heures de broyage, notre étude a permis de montrer qu'il est possible d'obtenir le L-trp dans sa forme amorphe en utilisant le confinement par broyage dans une jarre en acier en seulement 30 minutes, en préservant la stabilité de cet état physique. Il est important de préciser que l'obtention des états nanocristallin et amorphe sous confinement est reproductible.

Le confinement du L-Trp a constitué une étape intermédiaire au confinement du lysozyme. Le but a été de chercher la signature de l'acide aminé confiné de manière à pouvoir déterminer si le lysozyme était confiné à l'état solide, à partir d'analyses Raman. Cependant, cette étude a montré que la signature de confinement du L-Trp réside principalement sur l'état physique de celui-ci. Par conséquent, ces résultats ne seront pas employés pour caractériser le

confinement du lysozyme (systématiquement amorphe initialement) mais montrent tout de même l'intérêt de la méthode de chargement à l'état solide pour confiner les matériaux hydrophobes sans avoir recours à la modification de la chimie de surface des pores.

VI.3 Confinement du Lysozyme

La technique de chargement par broyage des protéines est un axe qui n'a jamais été exploré auparavant. Le verrou technologique majeur de cette méthode de chargement réside dans la préservation de l'état natif de la protéine au cours du broyage mécanique. Ce stress mécanique peut induire des modifications structurales et engendrer une perte partielle ou totale de l'activité de la protéine. Dans cette partie, nous allons présenter des résultats préliminaires sur le chargement d'une protéine modèle, le lysozyme, dans les SBA-15 dont le diamètre des pores est de l'ordre de 7 nm. Tout comme les autres systèmes (ibuprofène et L-tryptophane), le temps de broyage a été fixé à 30 minutes, considéré comme le temps nécessaire au chargement du matériau au sein de la matrice de silice mésoporeuse.

VI.3.1 L'impact de la fréquence de broyage sur le Lysozyme

La spectroscopie Raman a été largement utilisée pour étudier les systèmes biomoléculaires et notamment les processus de dénaturation de ceux-ci²⁷⁻²⁹. En effet cette technique rend possible la caractérisation fine de la structure secondaire des protéines et donne des informations sur leur degré de dénaturation sous l'effet de certains facteurs stressants pour la protéine (pression, température, ...)^{29,30} et ceux inhérents à différentes procédures (lyophilisation, atomisation,...). Dans cette partie, l'impact de la fréquence de broyage sur le lysozyme sera étudié. Sur la Figure 90, les spectres Raman du lysozyme et du lysozyme broyé seul à 30 Hz sont présentés. Si l'on compare ces deux spectres, nous observons un décalage vers les hautes fréquences de la bande située entre 1650 et 1730 cm^{-1} pour le lysozyme broyé comparé au lysozyme non broyé. Cette bande appelée la bande amide I et considérée

comme une sonde structurale de la conformation moléculaire de la protéine est due en grande partie aux mouvements d'étirement de la double liaison C=O, avec une plus faible contribution des mouvements d'étirement C-N et N-H³¹ et du mouvement de déformation angulaire entre CN et NH. Le décalage de la bande amide I vers les hautes fréquences à l'issue du broyage traduit une rupture des liaisons hydrogène intramoléculaires (C=O...H) au sein des hélices qui rend plus dur l'étirement de la liaison C=O.

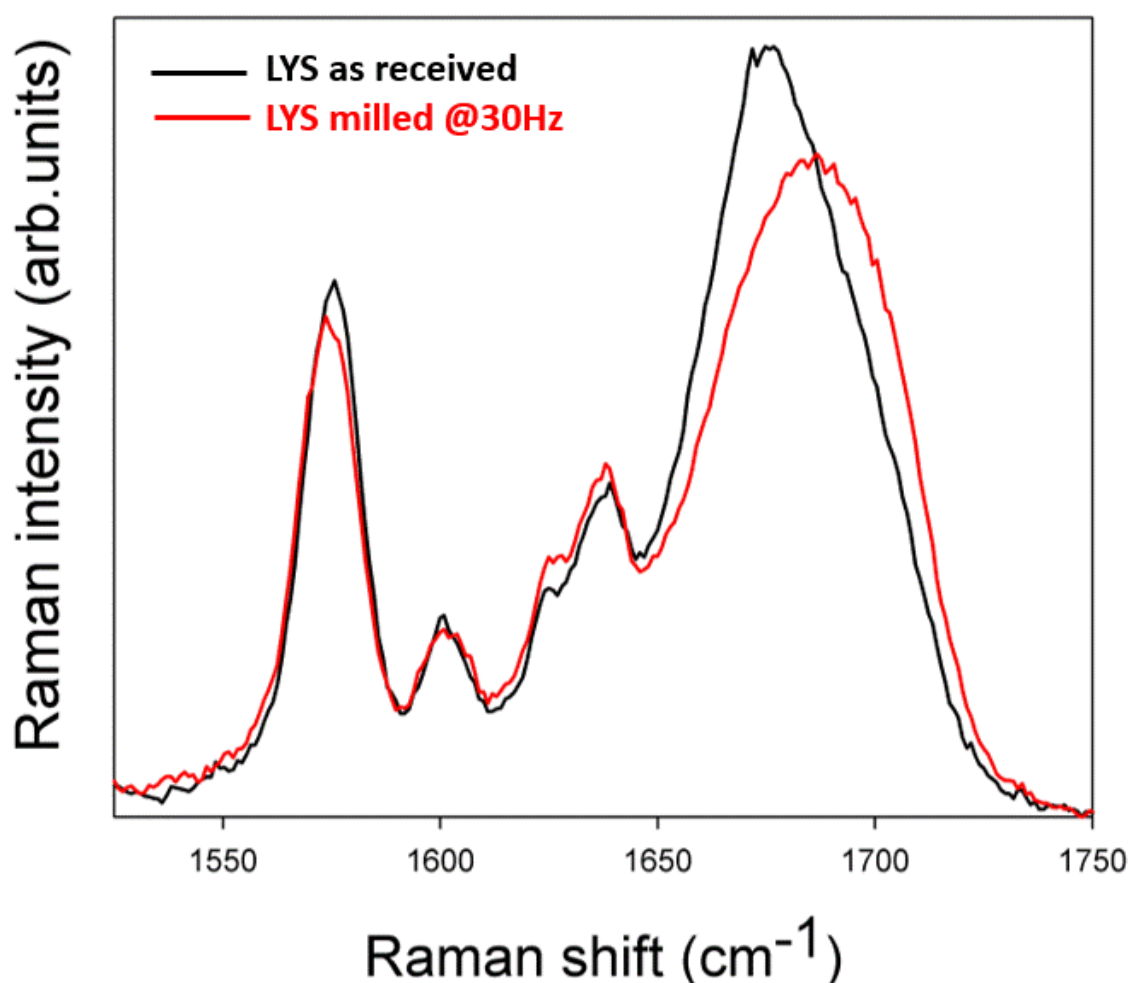


Figure 90: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial et du lysozyme broyé à 30 Hz

Sur la Figure 91, le spectre du lysozyme et le spectre du lysozyme broyé à 10 Hz sont présentés. Contrairement au broyage à 30 Hz, le broyage à 10 Hz de la protéine seule n'induit pas un décalage en fréquence de la bande amide I. Ceci montre que la structure secondaire du lysozyme est préservée.

Cette première étude a permis de mettre en évidence l'impact très important d'un broyage à 30 Hz sur la structure secondaire de la protéine alors que le broyage à 10 Hz semble préserver cette structure.

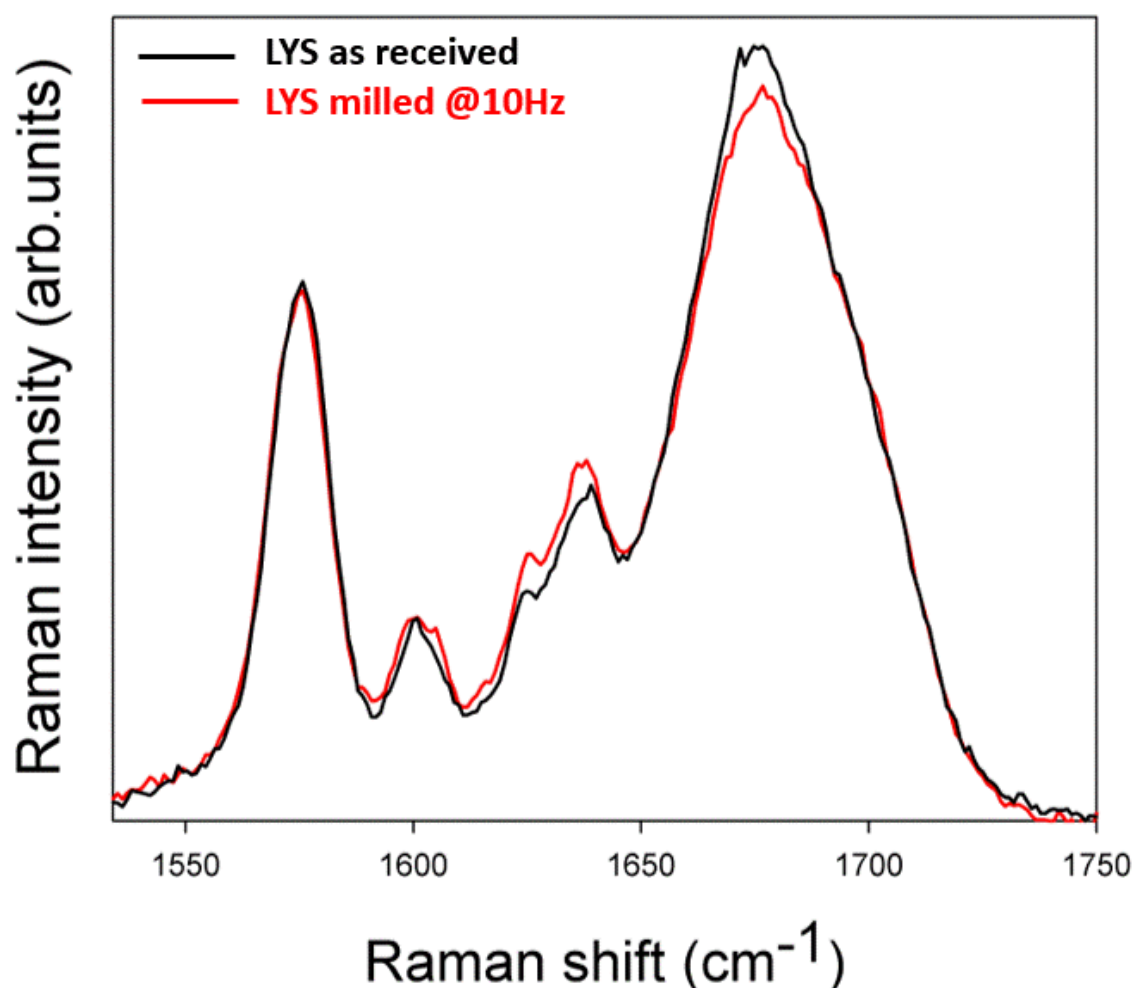


Figure 91: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial et du lysozyme broyé à 10 Hz.

VI.3.2 Chargement à l'état solide du lysozyme dans les SBA-

15

Le chargement du lysozyme s'est effectué de la même façon que le chargement de l'ibuprofène et du L-tryptophane. En effet, 6 cycles de broyage de 5 minutes ponctués avec des temps de pause de 2 minutes ont été réalisés. L'échantillon à la fin du dernier cycle de broyage est retiré de l'éppendorf et

analysé directement par spectroscopie Raman. La Figure 92 présente le spectre Raman des composites préparé avec 35 et 40% en masse du Lysozyme (35%Lys:SBA-15(30Hz), 40%Lys :SBA-15(30Hz)), ces spectres sont comparés aux spectres du lysozyme seul et du lysozyme broyé à 30 Hz afin de mettre en évidence des traces de confinement. En comparant ces spectres, nous observons que le spectre du composite 35%Lys:SBA-15(30Hz) se superpose avec le spectre de la protéine analysée telle que reçue. Ceci pourrait être interprété par le confinement du lysozyme à l'intérieur des pores. La présence d'une partie de la protéine à l'extérieur des pores pourrait se manifester par un décalage vers les hautes fréquences de la bande amide I comme lorsque la protéine est broyée seule. Une analyse minutieuse de la bande amide I du composite 40%Lys:SBA-15(30Hz) révèle un léger décalage vers les hautes fréquences. Ce décalage peut être dû à une partie minime de la quantité de protéine se trouvant à l'extérieur des pores.

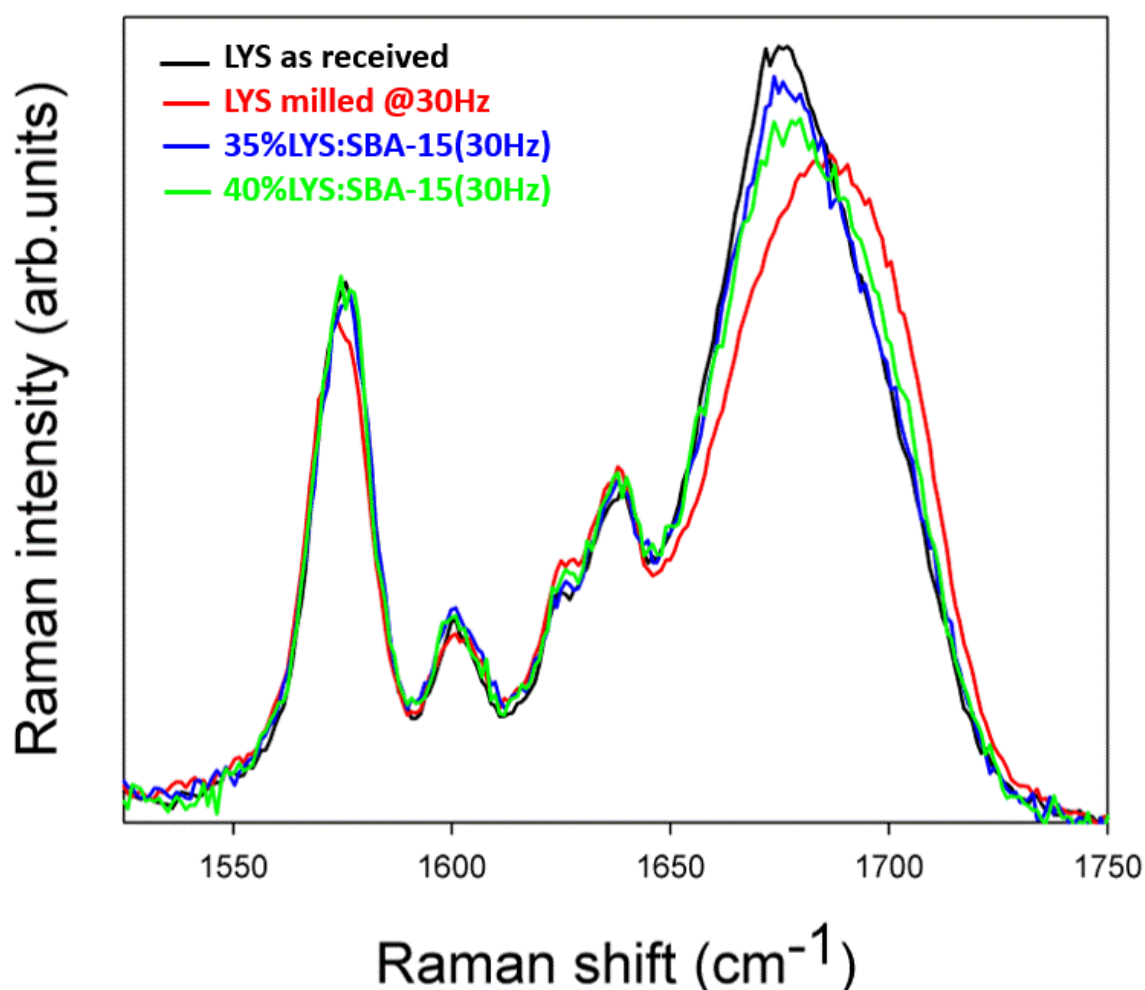


Figure 92: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial, du lysozyme broyé à 30 Hz et du composite 35%Lys:SBA-15 cobroyé à 30 Hz

Ce résultat montre que le co-broyage du lysozyme avec la matrice mésoporeuse permet de charger jusqu'à 35% en masse du lysozyme. Bien que le broyage à 30 Hz permet de confiner le lysozyme dans les SBA-15, il demeure un processus agressif envers la protéine. Ainsi, nous nous intéressons au confinement de la protéine par broyage à 10 Hz. Comme il a été vu dans la partie précédente, le broyage à 10 Hz de la protéine seule n'induit pas de modification de son spectre contrairement à un broyage à 30 Hz. De ce fait, déceler des traces de confinement à 10 Hz peut s'avérer difficile par spectroscopie Raman. Sur la Figure 93, le spectre du composite 35 %Lys:SBA-15(10Hz) est comparé aux spectre du lysozyme et du lysozyme broyé à 10 Hz. Les trois spectres se superposent indiquant aucun changement structural à l'issue du broyage et du cobroyage.

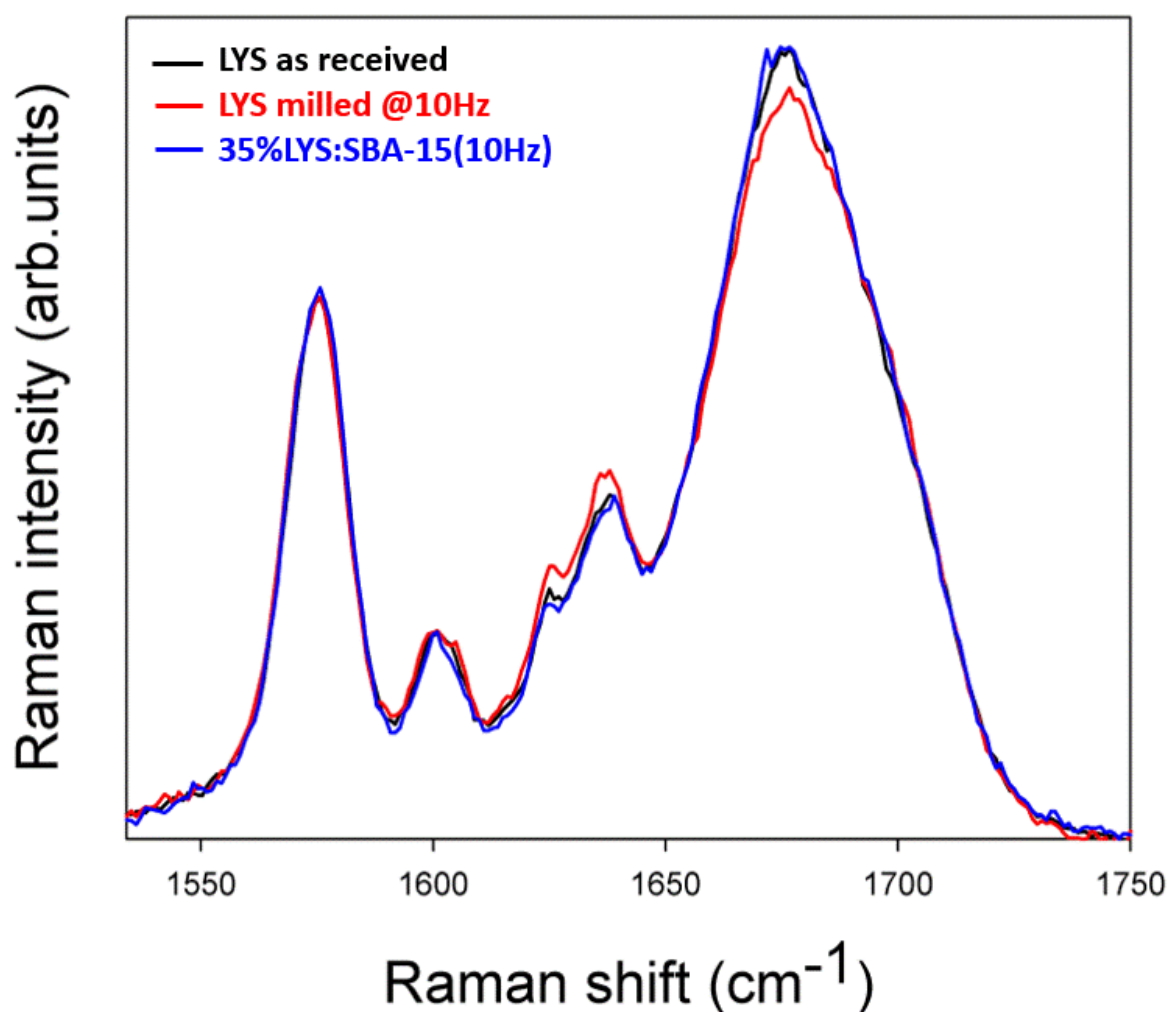


Figure 93: Spectres Raman à moyennes fréquences du lysozyme commercial, du lysozyme broyé à 10 Hz et du composite 35%Lys:SBA-15 cobroyé à 10 Hz.

Le composite 35%Lys:SBA-15(10Hz) a été analysé par physisorption et comparé aux résultats de physisorption des SBA-15 et des SBA-15 broyés à 10Hz. Les résultats sont présentés sur la Figure 94.

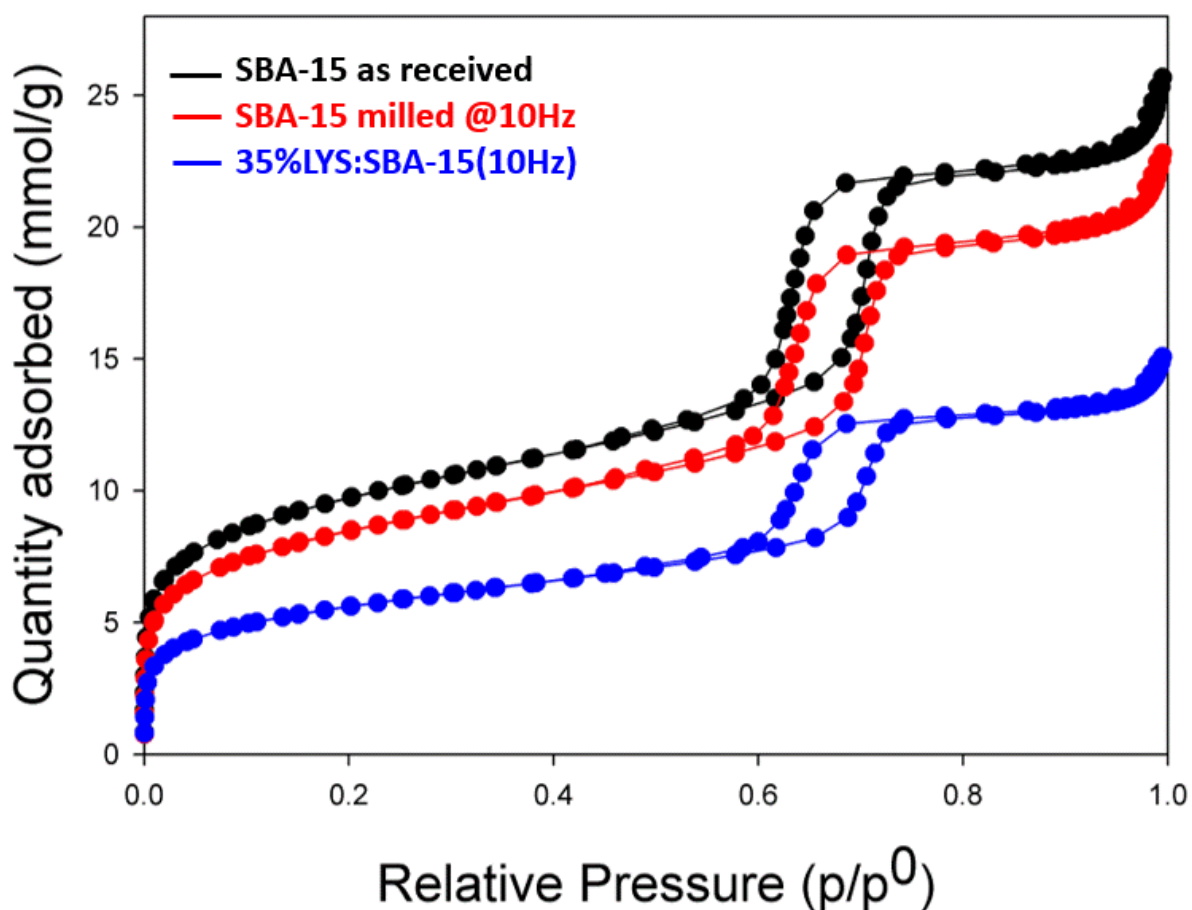


Figure 94: N_2 adsorption-désorption des SBA-15, des SBA-15 broyés à 10 Hz et du composite 35%Lys:SBA-15(10Hz)

Cette figure montre les branches d'adsorption et désorption de N_2 , comme cela a été vu dans le chapitre III, le broyage à 10 Hz des SBA-15 induit une légère diminution du volume poreux mise en évidence par la réduction de la quantité adsorbée du N_2 . La courbe d'adsorption et désorption du composite 35%Lys:SBA-15(10Hz) montre une diminution du volume poreux par rapport à la courbe des SBA-15 broyés à 10 Hz. Ceci peut être interprété par la réduction du volume poreux due à la présence de lysozyme à l'intérieur des pores. Ce résultat couplé aux résultats obtenus par spectroscopie Raman montre que le broyage à 10 Hz permet de confiner le lysozyme dans les matrices mésoporeuses SBA-15 sans modifier la structure de la protéine.

VI.3.3 Avantages de la méthode de chargement des protéines par broyage

Les méthodes de chargement des protéines reportées dans la littérature reposent essentiellement sur les interactions électrostatiques entre la matrice hôte et la protéine^{8,32–34}. Ces interactions électrostatiques sont gouvernées par le pH du milieu. En effet, dans le cas du lysozyme, la littérature indique que le chargement de cette protéine est possible dans un milieu dont le pH est aux alentours de 10³⁵. Dans le cadre de ce travail et afin de valoriser la méthode de chargement à l'état solide, des expériences de chargement en solution à pH=10.5 ont été réalisées. Pour réaliser ces expériences, un protocole expérimental similaire à celui décrit dans la littérature a été adopté³⁵. Ce protocole expérimental consiste en la mise en solution à pH 10.5 d'une quantité de lysozyme avec les SBA-15 pendant 4 jours sous agitation et à la température ambiante. À l'issue de cette première étape, la solution est filtrée et la poudre est récupérée puis séchée à la température ambiante afin de ne pas dénaturer la protéine. La solution filtrée est ensuite analysée par spectroscopie UV afin de déterminer la concentration du Lysozyme qui n'a pas été retenue à l'intérieur des pores.

La poudre résultante analysée par spectroscopie Raman n'a montré aucune trace de lysozyme. La concentration du lysozyme dans la solution filtrée correspond bien à la concentration mise au départ. Afin de comprendre la raison pour laquelle le lysozyme n'a pas pu être confiné dans les pores, ces derniers ont été mis en solution au même pH que la première expérience (pH=10.5) pendant 4 jours. Les matrices mésoporeuses récupérées par filtration de la solution ont été analysées par physisorption. Le résultat du calcul du volume poreux en fonction de la taille des pores est présenté sur la Figure 95 et comparé au volume poreux des SBA-15 commerciaux.

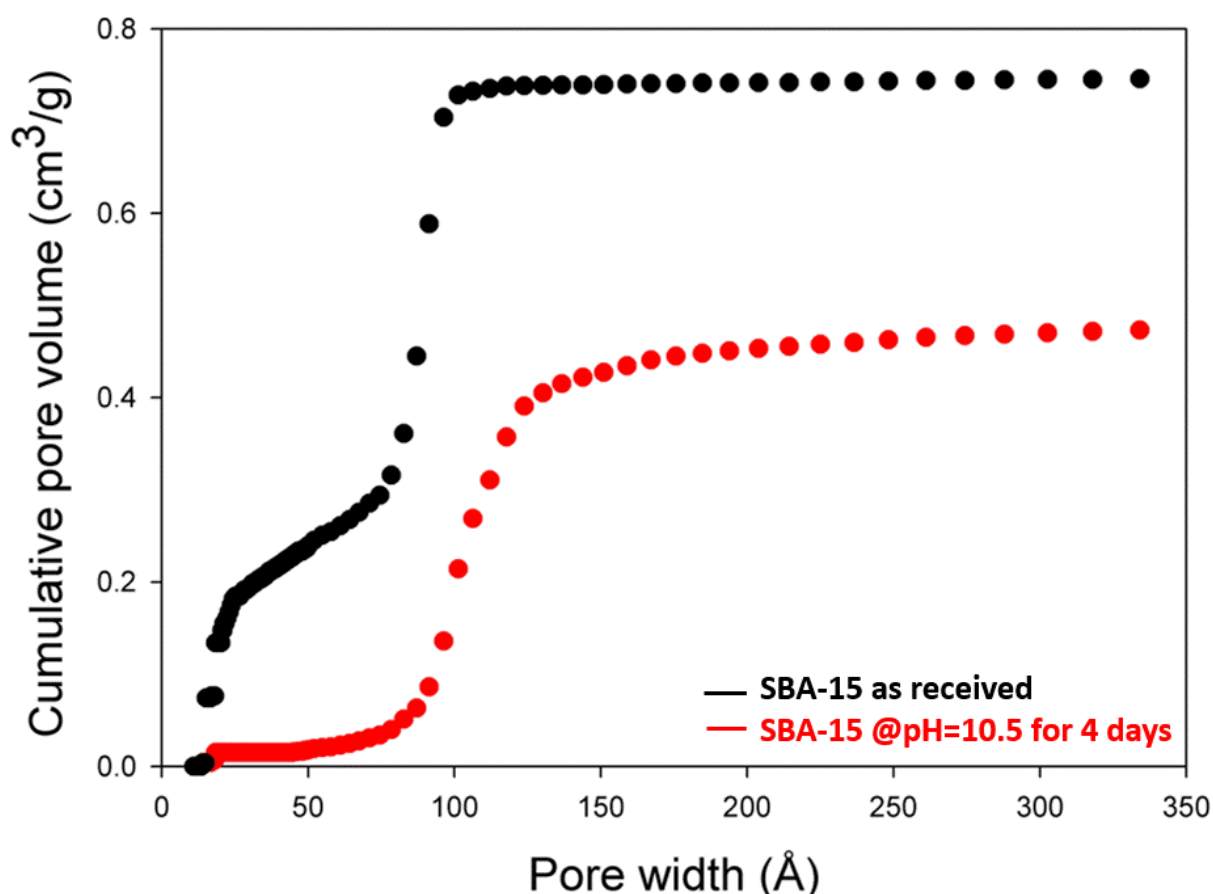


Figure 95: Volume poreux cumulé en fonction de la taille des pores, des SBA-15 commerciaux, et des SBA-15 mis en solution à pH=10.5 pendant 4 jours. Ces résultats sont issus des expériences de physisorption

La courbe des SBA-15 commerciaux présente un maximum de volume poreux autour de $0.75 \text{ cm}^3/\text{g}$. Ce maximum est plus faible pour les SBA-15 mis en solution ($\sim 0.4 \text{ cm}^3/\text{g}$). Ce premier résultat indique que la structure poreuse est endommagée à l'issue des 4 jours en solution. Il est également clair qu'entre les deux courbes, il existe une différence du volume poreux, lorsque le diamètre des pores est compris entre 2 et 7 nm. En effet, comme cela a été décrit dans le chapitre I, les SBA-15 commerciaux possèdent des micropores de l'ordre de 3 nm. Ces micropores ne sont pas détectés pour les SBA-15 mis en solution à pH=10.5. En plus du volume poreux, la surface spécifique a été évaluée. Celle-ci est de l'ordre de $792 \text{ m}^2/\text{g}$ et de $250 \text{ m}^2/\text{g}$ pour les SBA-15 commerciaux et les SBA-15 mis en solution pendant 4 jours respectivement.

En résumé, la mise en solution pendant 4 jours des SBA-15 à pH=10.5 provoque la perte d'environ la moitié du volume poreux et induit une chute drastique de la surface spécifique. Ceci peut expliquer la difficulté à charger en solution la protéine dans les SBA-15 et met en valeur la méthode de chargement à l'état solide qui d'une part préserve le volume poreux et n'endommage pas la structure des protéines, et d'autre part permet le contrôle de la capacité de chargement.

VI.4 Conclusion

Ce chapitre qui clôturera les résultats issus des travaux de cette thèse a été consacré à l'apport de la méthode de chargement à l'état solide sur d'une part la compréhension de phénomène de dissolution des nanocristaux dans le liquide sous-refroidi, et d'autre part sur la capacité de chargement des matériaux moléculaires et biomoléculaires. En effet, le chargement à l'état solide de l'ibuprofène à une fréquence de 10 Hz a permis de mettre en évidence un phénomène de dissolution des nanocristaux dans le liquide sous-refroidi. La nature de cette dissolution (partielle ou complète) se révèle particulièrement dépendante de la concentration en ibuprofène. Par ailleurs, les études menées sur le confinement du L-trp et du lysozyme montrent que la méthode de chargement assisté par broyage permet de charger n'importe quel matériau (moléculaire et biomoléculaire en fonction de sa taille) à l'état solide sans modification de la matrice support. Il a donc été montré que les matrices de silice mésoporeuses pouvaient servir de support pour véhiculer et libérer la protéine dans son état natif. L'étape suivante consistera à analyser les conditions de stabilité de la protéine confinée et à adapter ces conditions de chargement pour confiner les protéines directement après qu'elles aient été synthétisées, afin de les stabiliser dans leur état natif en évitant le recours à des procédures de lyophilisation.

D'autres perspectives liées à cette étude consisteront à étudier la libération de la protéine confinée, et de réaliser des tests antimicrobiens afin d'évaluer la performance thérapeutique de ces systèmes.

Références

1. Malfait B, Correia NT, Mussi A, Paccou L, Guinet Y, Hédoux A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;277:203-207. doi:10.1016/j.micromeso.2018.10.022
2. Takahashi H, Li B, Sasaki T, Miyazaki C, Kajino T, Inagaki S. Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001;44-45:755-762. doi:10.1016/S1387-1811(01)00257-8
3. Pandya PH, Jasra RV, Newalkar BL, Bhatt PN. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;77(1):67-77. doi:10.1016/j.micromeso.2004.08.018
4. Lee CH, Lin TS, Mou CY. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*. 2009;4(2):165-179. doi:10.1016/j.nantod.2009.02.001
5. Shin S, Kim HS, Kim MI, Lee J, Park HG, Kim J. Crowding and confinement effects on enzyme stability in mesoporous silicas. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;144:118-126. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.034
6. Falahati M, Saboury AA, Ma'mani L, Shafiee A, Rafieepour HA. The effect of functionalization of mesoporous silica nanoparticles on the interaction and stability of confined enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012;50(4):1048-1054. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.02.032
7. Kao KC, Lin TS, Mou CY. Enhanced Activity and Stability of Lysozyme by Immobilization in the Matching Nanochannels of Mesoporous Silica Nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2014;118(13):6734-6743. doi:10.1021/jp4112684
8. Popat A, Hartono SB, Stahr F, Liu J, Qiao SZ, Qing (Max) Lu G. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*. 2011;3(7):2801. doi:10.1039/c1nr10224a
9. Bhattacharyya MS, Hiwale P, Piras M, et al. Lysozyme Adsorption and Release from Ordered Mesoporous Materials. *J Phys Chem C*. 2010;114(47):19928-19934. doi:10.1021/jp1078218

10. Steri D, Monduzzi M, Salis A. Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;170:164-172. doi:10.1016/j.micromeso.2012.12.002
11. Deodhar GV, Adams ML, Trewyn BG. Controlled release and intracellular protein delivery from mesoporous silica nanoparticles. *Biotechnology Journal*. 2017;12(1):1600408. doi:10.1002/biot.201600408
12. Guinet Y, Paccou L, Hédoux A. Co-Amorphous Versus Deep Eutectic Solvents Formulations for Transdermal Administration. *Pharmaceutics*. 2023;15(6):1710. doi:10.3390/pharmaceutics15061710
13. Guinet Y, Paccou L, Hédoux A. Low-Frequency Raman Spectroscopy: An Exceptional Tool for Exploring Metastability Driven States Induced by Dehydration. *Pharmaceutics*. 2023;15(7):1955. doi:10.3390/pharmaceutics15071955
14. Kruk M, Jaroniec M, Ko CH, Ryoo R. Characterization of the Porous Structure of SBA-15. *Chem Mater*. 2000;12(7):1961-1968. doi:10.1021/cm000164e
15. Zholobenko VL, Khodakov AY, Impérator-Clerc M, Durand D, Grillo I. Initial stages of SBA-15 synthesis: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2008;142(1-2):67-74. doi:10.1016/j.cis.2008.05.003
16. Dudognon E, Danède F, Descamps M, Correia NT. Evidence for a New Crystalline Phase of Racemic Ibuprofen. *Pharmaceutical research*. 2008;25(12):2853-2858. doi:10.1007/s11095-008-9655-7
17. Malfait B, Correia NT, Ciotonea C, et al. Manipulating the physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: Impact of the loading degree. *J Chem Phys*. 2020;153(15):154506. doi:10.1063/5.0020992
18. Hamilton BD, Ha JM, Hillmyer MA, Ward MD. Manipulating Crystal Growth and Polymorphism by Confinement in Nanoscale Crystallization Chambers. *Acc Chem Res*. 2012;45(3):414-423. doi:10.1021/ar200147v
19. Malfait B. *Confinement de Matériaux Thérapeutiques à l'échelle Nanométrique : Apport Du Chargement à l'état Solide à La Compréhension Des Mécanismes de Stabilisation Des États Physiques Confinés et Aux Applications Pharmaceutiques*. These de doctorat. Université de Lille (2018-2021); 2019. Accessed September 18, 2023. <https://theses.fr/2019LILUR051>
20. Schneider-Helmert D, Spinweber CL. Evaluation of L-tryptophan for treatment of insomnia: A review.

21. Hartmann E, Cravens J. Hypnotic Effects of L-Tryptophan. *Archives of General Psychiatry*. 1974;31(3):394-397. doi:10.1001/archpsyc.1974.01760150098014
22. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:IJTR.S2129. doi:10.4137/IJTR.S2129
23. Balas F, Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(3):514-522. doi:10.1016/j.actbio.2007.11.009
24. Görbitz CH, Törnroos KW, Day GM. Single-crystal investigation of L-tryptophan with $Z' = 16$. *Acta Cryst B*. 2012;68(5):549-557. doi:10.1107/S0108768112033484
25. Moutamenni B, Tabary N, Mussi A, et al. Milling-Assisted Loading of Drugs into Mesoporous Silica Carriers: A Green and Simple Method for Obtaining Tunable Customized Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):390. doi:10.3390/pharmaceutics15020390
26. Holzapfel K, Liu J, Rades T, Leopold CS. (Co-)amorphization of enantiomers – Investigation of the amorphization process, the physical stability and the dissolution behavior. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;616:121552. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121552
27. Hédoux A, Ionov R, Willart JF, et al. Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation. *The Journal of Chemical Physics*. 2006;124(1):014703. doi:10.1063/1.2139087
28. Hédoux A, Krenzlin S, Paccou L, Guinet Y, Flament MP, Siepmann J. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(40):13189. doi:10.1039/c0cp00602e
29. Hédoux A, Guinet Y, Paccou L. Analysis of the Mechanism of Lysozyme Pressure Denaturation from Raman Spectroscopy Investigations, and Comparison with Thermal Denaturation. *J Phys Chem B*. 2011;115(20):6740-6748. doi:10.1021/jp2014836
30. Starciuc T. *Apport de La Spectroscopie Raman à l'étude Des Mécanismes de Stabilisation Des Protéines Par Les Disaccharides et Cyclodextrines*. These de doctorat. Lille 1; 2017. Accessed June 14, 2023. <https://www.theses.fr/2017LIL10179>

31. Surewicz WK, Mantsch HH, Chapman D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry*. 1993;32(2):389-394. doi:10.1021/bi00053a001
32. Katiyar A, Ji L, Smirniotis P, Pinto NG. Protein adsorption on the mesoporous molecular sieve silicate SBA-15: effects of pH and pore size. *Journal of Chromatography A*. 2005;1069(1):119-126. doi:10.1016/j.chroma.2004.10.077
33. Moerz ST, Huber P. pH-Dependent Selective Protein Adsorption into Mesoporous Silica. *J Phys Chem C*. 2015;119(48):27072-27079. doi:10.1021/acs.jpcc.5b09606
34. Kubiak-Ossowska K, Cwieka M, Kaczynska A, Jachimska B, Mulheran PA. Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: effects of pH on protein layer structure. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(37):24070-24077. doi:10.1039/C5CP03910J
35. Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *J Phys Chem B*. 2004;108(22):7323-7330. doi:10.1021/jp037303a
36. Leite-Silva VR, Silva CV da, Higuchi CT, et al. Urea incorporated into ordered mesoporous silica for potential cosmetic application. *Braz J Pharm Sci*. 2020;56:e17560. doi:10.1590/s2175-97902020000317560

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse avait pour double objectif

- (i) d'optimiser les paramètres opératoires de la méthode de chargement à l'état solide (développée au sein de l'équipe Matériaux Moléculaires et Thérapeutiques) sur des molécules de faible poids moléculaire, afin de permettre le confinement de protéines
- (ii) d'explorer de nouveaux états physiques de la matière condensée et leurs transformations induites par la géométrie de confinement.

Une première partie de ce travail a été donc consacrée à l'analyse des paramètres opératoires de la méthode de chargement à l'état solide, et en particulier à l'analyse de l'effet de la fréquence de broyage sur l'état physique de la matrice mésoporeuse et celui de la matière confinée. L'ibuprofène et les SBA-15 ont été choisis afin de réaliser cette analyse. Les résultats de cette première étude ont fait l'objet du troisième chapitre de cette thèse, dans lequel il a été démontré par différentes techniques (MEB, physisorption, SAXS) que le broyage à 30 Hz réduit grandement la taille des particules des matrices de silice mésoporeuses, et le volume poreux mais ne modifie que peu la taille des pores. Il a été montré également dans ce chapitre, que le broyage à 10 Hz préserve la taille des particules, ne modifie pas la taille des pores et permet de conserver le volume poreux initial des SBA-15. Ceci a eu une conséquence sur le taux de chargement maximal qui passe de 37% en masse d'ibuprofène dans le cas d'un broyage à 30 Hz à 42% en masse dans le cas d'un broyage à 10 Hz. L'impact de la fréquence de broyage sur l'état physique de l'ibuprofène a été également étudié. Il a été montré qu'un broyage à faible intensité (10 Hz) favorisait la présence de matière nanocristalline au sein des pores, par rapport à un broyage à 30 Hz où la matière confinée est totalement amorphe. Ce phénomène a pu être expliqué par une réduction de taille de grains (d'ibuprofène) bien plus

importante lors d'un broyage à haute intensité qui engendre une diminution significative de la température de fusion de la forme I. Cette première étude a donc permis de montrer l'importance de contrôler la fréquence de broyage dans la mesure où celle-ci a des conséquences notables sur la capacité de chargement et sur l'état physique de l'ibuprofène confiné. Il sera intéressant dans des travaux de recherche ultérieurs d'effectuer des analyses similaires sur d'autres principes actifs afin que ce résultat puisse être généralisé.

Dans le but de modifier les profils de libération de l'ibuprofène et de prolonger sa libération, une procédure de fonctionnalisation des mésopores a été mise en place. Le remplacement des groupements silanols (Si-OH) présents sur la surface interne des SBA-15 par un groupement amine ($-\text{NH}_2$) a été une stratégie visant à améliorer l'affinité du principe actif avec la matrice de silice mésoporeuse. Dans un premier temps, des analyses thermogravimétriques ont été effectuées permettant à la fois d'affirmer la fonctionnalisation des SBA-15 et de quantifier le taux de fonctionnalisation. Ce dernier a été estimé à environ ~10% en masse des mésopores. Les matrices de silice mésoporeuses fonctionnalisées qui ont été notées SBA-15- NH_2 ont été analysées par physisorption. Les résultats ont montré qu'à l'issue de la fonctionnalisation, la taille des pores, la surface spécifique ainsi que le volume poreux ont été diminués. Cette diminution de la taille des pores a eu un impact sur l'état physique de l'ibuprofène confiné. En effet, il a été montré dans le chapitre IV, que pour la même fréquence de broyage (30 Hz), l'ibuprofène est sous forme d'un mélange de nanocristaux et d'amorphe lorsque le cobroyage est réalisé avec les SBA-15- NH_2 et est totalement amorphe lorsque le cobroyage est effectué avec les SBA-15. Ceci a été interprété par la réduction du diamètre des pores cylindriques mise en évidence par physisorption qui augmenterait la densité d'ibuprofène à l'intérieur des pores et qui favoriserait la présence de la matière cristalline.

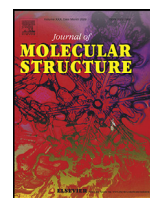
La troisième partie de cette thèse a été consacrée à l'étude des profils de libération de l'ibuprofène en fonction des conditions expérimentales de chargement. Il a été montré dans ce chapitre que le broyage à 10 Hz est un paramètre influant sur le profil de libération. La libération progressive mise en évidence dans le cas d'une fréquence de broyage faible peut être due à la longueur des canaux préservée à l'issue du broyage qui permettrait une diffusion moins rapide de l'ibuprofène vers le milieu aqueux. La présence des nanocristaux dans les systèmes qui contiennent les SBA-15-NH₂ a également pour effet de retarder la libération de l'ibuprofène. Afin de concevoir un système à libération « réellement » prolongée, une des pistes qui peut être explorée consiste en l'enrobage des particules de silice chargée dans une matrice de polymère biodégradable qui agira comme une barrière de diffusion selon le polymère utilisé et ses caractéristiques physico-chimiques. Toutefois cette méthode n'est pas compatible avec un actif confiné en phase amorphe dans la mesure où l'étape d'enrobage polymère nécessite une mise en solution des particules de silices chargées. L'électrofilage, technique innovante de mise en forme de polymères sous forme de nanofibres, paraît particulièrement adaptée à cette thématique dans la mesure où elle permettrait de disperser de manière homogène et en voie sèche (à l'état de poudre), la silice chargée au sein de la matrice polymère tout en s'assurant une grande réactivité de par la grande surface spécifique des nanofibres.

La dernière étape de cette étude a été de montrer l'apport de la méthode de chargement à l'état solide d'une part dans la compréhension de phénomènes physiques inhérents au confinement par cette méthode et d'autre part dans le confinement des acides aminés hydrophobes et des protéines. En effet, les nanocristaux présents dans les composites IBP:SBA-15(10Hz) se sont révélés plus ou moins stables en fonction du degré de remplissage des pores. Des cinétiques de dissolution de ces nanocristaux dans le liquide sous-refroidi ont été mises en évidence par spectroscopie Raman, par DSC et par diffusion des rayons X aux petits angles. Ces différentes techniques ont permis de montrer

que la nature de la dissolution (complète ou partielle) est dépendante de la proportion de nanocristaux dans le composite. Ceci suggère qu'une proportion minimum de liquide sous-refroidi est nécessaire au sein des canaux pour leur dissolution. Une valorisation intéressante de notre méthode de chargement est de pouvoir l'appliquer à différents types de matériaux qui présentent des difficultés à être confinés par des méthodes de chargement classiques. Nous avons ainsi pu réaliser le confinement d'acides aminés hydrophobes (L-Tryptophane), sans modification de surface, en proportion importante. Dans une seconde étape, nous avons montré que notre technique permettait le chargement d'une protéine (lysozyme), en proportion importante en préservant son état natif, ce qui n'est pas forcément le cas à partir d'une solution dont le pH doit être basique ce qui est source de dénaturation.

Une perspective importante à cette étude consiste à rendre 'intelligent' nos dispositifs d'administration de protéines thérapeutiques en concevant des enrobages qui puissent répondre à un stimulus afin de libérer la protéine sur le site ciblé. Nous avons montré que notre méthode de chargement permettait le dosage précis de molécules ou biomolécules actives. Il s'agit d'une première étape à la conception de dispositifs d'administration de médicaments ou biomédicaments, qui permette de modifier le dosage du principe actif facilement. Une autre perspective intéressante consiste à confiner la protéine directement après sa synthèse, généralement effectuée en solution. Certaines protéines sont très labiles et ont donc une durée de vie à l'état natif en solution très limitée. Le processus généralement utilisé pour préserver l'état natif de la protéine est de l'immobiliser dans un état solide vitreux par lyophilisation. Il s'agit d'un moyen très coûteux, qui n'évite généralement pas un certain degré de dénaturation de la protéine. Nous souhaitons adapter notre technique de confinement pour charger directement la protéine après sa synthèse, afin de contourner la procédure de lyophilisation. La mise au point de cette technique permettrait de placer la protéine synthétisée dans le dispositif d'administration en préservant son état natif.

Annexes



MAL: High performance method for loading hydrophobic molecular materials into MCM-41 mesoporous silica – analysis of confined L-tryptophan by Raman spectroscopy

Basma Moutamenni, Nicolas Tabary, Laurent Paccou, Yannick Guinet, Alain Hédoux*

Univ. Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, UMR 8207 - UMET, Unité Matériaux et Transformations, Lille F-59000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2021

Revised 5 January 2022

Accepted 7 January 2022

Available online 8 January 2022

Keywords:

Nanoconfinement

Amino acids

Ordered mesoporous silica

Low-frequency Raman spectroscopy

Loading methods

ABSTRACT

The capabilities of the recent MAL (Milling-Assisted Loading) method were analyzed for the geometric confinement of amino acids within mesoporous silica matrices. The present study has shown a high filling degree (45 wt%) of L-tryptophan into unmodified MCM-41 pores. It was shown that the low-frequency Raman spectroscopy is a suited technique to determine that molecular materials are actually confined into silica-based ordered mesoporous materials from the analysis of lattice mode region, and to probe the molecular conformation of confined materials and their interaction with the pore surface from the analysis of internal vibrations.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ordered mesoporous silicas (MPS) have considerably focused analyzes over the past twenty [1,2] years, especially in the pharmaceutical area serving as drug-delivery systems (DDS). These DDS provide two considerable advantages. The first is inherent to the physical state (amorphous or nanocrystals) of pharmaceutical ingredients (APIs) confined at the nanoscale, providing enhanced bioavailability and physical stability [3]. The second advantage is related to their inorganic nature permitting them to overcome physiologic barriers, for delivering the active APIs on the targeted site. On the other hand, their weak loading capacity was considered as an insurmountable obstacle to their development [3,4]. Moreover, the common loading methods require the use of toxic solvents. Consequently, a considerable attention has been paid to the loading methods [5,6] in order to overcome these inconveniences unacceptable for the therapeutic use. Loading methods can be classified in two categories: solvent-free methods and solvent-based methods [6]. Despite they required organic solvents, often inconsistent with therapeutic applications, the most commonly used are solvent-based methods i.e. adsorption [7], incipient wetness impregnation [8], solvent evaporation [9]. More recently, co-spray drying [10], diffusion supported loading methods have been developed [11]. Solvent-free methods are less widely used, despite a

better compatibility with the therapeutic application. Melt method [12] can be considered as very efficient but only for low- T_m APIs [13], melting of high- T_m APIs could be responsible for chemical degradation. It was shown that physical mixing gives the opportunity to load easily APIs within mesoporous silica matrices [14]. Interestingly, the authors have recently introduced an innovative method for loading APIs within mesoporous silicas at the solid state [15]. This MAL (milling-assisted loading) method gives the opportunity to overcome the obstacles to the therapeutic use of MPS as DDS. It was shown [15] that co-milling MPS with APIs for 30 min maximum makes possible the loading of a large amount of APIs (35 to 40 wt%) while preserving the ordered structure of MPS, without use of organic solvents. Consequently, this green loading method provides opportunities for developing MPS as DDS. Additionally, selecting the pore geometry (pore diameter) makes possible to manipulate the physical state of ibuprofen [16]. A subtle tuning of the average pore diameter from 6 to 9 nm induces the presence of nanocrystals coexisting with amorphous ibuprofen, with a significant impact on the drug release profiles [16]. Besides the great impact of MAL method on the DDS development, it was shown that this loading method makes possible to explore new routes (phase transformations) to achieve new physical states, only existing under confinement at the nanoscale [17,18]. The fundamental difference between MAL and impregnation methods is related to the physical state of the confined materials. Co-milling of MPS and molecular materials induces the confinement of pre-existing nuclei which can grow. That makes possible crystalliza-

* Corresponding author.

E-mail address: alain.hedoux@univ-lille.fr (A. Hédoux).

tion under severe spatial restriction bypassing the nucleation stage, not possible with impregnation methods. The growth and stability of nanocrystals are then controlled by the pore geometry.

The next step in the development of the MAL method consists to optimize the confinement of peptides and proteins by MAL for delivering biopharmaceuticals considered as the medicines of the future. One of the most advanced biomedical applications concerns the delivery of proteins for bone tissue regeneration [19,20]. In this context, the confinement of L-tryptophan (L-Trp) by MAL was analyzed as model systems present in the three-dimensional structure of a large variety of proteins. However, the hydrophobicity of L-Trp requires the chemical modification of the pore wall for achieving a significant loading capacity [19,20]. In this study, we used unmodified MCM-41 matrices to estimate the loading capacity of hydrophobic materials by MAL.

Among the large variety of experimental techniques used for probing confined materials, most of which being probes of the physical state, except thermogravimetry analysis (TGA) [16] and gas sorption. It is worth noting that gas sorption provides important data on surface area and porosity (distribution of pore size) of mesoporous silica [21]. Microscopy [22] (SEM, TEM, AFM) are also used for providing information relative to morphology and geometry of pores. Obtaining information on the physical state of APIs is more difficult given the sample preparation required for the analysis and the destructive nature of the electron radiation for organic compounds, especially in the case of TEM. Differential scanning calorimetry (DSC) [16,23], X-ray diffraction [16,23], NMR spectroscopy [24–27] and vibrational spectroscopy (Infrared [28] and Raman [15,29]) are the most used techniques for analyzing the physical state of APIs, also providing additional information on the filling degree of pores and the physical stability of confined APIs. In order to obtain the broadest spectrum of information on confined materials including the filling degree, the physical state of the confined material and the interactions between confined material and pore surface, Raman spectroscopy was selected. First, Raman spectroscopy doesn't request any specific sample preparation making possible spectrum acquisition five minutes maximum after obtaining composites by MAL method. Additionally, spectra were collected in a wide frequency range provide information in both the lattice mode region and the molecular fingerprint region. The low-frequency region was previously used for determining the loading capacity of SBA-15 with ibuprofen and indomethacin using MAL [15] by discriminating amorphous state from crystallites, the presence of amorphous matter being indicative of confinement. It was previously shown that low-frequency Raman spectroscopy is a very sensitive tool for detecting and identifying subtle crystalline signatures developing from the early stages of crystallization, spatially restricted within a few tens of nanometers [30–32]. At higher frequencies, the molecular fingerprint region (600–1800 cm^{-1}) provides information on the possible conformational modifications of confined molecules and also on the interaction strength between pore walls and confined materials. The very weak Raman signal of MPS [15,17,18] is also a major advantage for analyzing the physical state of the confined matter and its transformations.

2. Material and methods

2.1. Sample preparation

L-Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, L-Trp) was purchased from Sigma-Aldrich (purity higher than 98%) was used as received.

Aerosil was purchased from Sigma-Aldrich (SiO_2 , $S_{\text{BET}} = 175\text{--}225 \text{ m}^2/\text{g}$) and used as is. MCM-41, CAS number: 112-02-7, ($S_{\text{BET}} = 1033 \text{ m}^2/\text{g}$, total pore volume $V_{\text{abs}} = 1.18 \text{ cm}^3/\text{g}$, and pore size $D_p = 3.6 \text{ nm}$) was purchased from Sigma-Aldrich. Additional information can be found in a recent paper [17].

MAL method consists in co-milling L-Trp and MCM-41 solid mixtures, systematically performed at 30 Hz at room temperature for 30 min, using a Mixer Mill (MM400/Retsch). In this method, L-Trp is placed with MCM-41 and one steel ball ($\varnothing=7 \text{ mm}$) inside an Eppendorf tube (5 ml) vibrating at 30 Hz. To avoid any overheating of L-Trp, milling periods (5 min) were alternated with pause periods (2 min). The total amount of (xwt L-Trp: (1-x) wt MCM-41) samples, with $0.30 \leq x \leq 0.5$, was estimated in order to fill in more than a third of the volume of the Eppendorf tube corresponding to a constant total mass of 200 mg. Composites were directly analyzed by low and high-frequency Raman spectroscopy after stopping the milling and removing powder samples out of the jar, without any additional sample preparation.

Cryomilling of L-Trp in the bulk form was performed with a cryogenic mill (Retsch cryomill), composed of an Agate jar (80 ml) and a ball ($\varnothing=21 \text{ mm}$). The vial containing 1 g of the sample is immersed in liquid nitrogen. Shuttling frequency corresponding to presented results was of 30 Hz. To avoid mechanical heating, a pause of 2 min was applied between each period of 5 min of cryomilling. The total duration of imposed cryomilling was 30 min.

2.2. Raman spectroscopy

Low-wavenumber Raman spectra were collected using a high-resolution Raman XY-Dilor spectrometer to analyze the non-polarized back-scattered light. The spectrometer is composed of three gratings characterized by a focal length of 800 mm. The choice of experimental conditions (incident radiation, entrance and exit slit width opened at 200 μm) gives a spectral resolution of about 1 cm^{-1} in the $5\text{--}250 \text{ cm}^{-1}$ region, and allows the rejection of exciting light (the 660 nm line of a solid diode laser) down to 5 cm^{-1} . The spectrometer is equipped with a liquid nitrogen cooled charge coupled device detector. The high sensitivity of the detector and the large analyzed scattered volume ($\sim 0.5 \text{ cm}^3$) allow us to record low-wavenumber Raman spectra in the $5\text{--}250 \text{ cm}^{-1}$ range in 5 min.

Raman spectra in the molecular fingerprint region were collected using a Renishaw In Via micro-Raman spectrometer equipped with a 785 nm laser diode. An achromatic lens was used to focus the laser beam on the composite and to collect the 180° scattered light in order to analyze the largest possible volume of the sample.

3. Results and discussion

3.1. Low-frequency Raman investigations

It was previously shown that a signature of confinement of molecular materials at the nanoscale by MAL was the detection of amorphous matter [15–17]. Consequently, the spectra of crystalline and amorphous L-Trp were collected in the low-frequency to be used as references for determining the nature of the physical state of L-Trp after co-milling with MCM-41. It is recognized [33] that milling molecular materials at temperatures well below T_g is a rapid and safe route for achieving the amorphous state, avoiding chemical degradation of high- T_m materials. L-Trp was then milled at low-temperature (liquid nitrogen temperature) for 30 min. The spectrum was recorded at room temperature with an acquisition time of 5 min. The spectrum was plotted in Fig. 1a after conversion of Raman intensity into reduced intensity according to:

$$I_r(\omega) = \frac{I_{\text{Raman}}(\omega, T)}{[n(\omega) + 1]\omega} \quad (1)$$

where $n(\omega)$ is the Bose-Einstein occupation factor. This transformation is required to avoid the band-shape distortion in the low-frequency region induced by temperature fluctuations. The spec-

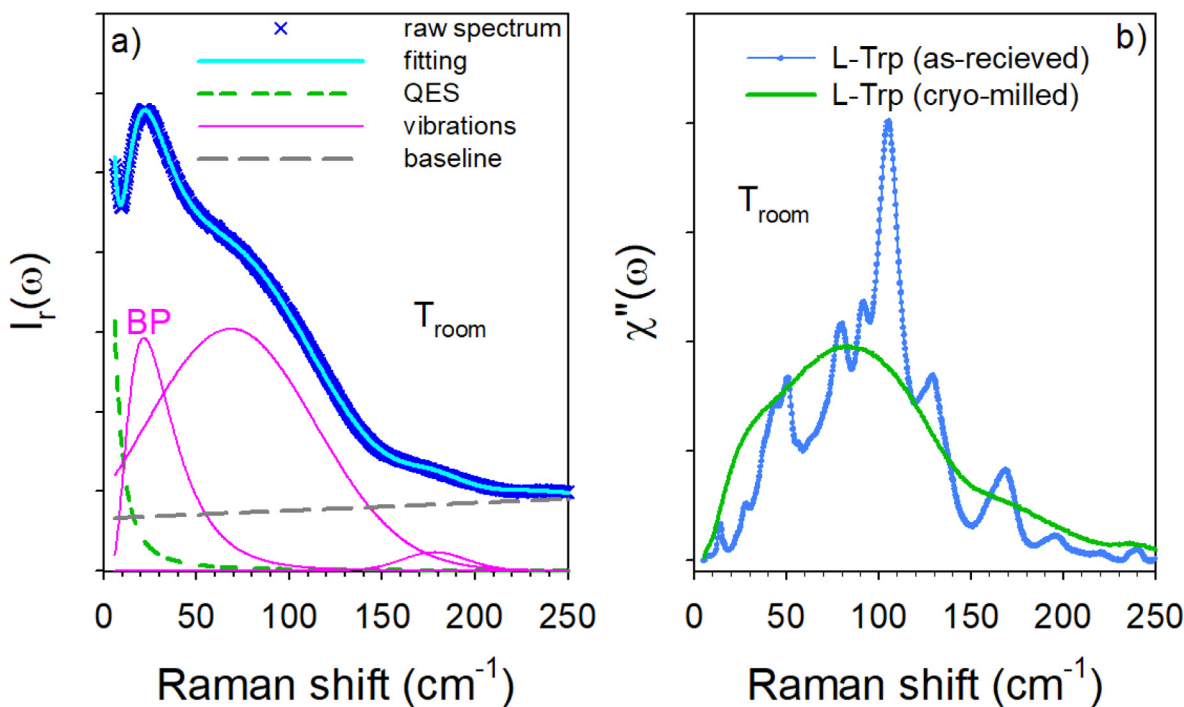


Fig. 1. Low-frequency spectrum of cryomilled L-Trp at room temperature; a) fitting procedure of the reduced intensity; b) Raman susceptibility spectrum of cryomilled L-Trp compared with the of lattice vibrations in crystalline L-Trp.

trum plotted in Fig. 1a is typical of an amorphous state, characterized by the absence of phonon peaks corresponding lattice vibrations, and the presence of a Rayleigh wing distinctive of quasielastic scattering (QES). Very disordered states in molecular materials are characterized by the overlapping of the QES contribution with vibrational components. To obtain a structural information representative of the short-range order in amorphous states, the QES contribution must be removed from the reduced intensity, and $I_r(\omega)$ can be then converted into Raman susceptibility ($\chi''(\omega)$) directly related to the vibrational density of states (VDOS, $G(\omega)$), according to [34,35]:

$$\chi''(\omega) = \omega \cdot I_r(\omega) = \frac{C(\omega)}{\omega} \cdot G(\omega) \quad (2)$$

where $C(\omega)$ is the light-vibration coupling coefficient, which can be determined from inelastic neutron scattering experiments [36,37], and often exhibits a linear ω -dependence in the very low-frequency region in various molecular materials [36,38]. The Raman susceptibility is then recognized as a very close representation of the VDOS with a spectral resolution significantly higher than that of $G(\omega)$ determined from inelastic neutron scattering data [36]. Determining the QES contribution requires the fitting procedure described in Fig. 1a. The QES is usually described by a Lorentzian shape centered at zero. The vibrational component located at the lowest frequencies is assigned to the Boson peak (BP), recognized as the universal vibrational signature of the amorphous state [36,39] and associated to the deviation of $G(\omega)$ from the ω^2 -behavior, i.e. the excess of VDOS in the very low-frequency range. Other additional vibrational components were described by mixed Gaussian-Lorentzian band-shapes. After subtraction of QES from the reduced intensity, $I_r(\omega)$ was converted into $\chi''(\omega)$ according to Eq. (2). The $\chi''(\omega)$ spectrum was plotted in Fig. 1b, and compared with the spectrum of lattice vibrations of crystalline L-Trp. The phonon peaks are the signature of the crystalline symmetry and are only detected for a molecular long-range order with periodic conditions. The band width of phonon peaks is mostly depend-

ing on the extension of the long-range order for quasi-harmonic collective motions. In this context, the low-frequency spectra of nanocrystalline states are then resembling spectra of amorphous states [40]. Using Raman spectroscopy in the low-frequency region revealed a distribution of physical states of ibuprofen embedded in SBA-15, from the microcrystalline to the amorphous state via nanocrystals [16].

In a first step the influence of milling for 30 min at 30 Hz on L-Trp at room temperature was analyzed, when L-Trp was milled alone, and milled with aerosil (50 – 50 wt%), the basic component of MCM-41. The low-frequency spectra were plotted in the Raman susceptibility representation in Fig. 2 with the spectrum of as-received L-Trp. This comparison indicates a very weak impact of the milling on the physical state of L-Trp when milled alone, and slightly enhanced when it was milled with aerosil. The weak broadening of phonon peaks corresponding to the lattice modes observed after milling reflects a weak reduction of the grain size, as generally observed for Bragg peaks by powder X-ray diffraction, and a marginal influence of aerosil on the physical state of L-Trp during milling for 30 min.

In a second step, freshly prepared (L-Trp:MCM-41) composites were analyzed for various L-Trp concentrations ranging from 30 wt% up to 50 wt%. Spectra of freshly prepared composites were plotted in Fig. 3 in Raman susceptibility representation by step of 5 wt% L-Trp. It is clearly observed that all Raman spectra plotted in Fig. 3a are similar to the spectrum of cryo-milled L-Trp, with subtle structuration located within the frame in Fig. 3, reminiscent of the crystal and indicating a nano-structured state very close to the amorphous state. Given that milling L-Trp (without or with aerosil) does not induce so important spectral changes, these spectra indicate that the physical state of L-Trp within the composites is nanocrystallized. A detailed inspection of spectra plotted in Fig. 3b without shift along the Y-axis, clearly shows that the crystalline signature of L-Trp increases from 45% of L-Trp indicating the filling limit of loading L-Trp inside MCM-41 pores close to 45%.

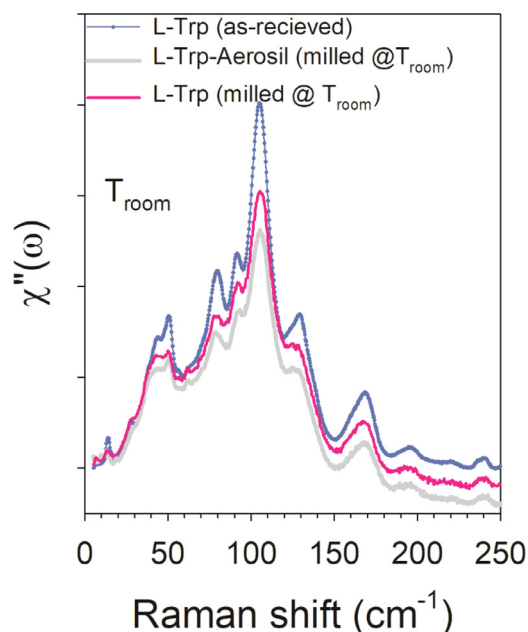


Fig. 2. Raman susceptibility spectra of L-Trp milled at room temperature alone and comilled with aerosil, compared with the spectrum of L-Trp (as-received); spectra were arbitrarily shifted along the Y axis for better clarity.

3.2. High-frequency Raman investigations

The molecular fingerprint region was used to analyze the molecular conformation of L-Trp under confinement, and to probe the interaction between L-Trp and the pore surface. As for low-frequency investigations, the spectra of as-received L-Trp, cryo-milled L-Trp and L-Trp milled at room temperature, were compared in the 800–1650 cm^{-1} region in Fig. 4. The spectrum of amorphous

L-Trp appears as the broadened spectrum of the crystal, as it can be expected for a very disordered state. This broadening is resulting from disordered molecular configurations, inducing breaking of molecular interactions, e.g. H-bonds, responsible for frequency shifts of Raman bands. The 1500–1600 cm^{-1} region enlarged in Fig. 4b clearly shows both broadening and frequency shifts of Raman bands. DFT calculations using TmoleX software provide the attribution of Raman bands located at 1550 and 1630 cm^{-1} , as corresponding to CH_2 bending and $\text{C}=\text{O}$ stretching respectively. Note that these vibrations can be affected or coupled with the motions of neighbor atom groups, as observed in amide I bands of proteins [41] mainly corresponding to $\text{C}=\text{O}$ stretching vibrations with minor contributions of $\text{C}-\text{N}$ stretching vibration and $\text{C}-\text{N}-\text{H}$ bending motions. This can partly explain the frequency shift between calculated and experimental Raman bands. It is worth noting that both bands can be used to probe molecular associations via H-bonds, NH_2 and $\text{C}=\text{O}$ groups being involved in H-bonding in the crystal [42]. In this context, the shift toward the high frequencies of the 1630 cm^{-1} band is likely reflecting the break of H-bonds in the amorphous state, making harder stretching vibrations oppositely to NH_2 bending vibrations the 1550 cm^{-1} shifting toward the low frequencies.

The spectrum of amorphous L-Trp was then compared in Fig. 5 with the spectrum of the composite containing 40% of L-Trp. No strong difference can be detected between the spectrum of the amorphous state in the bulk form and the spectrum of the composite, reflecting no change in the molecular conformation of L-Trp under geometric confinement. It is worth noting that this spectral region does not allow to distinguish the amorphous state from the nano-crystallized state. This is an additional validation of the very high sensitivity of the low-frequency region to detect subtle traces of crystallization. However, a detailed inspection of Fig. 5b makes possible to detect a shift of the 1630 cm^{-1} band in amorphous L-Trp toward the high frequencies compared to spectrum of the composite. This shift of the $\text{C}=\text{O}$ stretching band could be considered as the signature of H-bond interactions ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}-\text{Si}$) between L-

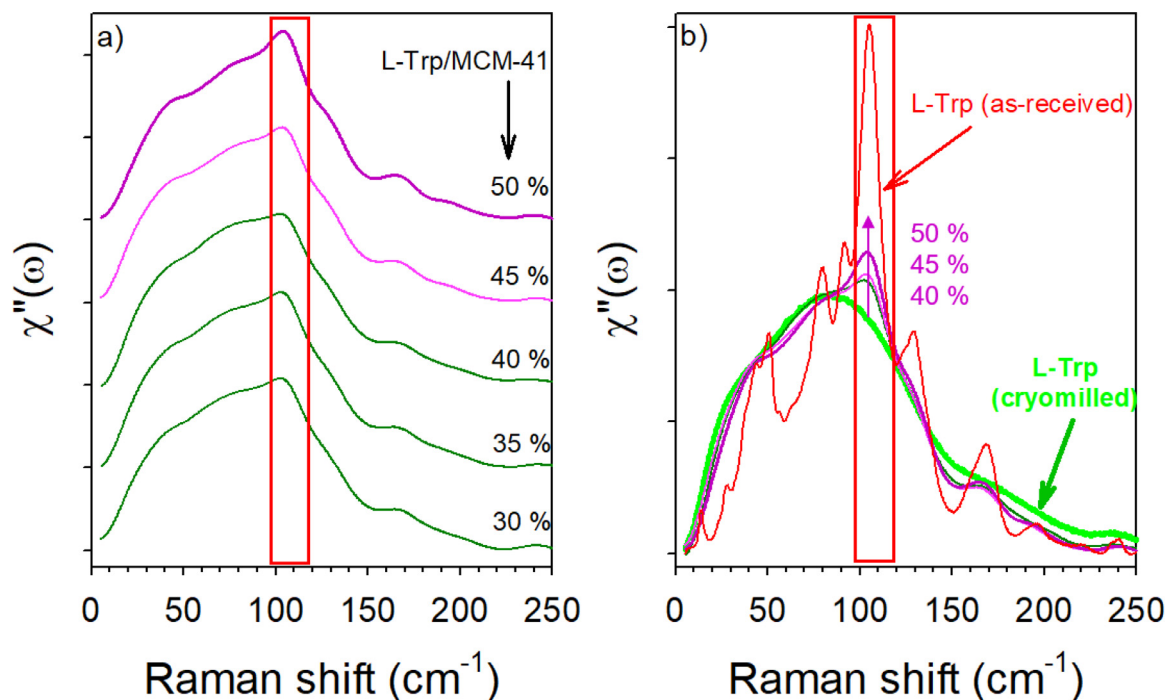


Fig. 3. Raman spectra of L-Trp:MCM-41 composites at various mass concentrations of L-Trp ranging from 30 to 50 %. The red box highlights the most intense signature of crystalline L-Trp; a) Spectra are arbitrarily shifted along the y-axis for better clarity; b) Spectra of composites ranging from 40 to 50 % of L-Trp are compared with spectra of amorphous and crystalline L-Trp, to show the increase of the crystalline signature from 45 % of L-Trp.

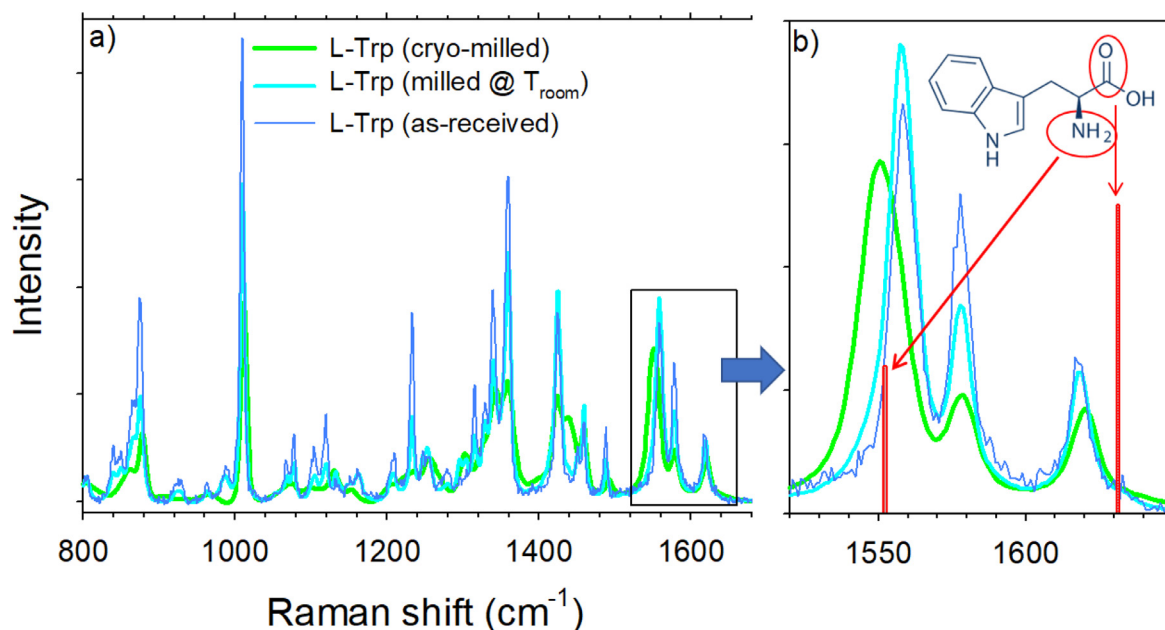


Fig. 4. Raman spectra of as-received L-Trp, cryo-milled L-Trp and L-Trp milled at room temperature a) in the molecular fingerprint region; b) in the 1520–1650 cm⁻¹ spectral range; vertical bars correspond to calculated frequencies of motions which involve atom groups inside ellipses.

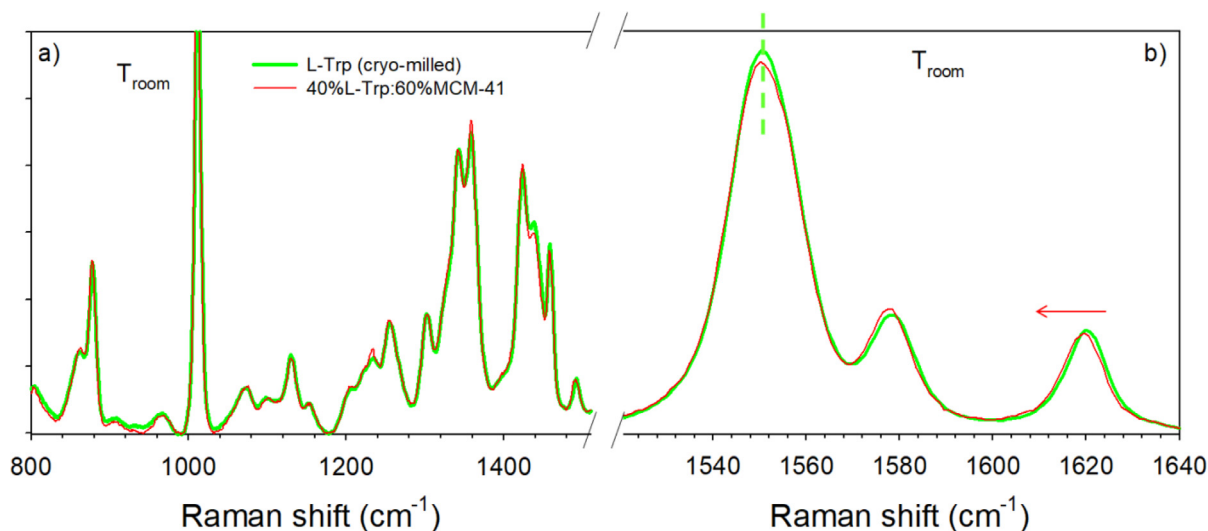


Fig. 5. Comparison between Raman spectra of composite and the bulk form of amorphous L-Trp; a) in the 800 – 1520 cm⁻¹ region; b) in the 1520 – 1640 cm⁻¹ region; the horizontal arrow shows the frequency shift of the C = O stretching band in the spectrum of the composite considered as a signature of weak interactions between L-Trp and the pore surface.

Trp and the pore surface. It is worth noting that this interaction is relatively weak (weak frequency shift of the 1630 cm⁻¹ in composites compared to the bulk form of amorphous L-Trp).

Conclusion

The present study reveals the high performance of MAL method for loading hydrophobic molecular materials into unmodified MCM-41 matrices. About 45 wt% of L-Trp was loaded inside MCM-41 pores, while previously less than 10 wt% can be loaded into modified SBA-15 [10]. It was also shown that only 40 wt% of active pharmaceutical ingredients can be loaded in SBA-15 [15, 16] or MCM-41 [17]. As it can be expected from its hydrophobic character, L-Trp has weak interactions with the pore surface that can be considered as promoting the filling degree of this amino acid.

Given that hydrophobicity is a common property of many essential amino acids, the high filling degree within MPS by MAL could be a general result for amino acids. It can be also expected that this solid-state loading method could be used to confine proteins into MPS matrices. The next stages to this study will be the analysis of the physical stability of amino acids into the pores and the analysis of release profiles.

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

Basma Moutamenni: Investigation, Writing – original draft. **Nicolas Tabary:** Writing – review & editing. **Laurent Paccou:** Investigation. **Yannick Guinet:** Conceptualization, Validation, Formal analysis. **Alain Hédoux:** Supervision, Conceptualization, Formal analysis, Writing – review & editing.

References

- [1] M. Vallet-Regi, A. Ramila, R.P. Del Real, J. Perez-Pariente, A new property of MCM-41: drug delivery system, *Chem. Mater.* 13 (2001) 308–311.
- [2] E. Jure, F. Kleitz, On the nanopore confinement of therapeutic drugs into mesoporous silica materials and its implications, *Microporous Mesoporous Mater.* 270 (2018) 109–119.
- [3] S.J. Dengale, H. Grohgan, T. Rades, K. Lobmann, Recent advances in coamorphous drug formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 100 (2016) 116–125.
- [4] C.A. Prestidge, T.J. Barnes, C.-H. Lau, C. Barnett, A. Loni, L. Canham, Mesoporous silicon: a platform for the delivery of therapeutics, *Expert Opin. Drug Deliv.* 4 (2007) 101–110.
- [5] K. Trzeciak, A. Chotera-Ouda, I. Bak-Sypien, M. Potrzebowski, Mesoporous silicaparticles as drug delivery systems - The state of the art in loading methods and the recent progress in analytical techniques for monitoring these processes, *Pharmaceutics* 13 (2021) 950.
- [6] K.B. Seljak, P. Kocbek, M. Gašperlin, Mesoporous silica nanoparticles as delivery carriers: an overview of drug loading techniques, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 59 (2020) 101906.
- [7] V. Ambrogi, L. Perioli, F. Marmottini, O. Accorsi, C. Pagano, M. Ricci, B. Rossi, Role of mesoporous silicates on carbamazepine dissolution rate enhancement, *Micropor. Mesopor. Mater.* 113 (2008) 445–452.
- [8] G.F. Andrade, D.C.F. Soares, R.K. Almeida, E.M.B. Sousa, Mesoporous silica SBA-16 functionalized with Alkoxysilane groups: preparation, characterization, and release profile study, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1687–4110.
- [9] R. Mellaerts, J.A.G. Jammaer, M. Van Speybroeck, H. Chen, J.V. Humbeeck, P. Augustijns, G. Van den Mooter, J.A. Martens, Physical State of Poorly Water Soluble Therapeutic Molecules Loaded into SBA-15 Ordered Mesoporous Silica Carriers: a Case Study with Itraconazole and Ibuprofen, *Langmuir* 24 (2008) 8651–8659.
- [10] S. Hong, S. Shen, D.C.T. Tan, W.K. Ng, X. Liu, L.S.O. Chia, A.W. Irwan, R. Tan, S.A. Nowak, K. Marsh, R. Gokhale, High drug load, stable, manufacturable and bioavailable fenofibrate formulations in mesoporous silica: a comparison of spray drying versus solvent impregnation methods, *Drug. Deliv.* 23 (2016) 316–327.
- [11] K. Trzeciak, S. Kazmierski, E. Wielgus, M. Potrzebowski, DiSupLo - New extremely easy and efficient method for loading of active pharmaceutical ingredients into the pores of MCM-41 mesoporous silica particles, *Micro. Meso. Mater.* 308 (2020) 110506–110523.
- [12] V. Ambrogi, L. Perioli, C. Pagano, F. Marmottini, M. Moretti, F. Mizzi, C. Rossi, Econazole Nitrate-loaded MCM-41 for an antifungal topical powder formulation, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 4738–4745.
- [13] E. Skorupska, A. Jeziorna, M. Potrzebowski, Thermal Solvent-free method of loading of pharmaceutical cocrystals into the pores of silica particles: a case of naproxen/picolinamide cocrystal, *J. Phys. Chem. C* 120 (2016) 13169–13180.
- [14] R.J. Ahern, J.P. Hanrahan, J.M. Tobin, K.B. Ryan, A.M. Crean, Comparison of fenofibrate-mesoporous silica drug-loading processes for enhanced drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 50 (2013) 400–409.
- [15] B. Malfait, N. Correia, A. Mussi, L. Paccou, Y. Guinet, A. Hédoux, Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: application to ibuprofen, *Micro. Meso. Mater.* 277 (2019) 203–207.
- [16] B. Malfait, N. Correia, C. Ciotonea, J. Dhainaut, J.-P. Dacquain, S. Royer, N. Tabary, Y. Guinet, A. Hédoux, Manipulating the Physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: impact of the loading degree, *J. Chem. Phys.* 153 (2020) 154506–154513.
- [17] B. Malfait, L. Paccou, N. Correia, Y. Guinet, A. Hédoux, Identification of an amorphous-amorphous two-step transformation in indomethacin embedded within mesoporous silicas, *Micro. Meso. Mater.* 328 (2021) 111502.
- [18] Y. Guinet, L. Paccou, F. Danede, A. Hédoux, Confinement of molecular materials using a solid-state loading method: a route for exploring new physical states and their subsequent transformation highlighted by caffeine confined to SBA-15 pores, *RSC Adv.* 11 (55) (2021) 34564–34571.
- [19] F. Balas, M. Manzano, M. Colilla, M. Valler-Regi, L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation, *Acta Biomater.* 4 (2008) 514–522.
- [20] M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regi, Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications, *Int. J. Nanomed.* 3 (4) (2008) 403–414.
- [21] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, Reporting physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603–619.
- [22] X. Huang, N.P. Young, H.E. Townley, Characterization and Comparison of Mesoporous Silica Particles for Optimized Drug Delivery, *Nanomater. Nanotechnol.* 4 (2014) 1–15.
- [23] M. Beinier, G. Rengarajan, S. Pankaj, D. Enke, M. Steinhart, Manipulating the crystalline state of pharmaceuticals by nanoconfinement, *Nano Lett.* 7 (5) (2007) 1381–1385.
- [24] F. Babonneau, L. Yeung, N. Steunou, C. Gervais, Solid State NMR characterization of encapsulated molecules in mesoporous silica, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 31 (2004) 219–223.
- [25] L. Pajchel, W. Kolodziejski, Synthesis and characterization of MCM-48/hydroxyapatite composites for drug delivery: ibuprofen incorporation, location and release studies, *Mater. Sci. Eng. C* 91 (2018) 734–742.
- [26] E. Skorupska, A. Jeziorna, P. Paluch, M. Potrzebowski, Ibuprofen in Mesopores of Mobil Crystalline Material 41 (MCM-41): a Deeper Understanding, *Mol. Pharmaceutics* 11 (2014) 1512–1519.
- [27] K. Trzeciak, S. Kazmierski, K. Druzwicki, M. Potrzebowski, Mapping of Guest Localization in Mesoporous Silica Particles by Solid-State NMR and Ab Initio Modeling: new Insights into Benzoic Acid and p-Fluorobenzoic Acid Embedded in MCM-41 via Ball Milling, *J. Phys. Chem. C* 125 (2021) 10096–10109.
- [28] I.V. Melnyk, G.I. Nazarchuk, M. Václavíková, Y.L. Zub, IR spectroscopy study of SBA-15 silicas functionalized with the ethylthiocarbamidepropyl groups and their interactions with Ag(I) and Hg(II) ions, *Appl. Nanosci.* 9 (2019) 683–694.
- [29] S. Hellstaen, H.Y. Qu, T. Heikkilä, J. Kohonen, S.P. Reinikainen, M. Louhi-Kultanen, Raman spectroscopic imaging of indomethacin loaded in porous silica, *Cryst. Eng. Comm.* 14 (2012) 1582–1587.
- [30] A. Hédoux, L. Paccou, Y. Guinet, J.-F. Willart, M. Descamps, Using the low-frequency Raman spectroscopy to analyze the crystallization of amorphous indomethacin, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 38 (2) (2009) 156–164.
- [31] A. Hédoux, Recent developments in the Raman and infrared investigations of amorphous pharmaceuticals and protein formulations: a review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 100 (2016) 133–146.
- [32] A. Hédoux, Y. Guinet, P. Derollez, O. Hernandez, R. Lefort, M. Descamps, A contribution to the understanding of the polymorphism situation in triphenyl phosphite, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 3192–3199.
- [33] J.-F. Willart, M. Descamps, Solid State Amorphization of Pharmaceuticals, *Mol. Pharm.* 5 (6) (2008) 905–920.
- [34] F.L. Galeener, P.N. Sen, Theory for the first-order vibrational spectra of disordered solids, *Phys. Rev. B* 17 (4) (1978) 1928–1933.
- [35] R. Shuker, R. Gammon, Raman-scattering selection-rule breaking and the density of states in amorphous materials, *Phys. Rev. Lett.* 25 (4) (1970) 222–225.
- [36] A. Hédoux, P. Derollez, Y. Guinet, A.J. Dianoux, M. Descamps, Low-frequency vibrational excitations in the amorphous and crystalline states of triphenyl phosphite: a neutron and Raman scattering investigation - art. no. 144202, *Phys. Rev. B* 63 (14) (2001) 144202.
- [37] A. Frontzek, J. Embs, L. Paccou, Y. Guinet, A. Hédoux, Low-frequency dynamics of BSA complementary studied by Raman and inelastic neutron spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 5125–5132.
- [38] T. Achibat, A. Boukenter, E. Duval, Correlation effects on Raman scattering from low-energy vibrational modes in glasses. II. Experimental results, *J. Chem. Phys.* 99 (3) (1993) 2046–2051.
- [39] E. Duval, A. Boukenter, T. Achibat, Vibrational dynamics and the structure of glasses, *J. Phys.: Condens. Matter* 2 (51) (1990) 10227–10234.
- [40] A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, Raman signature of polymorphism in triphenyl phosphite, *Phys. Rev. B* 58 (1) (1998) 31–34.
- [41] A. Hédoux, L. Paccou, Y. Guinet, Relationship between β -relaxation and structural stability of lysozyme: microscopic insight on thermostabilization mechanism by trehalose from Raman spectroscopy experiments, *J. Chem. Phys.* 140 (2014) 225102–225107.
- [42] C. Görbitz, K. Törnroos, G.M. Day, Single-crystal investigation of L-tryptophan with $Z'=16$, *Acta Cryst. B* 68 (2012) 549–557.

Article

Milling-Assisted Loading of Drugs into Mesoporous Silica Carriers: A Green and Simple Method for Obtaining Tunable Customized Drug Delivery

Basma Moutamenni ¹, Nicolas Tabary ¹ , Alexandre Mussi ¹ , Jeremy Dhainaut ², Carmen Ciotonea ³, Alexandre Fadel ¹, Laurent Paccou ¹, Jean-Philippe Dacquin ², Yannick Guinet ¹ and Alain Hédoux ^{1,*} 

¹ UMR 8207, UMET—Unité Matériaux et Transformations, University Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, F-59000 Lille, France

² UMR 8181, UCCS—Unité de Catalyse et Chimie du Solide, University Lille, CNRS, Centrale Lille, University Artois, F-59000 Lille, France

³ Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant—UCEIV, UR4492, Université du Littoral Côte d'Opale, F-59140 Dunkerque, France

* Correspondence: alain.hedoux@univ-lille.fr; Tel.: +33-320-434-677

Abstract: Mesoporous silica (MPS) carriers are considered as a promising strategy to increase the solubility of poorly soluble drugs and to stabilize the amorphous drug delivery system. The development by the authors of a solvent-free method (milling-assisted loading, MAL) made it possible to manipulate the physical state of the drug within the pores. The present study focuses on the effects of the milling intensity and the pore architecture (chemical surface) on the physical state of the confined drug and its release profile. Ibuprofen (IBP) and SBA-15 were used as the model drug and the MPS carrier, respectively. It was found that decreasing the milling intensity promotes nanocrystallization of confined IBP. Scanning electron microscopy and low-frequency Raman spectroscopy investigations converged into a bimodal description of the size distribution of particles, by decreasing the milling intensity. The chemical modification of the pore surface with 3-aminopropyltriethoxysilane also significantly promoted nanocrystallization, regardless of the milling intensity. Combined analyses of drug release profiles obtained on composites prepared from unmodified and modified SBA-15 with various milling intensities showed that the particle size of composites has the greatest influence on the drug release profile. Tuning drug concentration, milling intensity, and chemical surface make it possible to easily customize drug delivery.

Keywords: milling; physical state; low-frequency Raman spectroscopy; scanning electron microscopy; drug release profiles



Citation: Moutamenni, B.; Tabary, N.; Mussi, A.; Dhainaut, J.; Ciotonea, C.; Fadel, A.; Paccou, L.; Dacquin, J.-P.; Guinet, Y.; Hédoux, A. Milling-Assisted Loading of Drugs into Mesoporous Silica Carriers: A Green and Simple Method for Obtaining Tunable Customized Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 390. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020390>

Academic Editor: Eva Rivero-Buceta

Received: 16 December 2022

Revised: 12 January 2023

Accepted: 20 January 2023

Published: 24 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nowadays, the discovery of active pharmaceutical ingredients (APIs) with high therapeutic value exhibits a significant increase. However, most of the new drug candidates, which are in the pipelines of the pharmaceutical industry, are synthesized in the crystalline state and are often poorly water soluble, with unavoidable consequences on bioavailability [1]. Among a variety of approaches to improve solubility, dissolution rates, and bioavailability, the use of mesoporous silica (MPS) matrices as drug carriers are now considered as promising drug delivery systems [2–6] because of their high surface area, tunable pore diameter and morphology, and easily modifiable chemical surface. Additionally, their inorganic nature makes them a protective shield for active molecules against physiological attacks. It is recognized that confinement in MPS is a pathway for manipulating the physical state of APIs, making it possible to stabilize active molecules in nanocrystalline or amorphous states by varying the pore diameter [7,8]. The unstable nature of amorphous materials, considered as a substantial drawback for the use of amorphous APIs to formulate

oral dosage forms, can be overcome if the pore size is smaller than the critical radius of nucleation, inhibiting the nucleation and growth process. Unfortunately, their weak loading capacity and the toxicity of organic solvents used for loading APIs in solution were considered insurmountable obstacles to their development [9]. As a consequence, very close attention has been focused on loading methods [5,10]. They are classified into two categories, namely, the solvent-based and solvent-free methods. The solvent-based methods such as adsorption, incipient wetness impregnation, solvent evaporation, spray-drying, etc., are the most commonly used despite the often-necessary use of toxic organic solvents that are incompatible with the therapeutic application. Solvent-free methods show better compatibility with the therapeutic domain but are used much less. The best-known method in this category is the melt method, which is considered very effective [11] but can only be used for APIs with low melting temperatures [12] since melting at high temperatures could be responsible for chemical degradation and loss of therapeutic activity. It was shown that it is possible to easily load APIs into MPS by physical mixing [13]. Based on this concept, an innovative method has been developed called the milling-assisted loading (MAL) method [14], consisting of co-milling API and MPS. Co-milling the MPS and API for 30 min using an oscillating mixer at 30 Hz makes it possible to load a large amount of API (35 to 40 wt%) while preserving the ordered structure of the MPS [14,15], without the use of any organic solvent. This green method also allows the loading of a large amount of hydrophobic molecular materials, as recently shown for L-tryptophan [16], while only a very weak amount can be loaded using the most classic solvent-based methods [17,18].

The originality of the MAL method is the loading of solid-state materials that make crystallization in very small pore diameters ($\varnothing < 7$ nm) possible from pre-existing nuclei bypassing the nucleation process [19]; this is not possible using solvent-based methods. This singularity gives the opportunity to explore new physical states [20] and atypical phase transformation driven by the instability of nanocrystals inherent to the pore geometry [19].

Although this method has already been the subject of several studies aiming at optimizing the operating parameters (milling duration and filling capacity), this area is still in its infancy, and some additional parameters require investigation. The aim of this study was firstly focused on analyzing the influence of milling frequency on the material loaded into the MPS (physical state, filling degree, and dissolution rate). Secondly, the same characteristics of the loaded material were analyzed after changing the chemical surface.

SBA-15 was selected as the model MPS and racemic ibuprofen (IBP) as the model drug. Selecting SBA-15 allows tuning the pore diameter without changing the pore geometry. The previous analyses performed on the confinement of IBP within SBA-15 matrices of different pore sizes were used as references. The choice of IBP was inherent to its T_g value (about -50 °C), making its amorphization by milling impossible at room temperature [21]. Consequently, the absence of crystallized IBP after co-milling directly indicates that IBP is confined in SBA-15.

Most of the investigations of the physical state of IBP in the IBP:SBA-15 composites were performed using Raman spectroscopy. Combining low- and mid-frequency Raman investigations provides accurate information on the physical state of IBP (amorphous, nano/micro-crystalline), on the molecular conformation of IBP, and on the interaction between the pore surface and IBP via H-bonding. Previous studies have shown that the main advantage of this technique, compared with X-ray diffraction, is that the Raman signal of the MPS matrix is insignificant compared with that of APIs including IBP. Scanning electron microscopy experiments were performed to analyze the influence of milling on SBA-15.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Racemic ibuprofen (designated herein as IBP) was purchased from Sigma, Saint Louis, MO, USA, (CAS number 15687-27-1, purity $\geq 99.8\%$ GC assay) and was used without further purification. SBA-15 purchased from Sigma Aldrich was used as the MPS.

SBA-15 carriers were composed of ordered cylindrical channels characterized by a 2D hexagonal symmetry, and the channel size was determined in the present study by nitrogen physisorption measurements.

2.2. Methods

2.2.1. Milling-Assisted Loading (MAL) Method

Ibuprofen was loaded using the MAL method. Co-milling of IBP and SBA-15 solid mixtures was systematically performed at room temperature using a Retsch Mixer Mill MM400 (Haan, Germany). About 400 mg of as-received crystalline IBP and MPS powders were placed in an Eppendorf container for milling using an oscillating milling device (MM400—Retsch) for 30 min and one stainless steel ball ($\varnothing = 7$ mm) at frequencies between 10 Hz and 30 Hz. To avoid any overheating of the IBP, milling periods (5 min) were alternated with pause periods (2 min). The influence of milling on the physical state of the IBP was analyzed in Figure A1 in Appendix A. Spectra of the IBP (as-received, milled at 10 Hz and 30 Hz) are plotted in Figure A1. The comparison shows a slight broadening of phonon peaks corresponding to the size reduction in crystallites, which is mostly significant for the sample milled at 30 Hz, for which melting starts at a lower temperature than for the two other samples. Several composites were prepared corresponding to co-milling of the as-received Ibuprofen with the SBA-15 matrix in an IBP weight % of $X = 35$ to ensure the complete loading of IBP [14]. The composites are hereinafter identified as IBPX%:SBA-15, with X being the weight % of IBP.

2.2.2. Synthesis of Modified SBA-15 (SBA-15-NH₂)

Chemical modification of the pore walls of SBA-15 was realized with APTES (3-aminopropyltriethoxysilane, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$). In a typical procedure, 1 g of commercial SBA-15 was refluxed at 80 °C during 24 h in a 50 mL ethanolic solution containing 1 mL APTES under continuous stirring. The resulting sample was filtered, washed repeatedly with ethanol, and then dried at 70 °C for 12 h. The obtained sample was designated as SBA-15-NH₂.

2.2.3. Characterization of Mesoporous Silica Carriers

Nitrogen physisorption measurements were carried out at 77 K using a Micromeritics Tristar II Plus apparatus. Prior to the measurements, the samples were outgassed at 423 K for 8 h in the case of unloaded matrices, and at room temperature for 24 h in the case of loaded matrices. The specific surface areas were calculated from the linear portion of the Brunnauer–Emmett–Teller (BET) plots, and the pore size distributions were evaluated by the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method from the adsorption branch of nitrogen isotherms. The total pore volume was determined at $p/p_0 = 0.95$.

2.2.4. Electron Microscopy

Transmission electronic microscopy (TEM) investigations were performed with a FEI® Tecnai G²20Twin microscope (Plateforme de Microscopie Electronique de Lille, University of Lille, Lille, France), operating at 200 kV with a LaB₆ filament, using a double tilt sample holder. The milled and un-milled SBA-15 powder specimens were applied on lacey carbon support TEM films.

For scanning electron microscopy (SEM) observations, the samples were deposited on lacey carbon support TEM films and installed in the SEM with a TEM grid holder. SEM images were recorded using the lower second electron detector present in the chamber of a FEG-SEM JEOL JSM-7800F LV (Plateforme de Microscopie Electronique de Lille, University of Lille, Lille, France). To reduce beam damage on samples, the conditions of observation were 5 kV accelerating voltage, smallest objective lens aperture (position 4), and 10 mm working distance.

2.2.5. Drug Release Studies

The release of ibuprofen from the mesoporous matrices was monitored using an UV spectrometer (UV-1800 Spectrophotometer Shimadzu) by measuring the variations in absorbance at the wavelength of 220 nm, which correspond to the maximum of absorbance of ibuprofen in 0.1 M HCl solution.

Experimentally, at room temperature, 10 mg of composites (IBP:SBA-15/IBP:SBA-15-NH₂) were added under stirring at 100 rpm to 250 mL of 0.1 M hydrochloric acid (pH = 1.1) respecting sink conditions [22,23]. For each measurement, 2 mL of solution was collected for analysis; then, to avoid volume variations, the solution was returned into the medium. The release experiments for each sample were replicated 3 times and the presented experimental points (taken every 2 min in the first moments of the experiment, and every 5 min when equilibrium was reached), which correspond to the amount of ibuprofen delivered as a function of time, are the mean with the standard deviation. The ratio of the absorbance at a time t over the absorbance at the time t_{∞} defines the ibuprofen release percentage. Each drug release was monitored for 80 min.

2.2.6. Low-Frequency Raman Spectroscopy

Low-frequency Raman spectroscopy investigations were carried out on the high-dispersive XY-Dilor spectrometer composed of three gratings (1800 gr/mm) and equipped with a Cobolt laser emitting at 660 nm. Maintaining the slits opened at 150 μ m makes it possible to detect a Raman signal down to 5 cm⁻¹ in a high-resolution configuration (lower than 1 cm⁻¹). Composites were loaded in spherical Pyrex cells hermetically sealed. The temperature of the sample was regulated using an Oxford nitrogen flux device that keeps temperature fluctuations within 0.1 °C. Low-frequency Raman spectra (LFRS) were collected between 5 and 350 cm⁻¹ in 1 min, in situ during the heating ramp at 1 °C/min. The analysis of the LFRS requires a specific processing [24,25] inherent to the spectrum distortion induced by the temperature via the Bose factor, mostly important at very low frequencies. To obtain the low-frequency spectrum independent of temperature fluctuations, the Raman intensity $I_{Raman}(\omega, T)$ is converted into reduced intensity $I_r(\omega)$ via:

$$I_r(\omega) = \frac{I_{Raman}(\omega, T)}{[n(\omega, T) + 1]\omega} \quad (1)$$

where $n(\omega, T)$ is the Bose factor. This representation of the LFRS is generally used for highlighting a molecular disorder corresponding to fast molecular motions, which are thermally activated and detected in the low-frequency region (5–50 cm⁻¹) and considered as relaxational motions giving a contribution to the LFRS called quasielastic intensity (I_{QES}). In disordered molecular systems, the structural information is contained into the pure vibrational spectrum. It is obtained by removing the contribution of the quasielastic intensity from the $I_r(\omega)$ -spectrum which is converted into Raman susceptibility according to [26,27]:

$$\chi''(\omega) = \omega \cdot I_r(\omega) = \frac{C(\omega)}{\omega} G(\omega) \quad (2)$$

where $C(\omega)$ is the coupling coefficient between light and vibration and $G(\omega)$ is the vibrational density of states (VDOS). $\chi''(\omega)$ is recognized to be a representation very close to the VDOS [28].

3. Results

3.1. SBA-15, SBA-15-NH₂ Characterization

According to the IUPAC classification [29], the adsorption–desorption isotherms of SBA-15 and SBA-15-NH₂, plotted in Figure 1a, are of type IV with H1 hysteresis loops, indicative of ordered mesoporous materials with some microporosity. SBA-15 is well-known for its arrangement of 2D hexagonal pores [30]. After functionalization, a strong decrease in adsorbed N₂ is observed, which is related to the partial filling of pores by APTES. This is particularly marked for the micropore region ($p/p_0 < 0.2$), as APTES may be

able to clog some of the micropores. Hence, the resulting BET surface area decreases from $793 \text{ m}^2/\text{g}$ to $334 \text{ m}^2/\text{g}$, while the total pore volume decreases from $0.80 \text{ cm}^3/\text{g}$ to $0.40 \text{ cm}^3/\text{g}$ for SBA-15 and SBA-15-NH₂, respectively. Moreover, a shift of the hysteresis towards lower p/p_0 is observed as a first hint of the decrease in the mesopore diameter. Figure 1b further shows the pore size distribution as evaluated by the BJH method. After APTES grafting, the average pore size decreases from 7.1 nm for SBA-15 to 5.7 nm for SBA-15-NH₂.

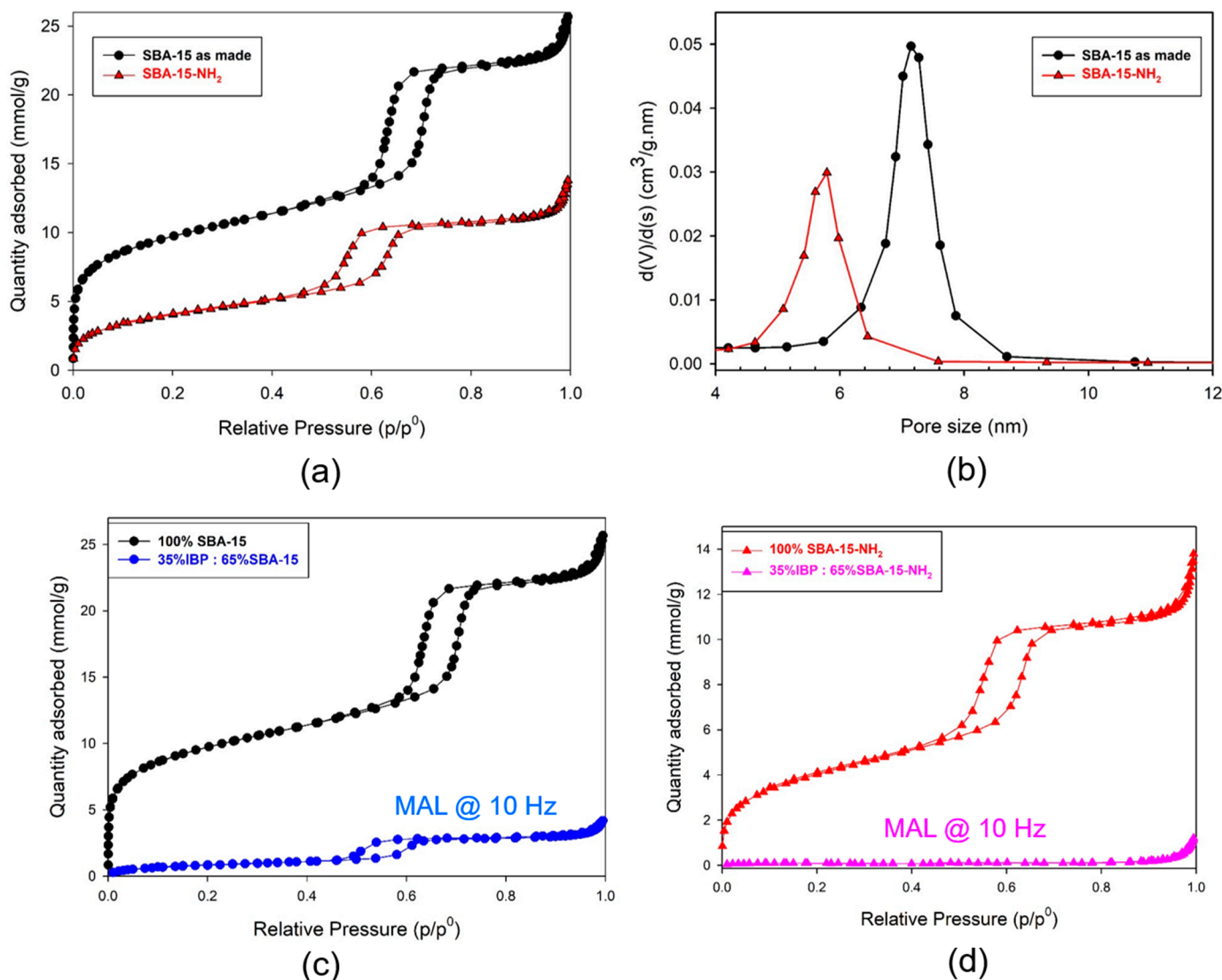


Figure 1. Characterization of mesoporous silica; (a) N₂ adsorption isotherms for SBA-15 and SBA-15-NH₂; (b) pore size distribution of SBA-15-NH₂ as given by the BJH method; (c) comparison between N₂ adsorption isotherms for SBA-15 and composites loaded by MAL at 10 Hz; (d) comparison between N₂ adsorption isotherms for SBA-15-NH₂ and composites loaded by MAL at 10 Hz.

The content of 3-aminopropyl groups grafted on the surface of SBA-15-NH₂ was evaluated by CHN (carbon, hydrogen, and nitrogen) elemental analysis giving an elemental composition of 7.35 wt% C, 2.00 wt% H, and 1.58 wt% N. This result was confirmed by a thermogravimetric analysis presented in Figure A2 in Appendix B. Experiments were also performed on composites loaded within SBA-15 and SBA-15-NH₂ by MAL at 10 Hz, for which nanocrystals were observed. The comparison of N₂ adsorption isotherms obtained with non-loaded and loaded matrices are plotted in Figure 1c,d. The significant downshift of isotherms obtained with loaded composites with respect to those obtained with non-

loaded matrices confirms that IBP was loaded inside the channels, in addition to the absence of IBP recrystallization after melting. It should be noticed that 35 wt% of IBP is not the maximum filling capacity previously determined (37 wt%) for similar mesoporous silica carriers [14], which can explain the detection of a residual amount of adsorbed N_2 corresponding to a few channels remaining free.

3.2. Raman Spectroscopy

The low-frequency spectrum (LFRS) of the undercooled liquid bulk state of IBP was directly plotted in Figure 2a in its raw Raman intensity representation. The LFRS of SBA-15 taken with the same acquisition time was also plotted in the same figure to show that its signal is negligible compared with that of IBP. After correction of the Bose factor, the spectrum obtained in the reduced intensity representation was plotted in Figure 2b. There is no direct perceptible change between Raman intensity and reduced intensity representations because of the large contribution of the quasielastic scattering in the very low-frequency region, which dominates the spectrum as expected in the very disordered molecular systems, and flattens the vibrational spectrum. Figure 2b shows the fitting procedure used to determine the contribution of quasielastic intensity to the spectrum. The quasielastic scattering is usually well represented by a Lorentzian shape centered at $\omega = 0$. After removing this contribution, the reduced intensity can be converted into Raman susceptibility according to the relation (2). The spectra of amorphous and crystalline IBP in the bulk form are plotted in the Raman susceptibility representation in Figure 3a. These can be used as references for analyzing spectra collected on IBP35%:SBA-15 composites loaded with different milling frequencies. These spectra were plotted in Figure 3b. It is clearly observed that the low-frequency band shape of composites is highly dependent on the milling frequency, with the detection of broadened phonon peaks from and below 20 Hz. The spectrum of the composite loaded at the milling frequency of 10 Hz shows very distinguishable barely broadened phonon peaks of the bulk crystalline form indicating a relatively high degree of crystallization. An enhanced intensity can be clearly detected below 40 cm^{-1} , marked with an arrow in Figure 3b, which is the signature of the amorphous IBP.

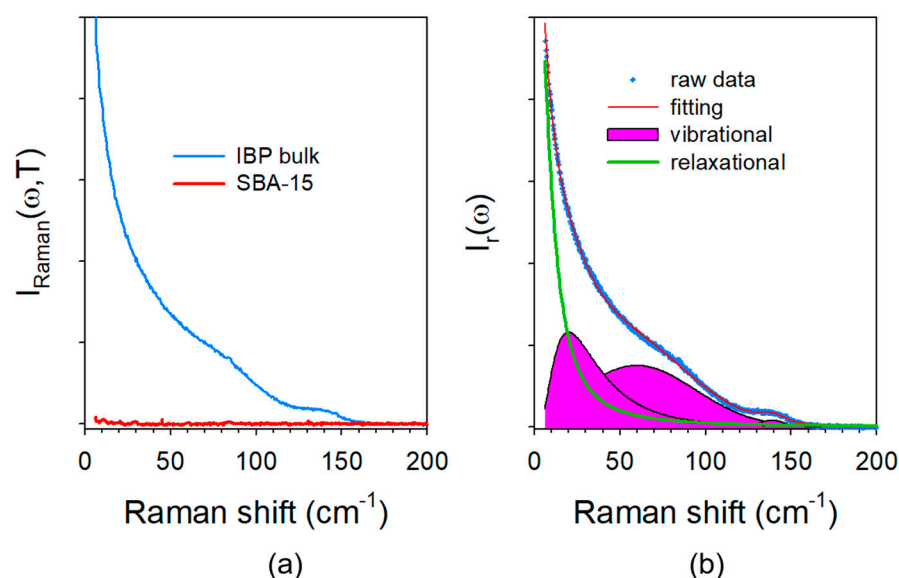


Figure 2. Low-frequency spectrum of IBP at room temperature; (a) Raman intensity of the undercooled liquid bulk of IBP compared with the spectrum of SBA-15; (b) fitting procedure of the reduced intensity used for discriminating the contributions of relaxational and vibrational motions.

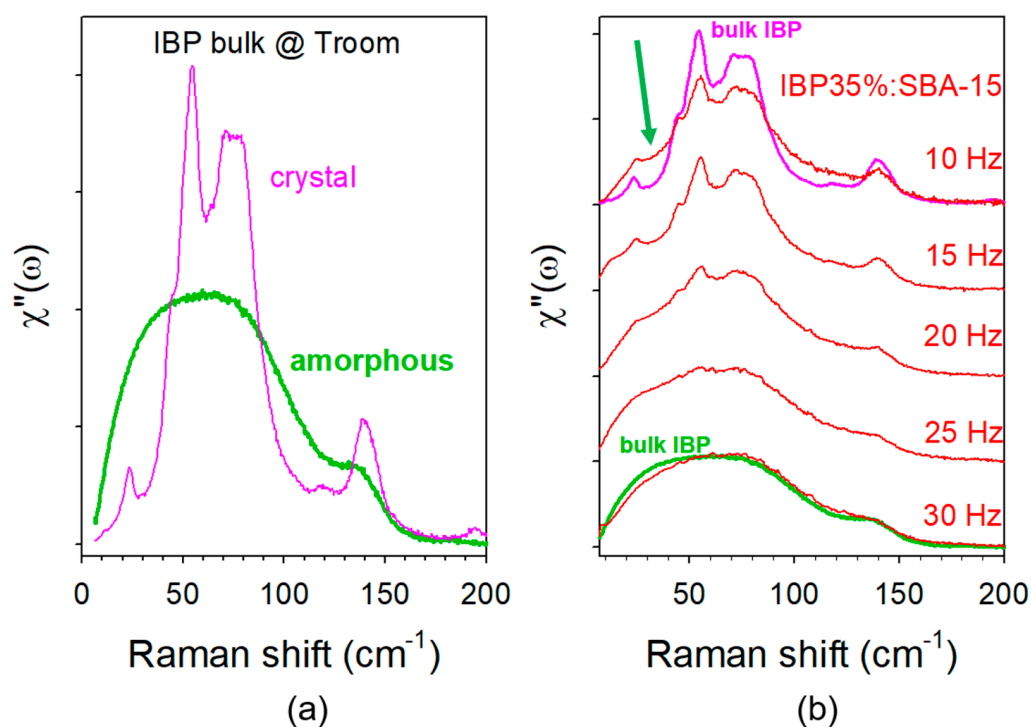


Figure 3. Raman susceptibility spectra of crystalline, partially crystalline, and amorphous ibuprofen; (a) spectra of the crystalline and amorphous bulk forms; (b) spectra of confined ibuprofen in SBA-15 using MAL at various frequencies: the arrow highlights the intensity excess in the very low-frequency range, reflecting the presence of amorphous IBP.

The fitting procedure described in Figure 2b provides information on the Lorentzian peak associated with the quasielastic scattering. The normalization procedure of the integrated intensity of the Lorentzian peak by the intensity of vibrational components that are almost temperature independent provides information distinctive to the quasielastic intensity. It is recognized that the temperature dependence $I_{\text{QES}}(T)$ is similar to that of the mean-square displacement $\langle u^2 \rangle(T)$ and inversely proportional to $\log \eta(T)$ [31,32], which is closely involved in the phase transition mechanisms including the glass transition. It was previously shown that the glass transition temperature (T_g) could be determined as corresponding to the change in the slope of $I_{\text{QES}}(T)$ [33,34]. The spectra collected during heating of glassy IBP in the bulk form ($\dot{T} = 1 \text{ deg/min}$) are plotted in the reduced intensity representation in Figure 4a. This figure clearly shows the successive phase transitions of IBP, i.e., the glass transition at -50°C , the crystallization of the metastable phase (PII) at 10°C , the melting of PII at 20°C , the crystallization of the stable form PI at 25°C , and the melting of PI at 80°C . The quasielastic intensity (I_{QES}) can be calculated from the integrated intensity of the Lorentzian peak or by integrating the $I_r(\omega)$ -spectra in the very low-frequency range, giving the temperature dependence plotted in Figure 4b. This plot recreates the phase transition sequence observed from the spectra in Figure 4a. This representation was adopted for analyzing the temperature dependence of the IBP loaded within SBA-15 by co-milling at 10 Hz and 30 Hz. LFR spectra collected during the first and second heating ramps of composites prepared by MAL at 10 Hz are plotted in Figure 5a,b, respectively.

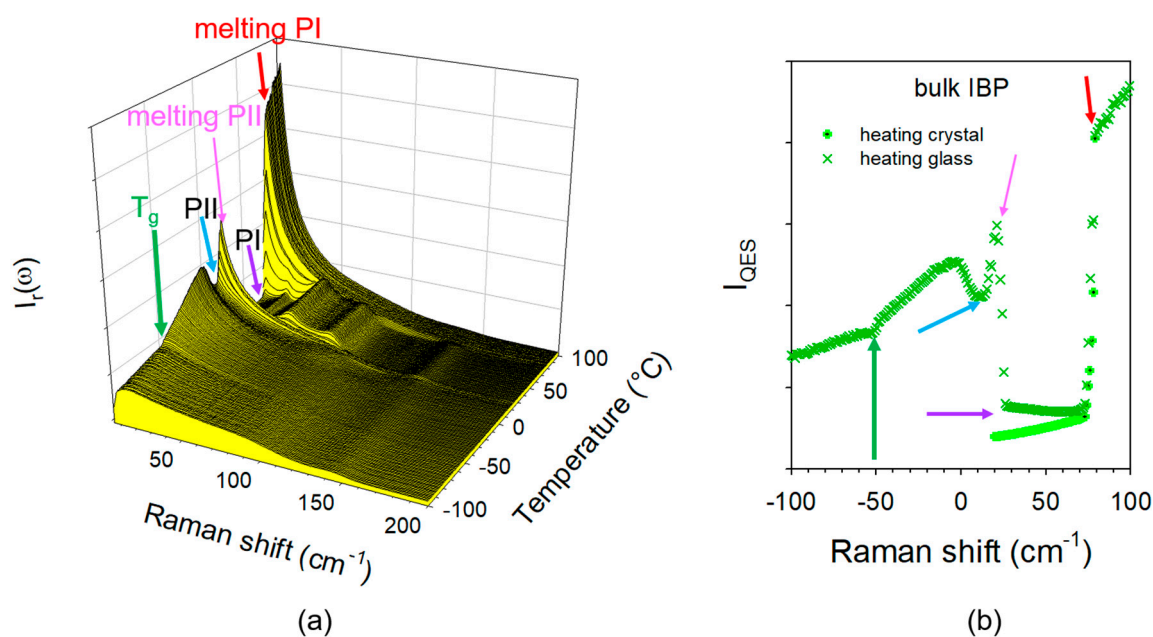


Figure 4. Analysis of the low-frequency spectrum of IBP bulk; (a) spectra collected during the heating ramp at 1 °C/min from the glassy state at −100 °C plotted in reduced intensity; (b) temperature dependence of the quasielastic intensity obtained by integrating the reduced intensity in the very low-frequency region. The arrows highlight the successive phase transitions undergone by IBP, i.e., the glass transition, crystallization in the metastable phase II (PII), the melting of PII, the crystallization of the stable phase I (PI), and the melting of PI.

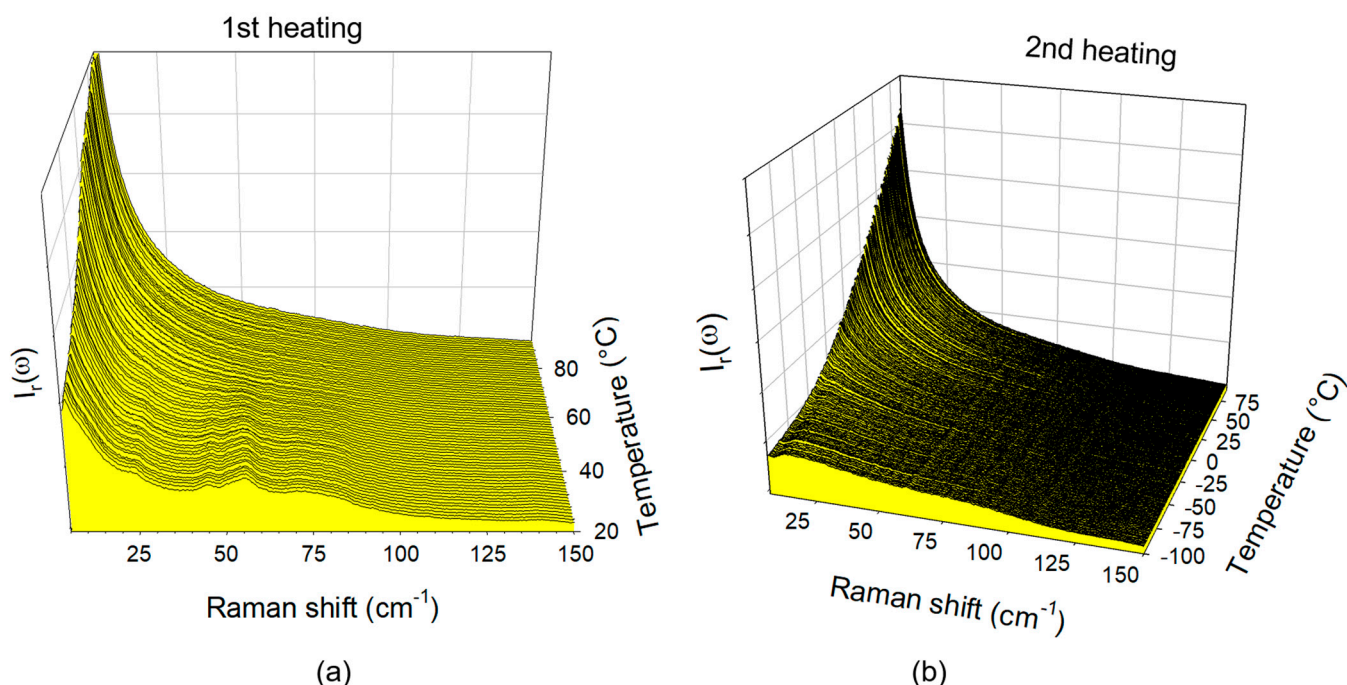


Figure 5. Low-frequency Raman spectra of the composite (IBP35%:SBA-15) prepared by MAL at 10 Hz collected upon heating at 1 °C/min; (a) first heating from room temperature up to 100 °C of the composite freshly prepared; (b) second heating of the composite from −100 °C.

The temperature dependences of the quasielastic intensity calculated from these spectra were plotted in Figure 6a. A quick look at Figure 5a reveals the presence of phonon peaks which are the signature of nanocrystals within the pore, while preparing the same

composite by co-milling at 30 Hz leads to a totally amorphous IBP within the pores. A first heating of the composite from room temperature up to 90 °C was performed in order to melt the nanocrystals, as observed in Figures 5a and 6a, directly from the beginning of the heating ramp up to 60 °C. This broad temperature range of melting reflects a broad distribution of nanocrystal size, and very low stability of the smallest nanocrystals. The composite was then re-cooled at −100 °C and spectra were collected during a second heat ramp and plotted in Figure 5b. No trace of phonon peaks was detected in all spectra collected during the second heating run, indicating that the nanocrystals were well located inside the pores. If nanocrystals are located outside the pores, recrystallization should be observed either on cooling or on the second heating. This method, which consists of analyzing the composites upon first heating, upon cooling down to the low temperatures, and upon a second heating, was previously used to determine the filling capacity related to the MAL method. The plot of I_{QES} during the first heating was slightly larger at low-temperature than I_{QES} calculated in spectra of bulk crystalline IBP (between 25 and 75 °C), indicating that nanocrystals are coexisting with amorphous IBP. The $I_{QES}(T)$ curve calculated in spectra collected during the second heating ramp shows a change in the slope, distinctive of T_g , slightly above T_g in the bulk amorphous IBP. It is noticeable that this slope break is smoother than that detected upon heating glassy IBP in the bulk form. A comparison between $I_{QES}(T)$ curves obtained by analyzing the composites prepared by co-milling at 10 Hz and 30 Hz is shown in Figure 6b. The two curves are similar, with a slight temperature shift between the two curves associated with a slight shift of T_g , both being above the T_g of the bulk glassy state.

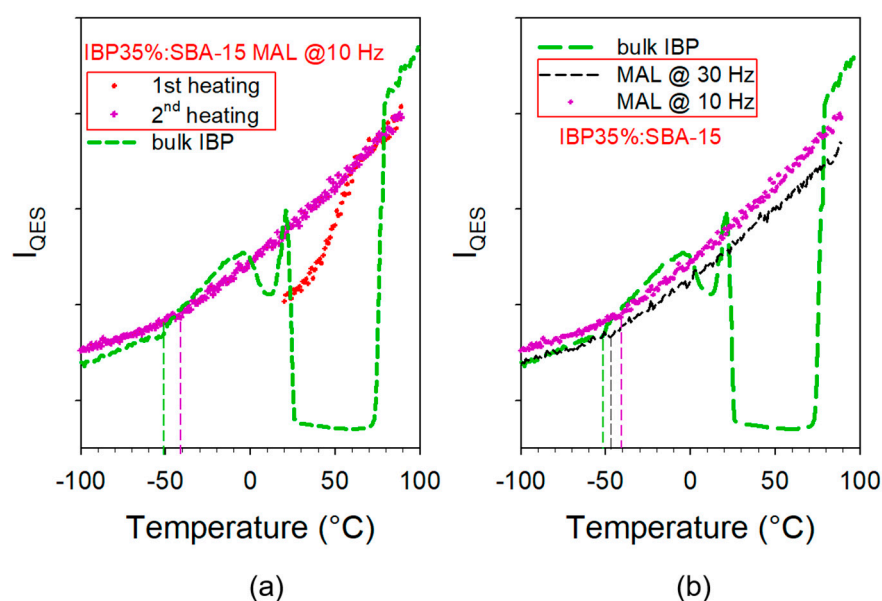


Figure 6. Temperature dependence of the quasielastic intensity (I_{QES}) of the composite (IBP35%:SBA-15) compared with that of bulk IBP; (a) I_{QES} calculated in the first and second heating runs of the composite prepared by MAL at 10 Hz; (b) comparison between composites prepared by MAL at 10 Hz and 30 Hz.

Similar experiments were performed on composites prepared from modified SBA-15 (noted SBA-15-NH₂) mesoporous silica loaded by the MAL method at 10 Hz and 30 Hz. LFRS collected at room temperature were plotted in Figure 7a. This figure highlights a significant degree of crystallization of IBP inside SBA-15-NH₂ loaded at 10 Hz compared with the spectrum taken in the composite prepared with the as-received SBA-15 loaded at 10 Hz. For loading at 30 Hz, nanocrystals are also detected, while IBP was observed as amorphous in the as-received SBA-15. This clearly indicates that the change in the chemical surface promotes the crystallization of IBP. Increasing the milling time of MAL has no great influence on the degree of crystallinity of IBP within SBA-15-NH₂. These features can be

confirmed by the plot of $I_{QES}(T)$ curves (in Figure 7b) corresponding to the first heating of the composites. The quasielastic intensity of IBP at room temperature is higher in the as-received SBA-15 loaded by co-milling at 10 Hz and decreases in modified SBA-15-NH₂, becoming close to the value obtained in the bulk crystal for the composite prepared by MAL at 10 Hz. In this composite, the $I_{QES}(T)$ curve (X) exhibits a clear 2-step increase, the first being observed around 50 °C and the second at 74 °C, i.e., very close to the melting temperature of the bulk. This feature indicates two types of particle sizes. By contrast, the curve corresponding to the first heating of IBP35%:SBA-15-NH₂ shows an almost continuous melting from 50 to 74 °C. On the other hand, the temperature dependence of I_{QES} determined from the analysis of the second heating of the composite (similar to that corresponding to the composite prepared at 30 Hz and not plotted) shows a value of T_g lower than that determined in the unmodified SBA-15.

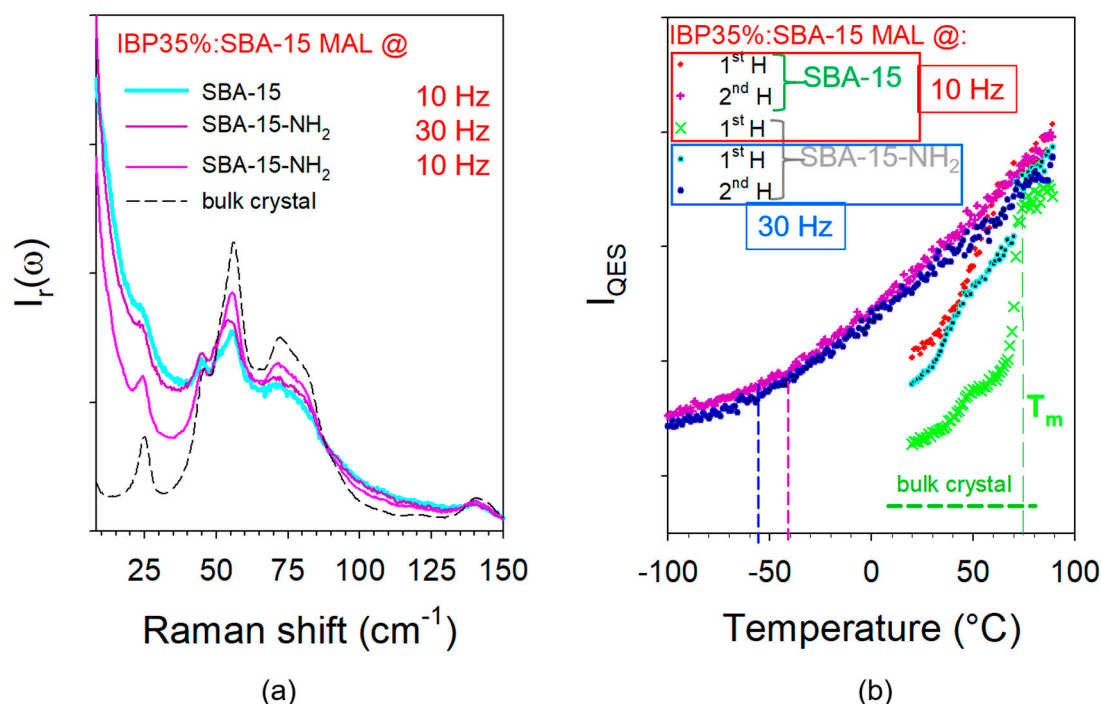


Figure 7. Low-frequency analysis of composites prepared with as-received (SBA-15) and modified (SBA-15-NH₂) matrices by MAL at various frequencies; (a) spectra of freshly prepared composites taken at room temperature compared with the spectrum of the commercial phase; (b) temperature dependence of the quasielastic intensity (I_{QES}) obtained upon a first heating from room temperature and a second successive heating; vertical dashed lines roughly indicate T_g .

The degree of crystallinity of IBP within the various types of composites prepared by MAL at various frequencies was calculated using a method developed by the authors for analyzing the crystallization process of indomethacin [35] or the degree of transformation of phase I into phase II in caffeine [36]. This method has been applied to the determination of the crystallinity degree and is described in Appendix C (Figure A3). The degrees of crystallinity resulting from this spectrum processing, associated with Figure A4, are reported in Table 1.

Table 1. Degree of crystallinity (%) of IBP confined in unmodified (SBA-15) and modified (SBA-15-NH₂) carriers for various milling frequencies.

	30 Hz	25 Hz	20 Hz	15 Hz	10 Hz
SBA-15	0	4.5	19.6	39.2	42.2
SBA-15-NH ₂	67.8	–	–	–	77.8

3.3. Electron Microscopy

From Malfait et al. [14], the porosity size of the SBA powder specimen does not change with the milling process (an example of a TEM micrograph of un-milled particles is visible in Figure 8d). However, milling modifies the particle sizes.

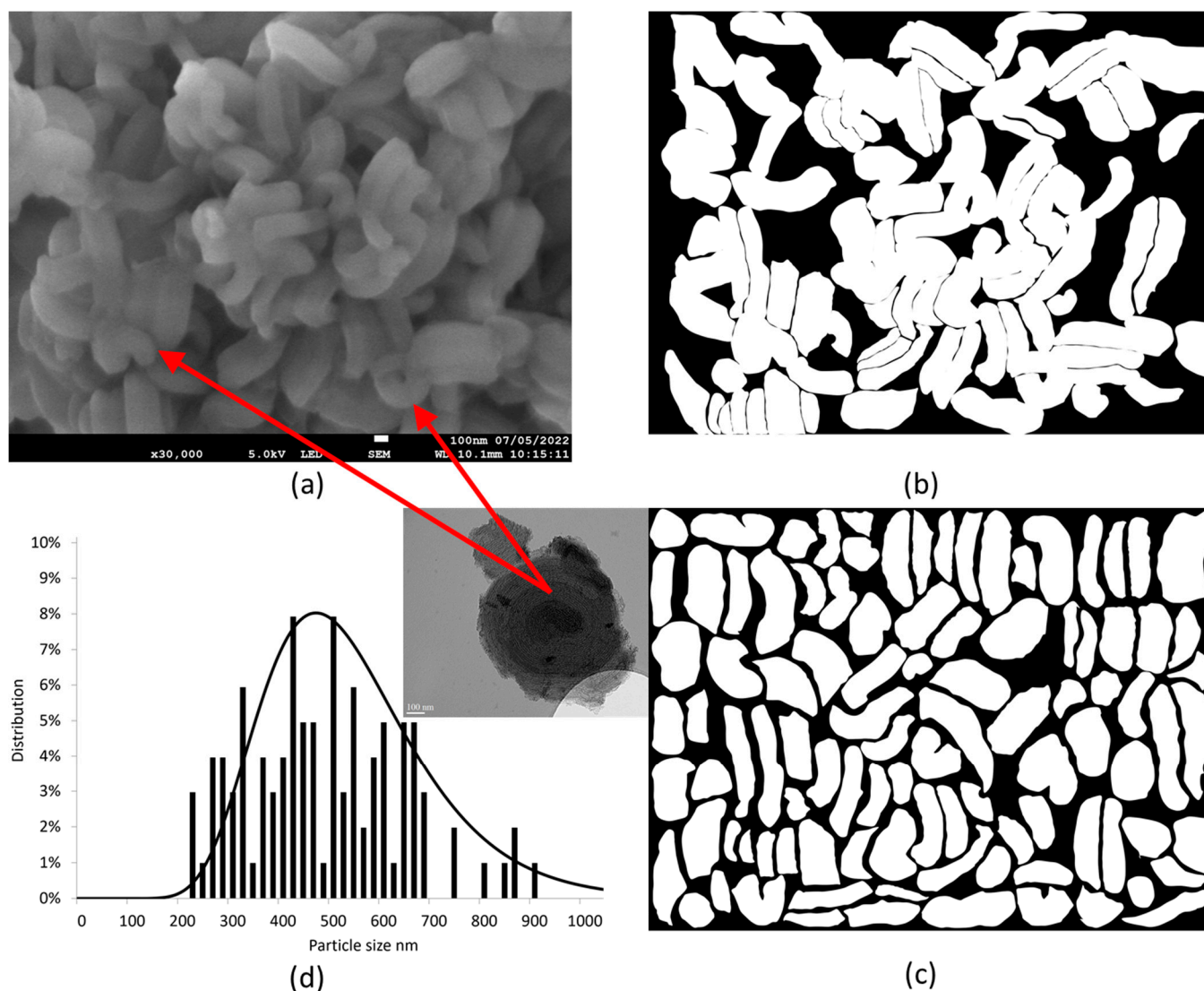


Figure 8. Methodology to obtain the distribution of particle sizes (example of an un-milled SBA-15 powder sample): (a) raw SEM micrography; (b) corresponding particles traced with hand; (c) isolation of particles; (d) corresponding distribution of particle sizes. Red arrows show local observations from TEM experiments, in various regions of the SEM micrography.

The low accelerating voltage used for SEM analyses does not allow the application of an automatic method for the measurement of the particle sizes. Consequently, they were measured with a manual tracing method. This methodology is described in Figure 8 (example of an un-milled SBA powder specimen): particles are traced by hand (Figure 8b), then isolated from each other (Figure 8c) to estimate their proportion and size distribution (Figure 8d) using the ImageJ software. Another example of a bimodal size distribution measurement is described in Figure 9. The distribution of the particle sizes becomes bimodal (small particles vs. big particles) with milling. The higher the frequency, the lower the big particle size (they are progressively eroding), while the size of small particles remains almost constant and equal to approximately 110 nm (see Table 2). Furthermore, the higher the frequency, the higher the proportion of small particles at the expense of the

proportion of big particles (see Table 2). Figure 9d shows the evolution of the distribution of particle sizes with milling frequency.

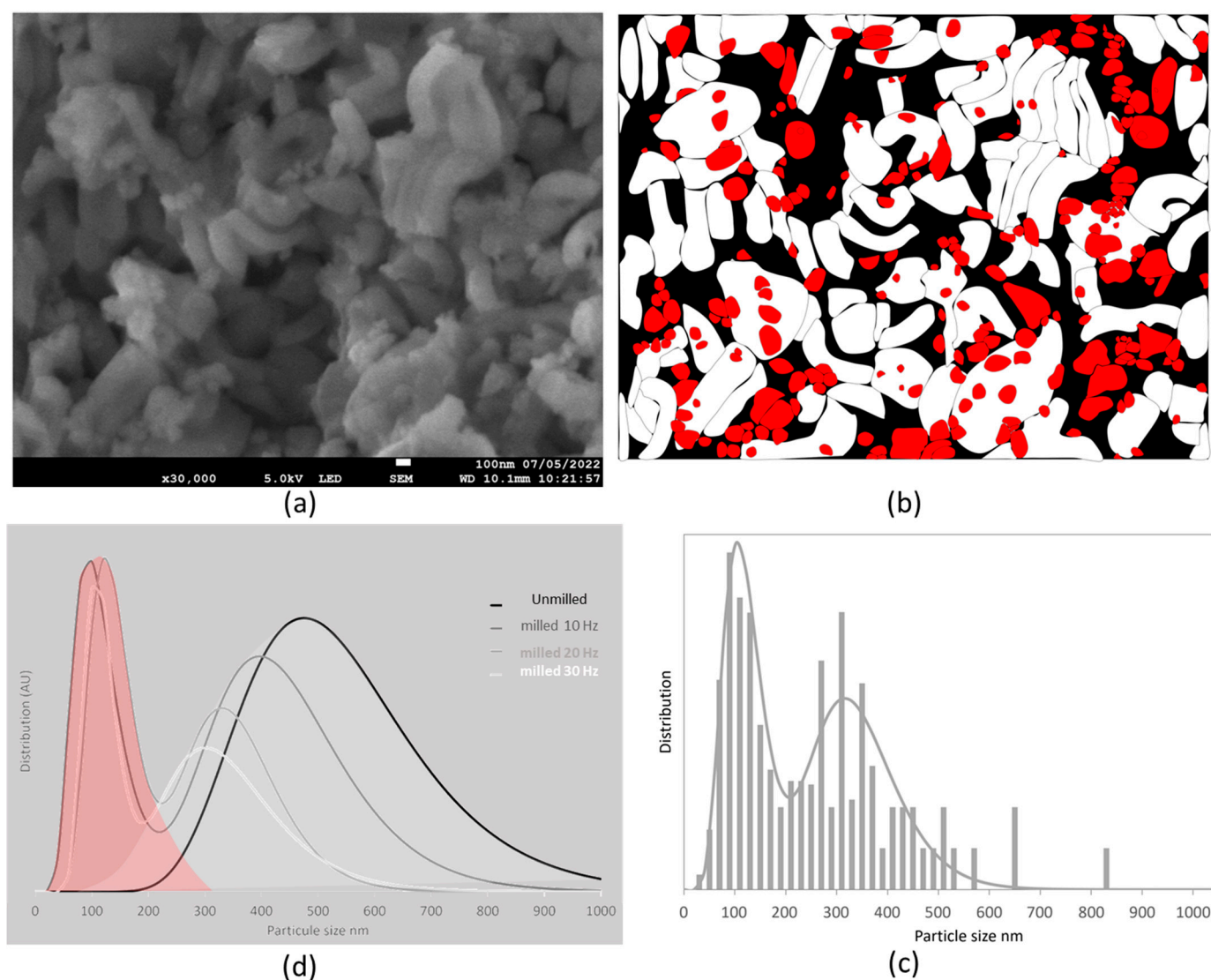


Figure 9. Distribution of particle sizes: (a) example of a raw SEM micrograph of an SBA-15 specimen milled at 10 Hz; (b) corresponding particles traced with hand (small particles are colored in red and big particles are colored in white); (c) bimodal distribution of particle sizes of an SBA-15 specimen milled at 20 Hz; (d) evolution of the distribution of particle sizes with the milling frequency.

Table 2. Evolution of particle and proportion size with milling frequency.

Milling Frequency (Hz)	Small Particle Sizes (nm)	Big Particle Sizes (nm)	Proportion of Small Particles (%)	Proportion of Big Particles (%)
Un-milled	–	470 ± 165	0	100
10	95 ± 50	405 ± 135	20	80
20	125 ± 45	335 ± 100	50	50
30	110 ± 30	305 ± 115	65	35

3.4. Study of Release Kinetic Profiles of Ibuprofen from Mesoporous Matrices

The influence of the functionalization of the mesoporous silica and the milling frequency of the composites on the release of ibuprofen have been analyzed using composites

freshly prepared with 35% of IBP and 65% of unmodified and modified mesoporous silica carriers (SBA-15/SBA-15-NH₂). Composites were prepared by MAL at 10 Hz and 30 Hz. The experiments were carried out in acidic medium (pH = 1.1) and sink conditions (see details in Section 2.2.5). Measurements were also carried out 24 h after the monitoring of the drug release to ensure that the total mass of IBP was released. The IBP amount released corresponded well to the total amount of ibuprofen loaded within the mesoporous matrix. This was verified using the ibuprofen calibration curve performed in a 0.1 M hydrochloric acid medium plotted in Appendix D, Figure A5. The drug release profiles from SBA-15 and SBA-15-NH₂ carriers are plotted in Figure 10a,b, respectively

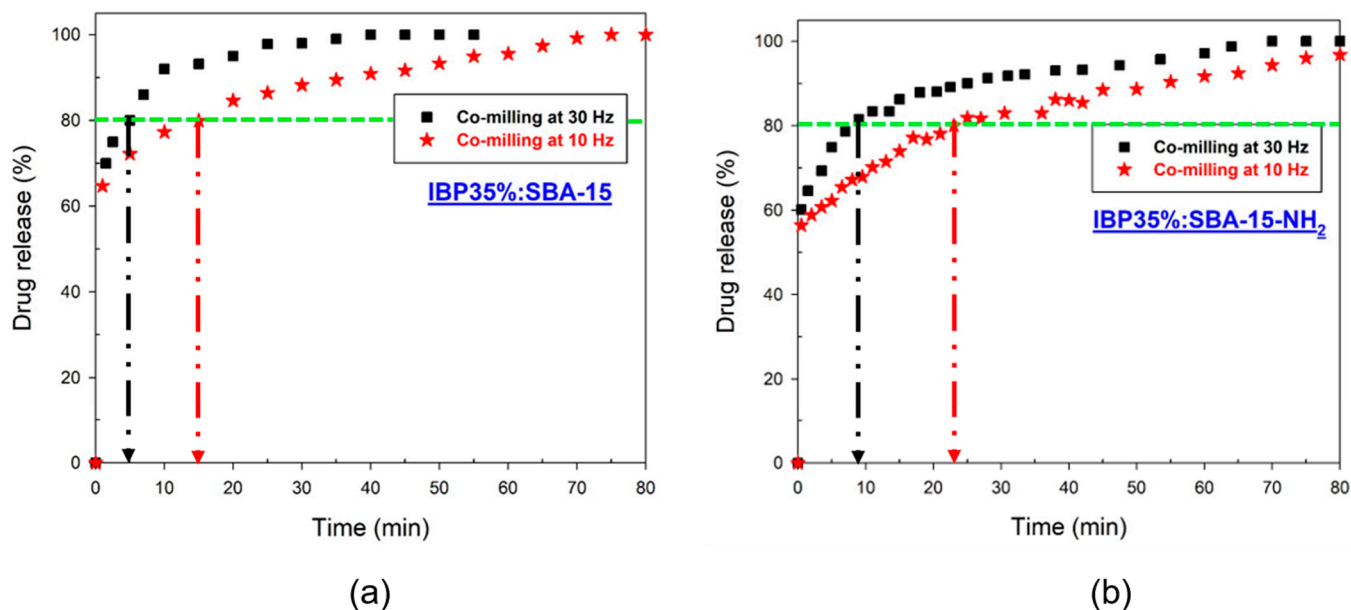


Figure 10. Release profiles of IBP (a) from SBA-15; (b) from SBA-15-NH₂.

These figures show that drug release profiles from carriers prepared with SBA-15 and SBA-15-NH₂ co-milled at 30 Hz can be qualitatively described as a 2-step process, i.e., (i) a very fast release observed up to 5 min, most probably due to IBP molecules located in the core of the channels, followed by (ii) a slow release attributed to the IBP molecules, which interact with the surface of the pores. This description can also be observed in Figure A6 in Appendix D. Such a behavior was already reported in the literature for confined ibuprofen [7,37,38]. However, it is worth noting that IBP is totally amorphous in unmodified SBA-15 while it is partially but significantly crystallized in SBA-15-NH₂.

In view of Figure 10a,b, the main information emerging from this study is the preponderant effect of the milling frequency on the drug release. Indeed, Figure 10a,b show similar profiles for composites prepared by co-milling at 10 Hz, characterized by an enhanced sustained release compared with those obtained by co-milling at 30 Hz. This can be better visualized in Figure A6 in Appendix D. To illustrate this effect, the time required to release 80% of the IBP was studied (see Figure 10). For IBP35%:SBA-15 composites, 80% of drug release was reached after ~15 min in the case of the composite milled at 10 Hz, while it takes only ~5 min to achieve this release rate in the case of the composite milled at 30 Hz. This behavior can also be observed for IBP35%:SBA-15-NH₂ composites. This effect can be explained by the size reduction in the porous particles, which may induce a reduction in the length of the channels of SBA-15 by increasing the frequency, hence, allowing a faster release. Composites prepared with modified or unmodified carriers by milling at 30 Hz exhibit very similar profiles despite the difference of crystallinity degree (see Table 1). This reveals the strong influence of the size distribution of mesoporous silica carriers on the drug release profiles. However, it can be noticed from Figures 10 and A6 that the proportion of

crystallized matter also has an influence on the drug release profile, however, to a lesser extent than the particle size of the composites.

4. Discussion

Until now, the MAL method was developed by milling APIs and unmodified MPS carriers systematically performed at 30 Hz. It was shown that it was a green (solvent free) loading method with high filling capacity. Using this method makes it possible to select the requested drug dosage up to about 40 wt %. It was also shown that hydrophobic materials can be loaded in large proportions. Additionally, a solid-state loading method provides the unique opportunity to load IBP in the nanocrystalline form coexisting with amorphous IBP within MPS carriers with an average pore diameter of 9.4 nm [14]. Below this size, IBP confined by MAL at 30 Hz was systematically found in the amorphous state. TEM analyses [14] have shown that the 2D ordered structure of channels was preserved after a milling time of 30 min at 30 Hz; only a reduction in the particle size was observed.

The present study has firstly focused on the analysis of the influence of the milling frequency on the particle size of SBA-15 and on the inherent consequences on the physical state and release profiles of confined IBP. SEM investigations revealed a change in the particle size distribution for milling frequencies from and below 20 Hz. For low milling frequencies, a bimodal size distribution was observed reflecting the presence of big particles not existing at 30 Hz. A direct relationship was determined between the particle size distribution and the physical state of IBP. For milling at 10 Hz, corresponding to a large population of big particles, more than 40% of IBP is crystallized. It is worth noting that a difference in $I_{QES}(T)$, especially a shift in the T_g of amorphous IBP, can be observed (in Figure 6b) after melting nanocrystals between IBP35%:SBA-15 composites prepared at 10 Hz and 30 Hz. This feature indicates a change in the temperature dependence of the viscosity of IBP; depending on the particle size, the viscosity increases with the particle size increase.

The study secondly aimed to determine the influence of the chemical modification of the pore surface, both on the physical state of the confined API and on the drug release profile, for composites prepared by the MAL method. It was found that the MAL method makes it possible to load a significant proportion of crystalline IBP in SBA-15-NH₂—even by milling at 30 Hz almost 70% of the confined IBP is crystallized. For loading IBP at 10 Hz within SBA-15-NH₂, the $I_{QES}(T)$ curve (X symbols) in Figure 7b clearly reflects the bimodal distribution of the particle size, with a first increase close to 50 °C corresponding to the melting of the smallest particles, and a stronger increase slightly above 70 °C corresponding to the melting of the biggest particles. The very low value of I_{QES} at room temperature confirms the high proportion of nanocrystalline IBP. Interestingly, it was shown that the particle size has a more significant influence on the drug release profile than the physical state, since profiles obtained for IBP35%:SBA-15 and IBP35%:SBA-15-NH₂ prepared by milling at 10 Hz are almost superimposed and are different from that obtained for IBP35%:SBA-15-NH₂ prepared at 30 Hz. It should be outlined that these findings can be only obtained using a solid-state loading method since crystallization within these types of MPS is not possible from the liquid state by using solvent-based loading methods.

5. Conclusions

This study shows that the MAL method provides the opportunity to tune a variety of operating parameters for administering customized drug-dosage forms. It was shown that tuning the milling intensity and modifying the chemical surface of pores to a lesser extent makes it possible to finely control the drug release profile. The next step will consist of deeply considering the influence of other architectural parameters of mesoporous silica carriers, including tortuosity and pore size, to broaden the spectrum of drug release profiles.

Author Contributions: Conceptualization, B.M. and A.H.; methodology, B.M., N.T., A.M., Y.G., J.D. and C.C.; validation, A.M., J.-P.D. and A.H.; formal analysis, B.M. and L.P.; investigation, B.M., J.D., A.F. and L.P.; writing—original draft preparation, B.M.; writing—review and editing, A.M., J.D., N.T., J.-P.D. and Y.G.; visualization, B.M.; supervision, N.T. and A.H.; project administration, A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not Applicable.

Data Availability Statement: Data related to this study are presented within this article.

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

Appendix A. Analysis of the Influence of Milling on the Physical State of Ibuprofen

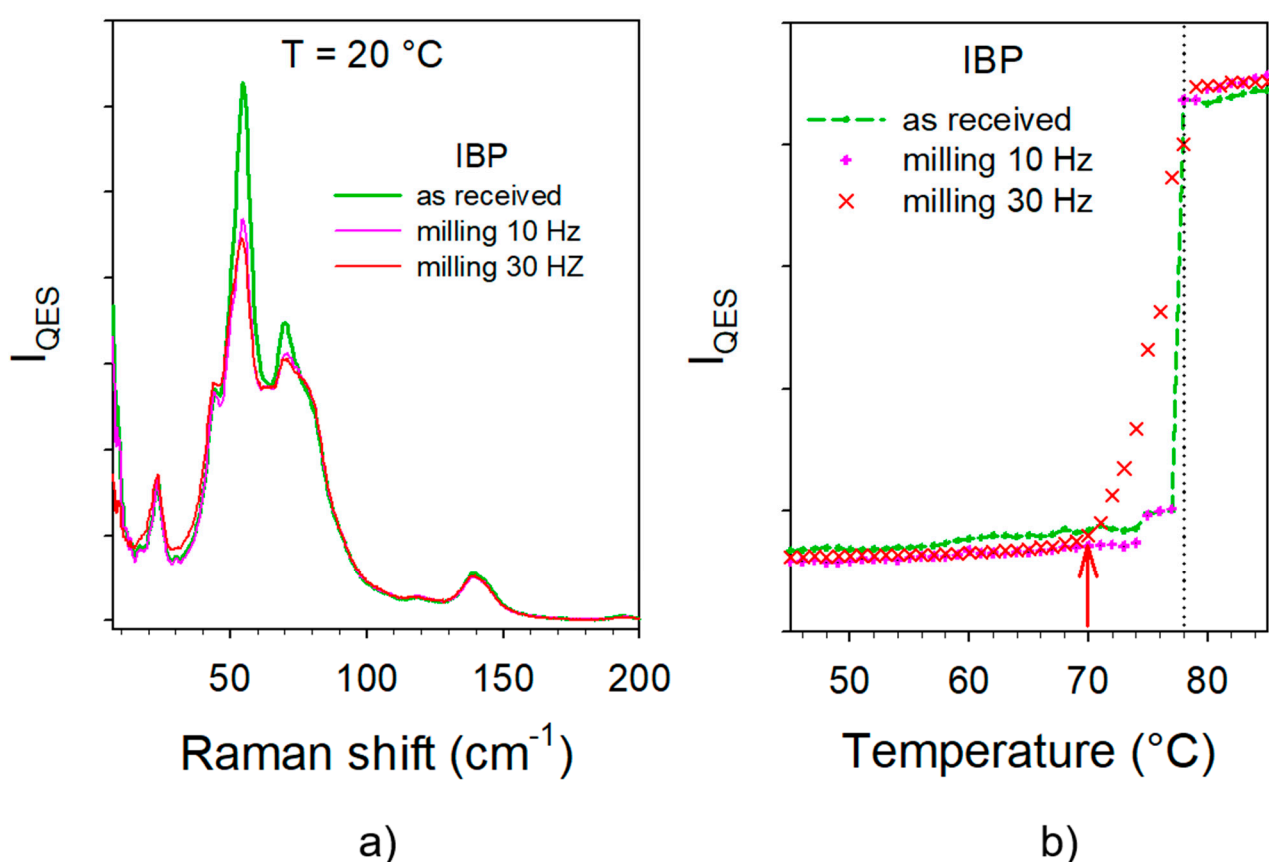


Figure A1. Influence of milling on the physical state of IBP: (a) comparison between spectra of as-received IBP and milled IBP at 10 Hz and 30 Hz; (b) $I_{\text{QES}}(T)$ curves of as-received sample and milled samples.

Figure 1b shows that the melting of IBP milled at 30 Hz starts 8 degrees below the melting of the 2 other samples because of a wider distribution of crystallite size.

Appendix B. Thermogravimetric Analyses of MPS Carriers

Thermogravimetric analyses (TGA) of SBA-15 and SBA-15-NH₂ were performed with a Mettler Toledo TGA/DSC 3+ thermal analyzer. The samples were heated from room temperature to 1000 $^{\circ}\text{C}$ following a heating rate of 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ under a flow of air (80 mL/min).

The TGA profiles of SBA-15 and SBA-15-NH₂ are presented below. Up to 150 $^{\circ}\text{C}$, a weight loss observed for both samples is due to the evaporation of physisorbed water in

the porosity. A second weight loss for SBA-15-NH₂, occurring between 200 and 700 °C, is attributed to the degradation of the grafted amine functions. By comparison with the thermogram of SBA-15, it can be deduced that 9.1 wt% of the 3 aminopropyl group was grafted on the surface of SBA-15-NH₂.

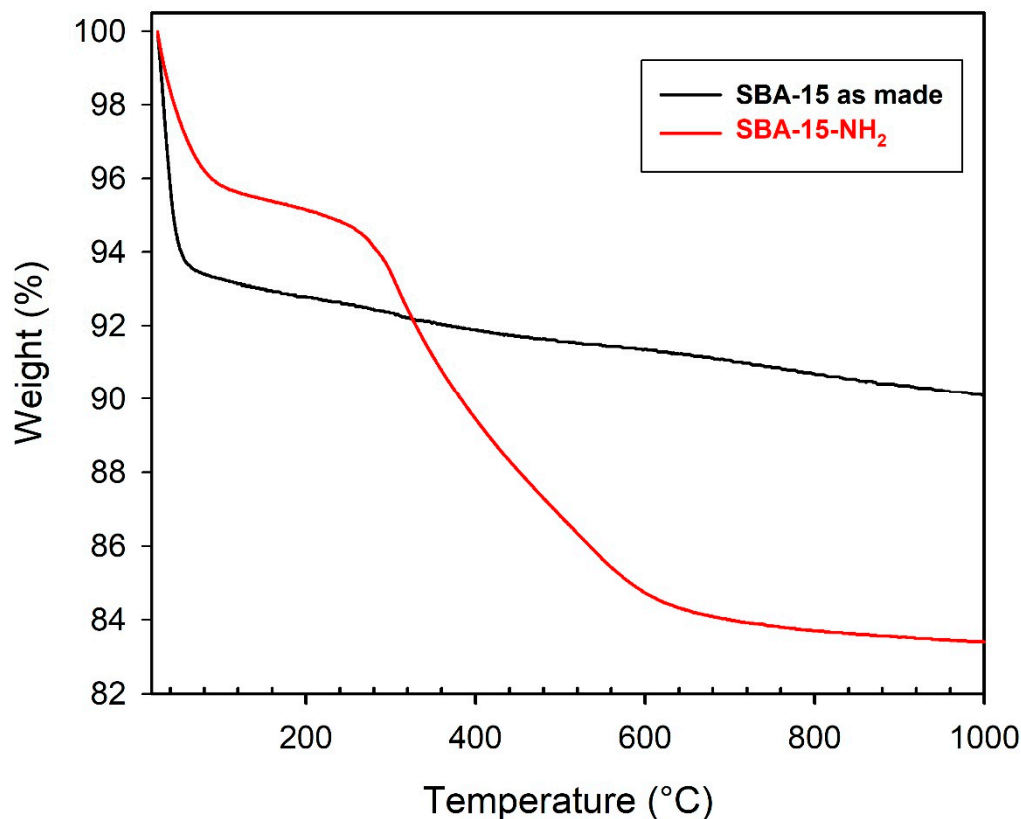


Figure A2. TGA profiles of SBA-15 and SBA-15-NH₂.

Appendix C. Description of the Method used for Determining the Crystallinity of Confined Ibuprofen

The method used for determining the crystalline degree from low-frequency Raman spectroscopy is based on the relationship between the VDOS spectrum of the amorphous state and the phonon (lattice mode) spectrum of the crystal. Both types of spectrum correspond to the same collective motions with drastically different band shapes induced by the absence or not of periodicity. The low-frequency spectrum of the long-range order in the molecular crystal is characterized by the observation of lattice modes, while the various molecular neighboring in the amorphous state induce the inhomogeneous broadening of the lattice modes resulting in a broad hump roughly corresponding to the envelope of the lattice modes.

From the spectra of amorphous and crystalline ibuprofen plotted in Figure 3a, normalized by the intensity integrated into the domain of lattice modes (10–150 cm^{−1}), the difference between Raman susceptibilities of crystal and amorphous states is plotted in Figure A3 in the spectral region where the crystal signature is the most intense. The intensity of the green area provides the reference for a 100% crystallized sample. The spectrum difference between the composite (partially crystallized) prepared by MAL with SBA-15 and IBP milled at 10 Hz and the composite (totally amorphous) prepared by MAL at 30 Hz, is plotted in red in the same region. The crystallinity degree (ρ_c) is determined by the intensity ratio:

$$\rho_c = \frac{\text{red area}}{\text{green area}} = 0.422$$

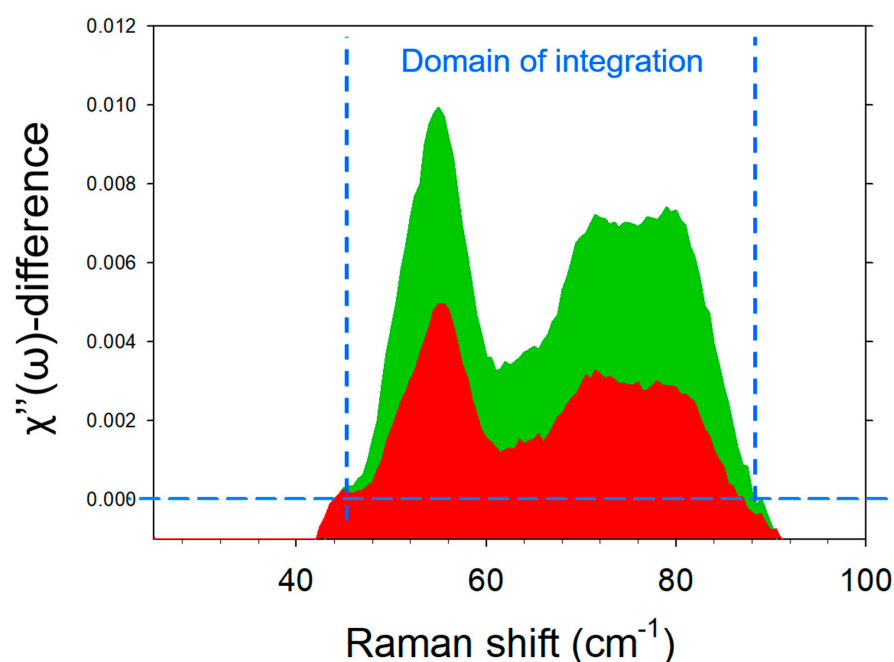


Figure A3. Spectrum difference in the Raman susceptibility representation between the crystal and amorphous states in the bulk form of ibuprofen (in green) and between ibuprofen confined in SBA-15 by MAL at 10 Hz (partially crystallized) and ibuprofen confined in SBA-15 by MAL (totally amorphous). The dashed blue lines indicate the domain of integration.

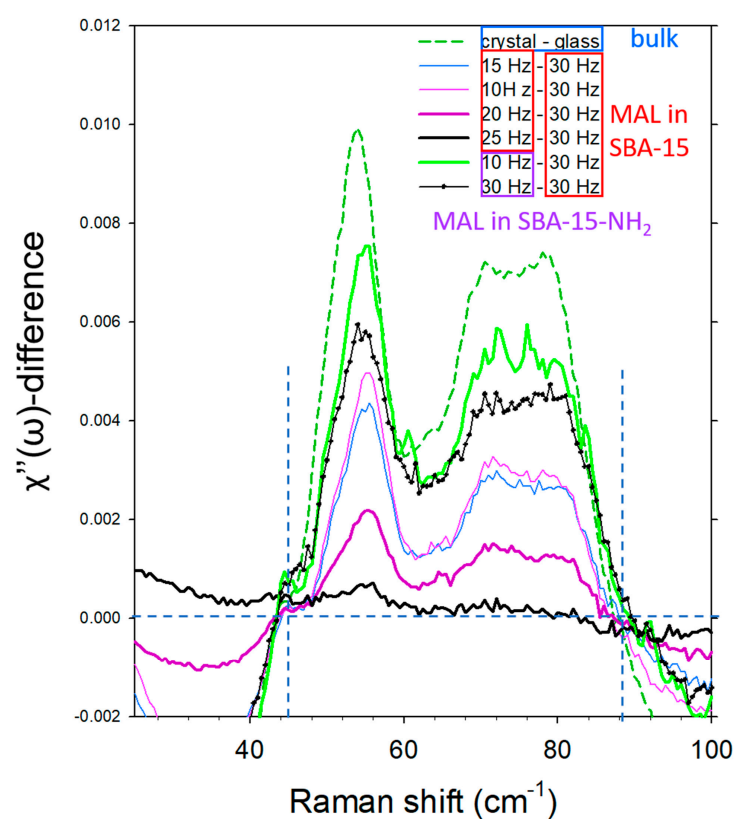


Figure A4. Spectrum difference in the representation of Raman susceptibility between composites prepared by MAL in SBA-15 and SBA-15-NH₂ at various milling frequencies and composites prepared by MAL in SBA-15 at 30 Hz. The crystallinity degree of IBP was calculated from the area limited by dashed lines.

Appendix D. Comparison of Drug Release Profiles and Calibration Curve of Ibuprofen

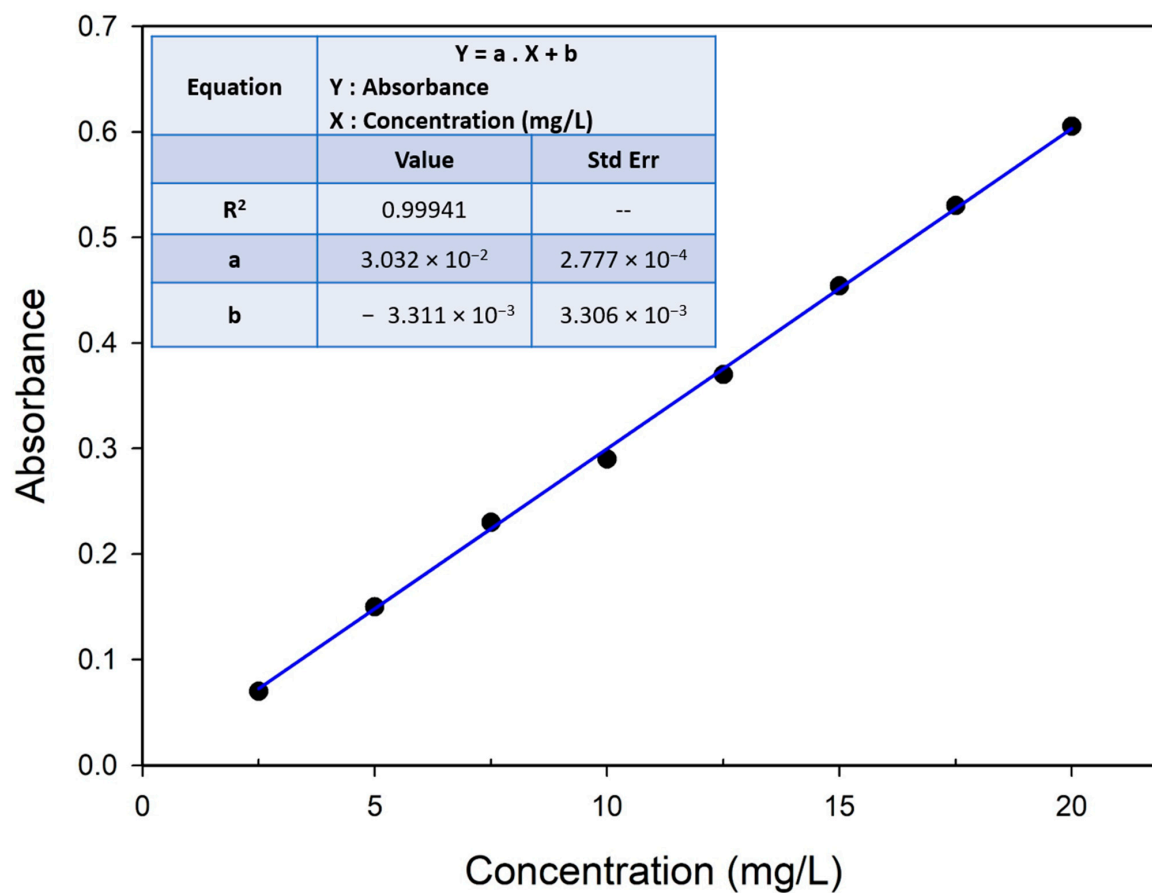


Figure A5. Calibration curve in absorbance of ibuprofen in a 0.1 M hydrochloric acid solution.

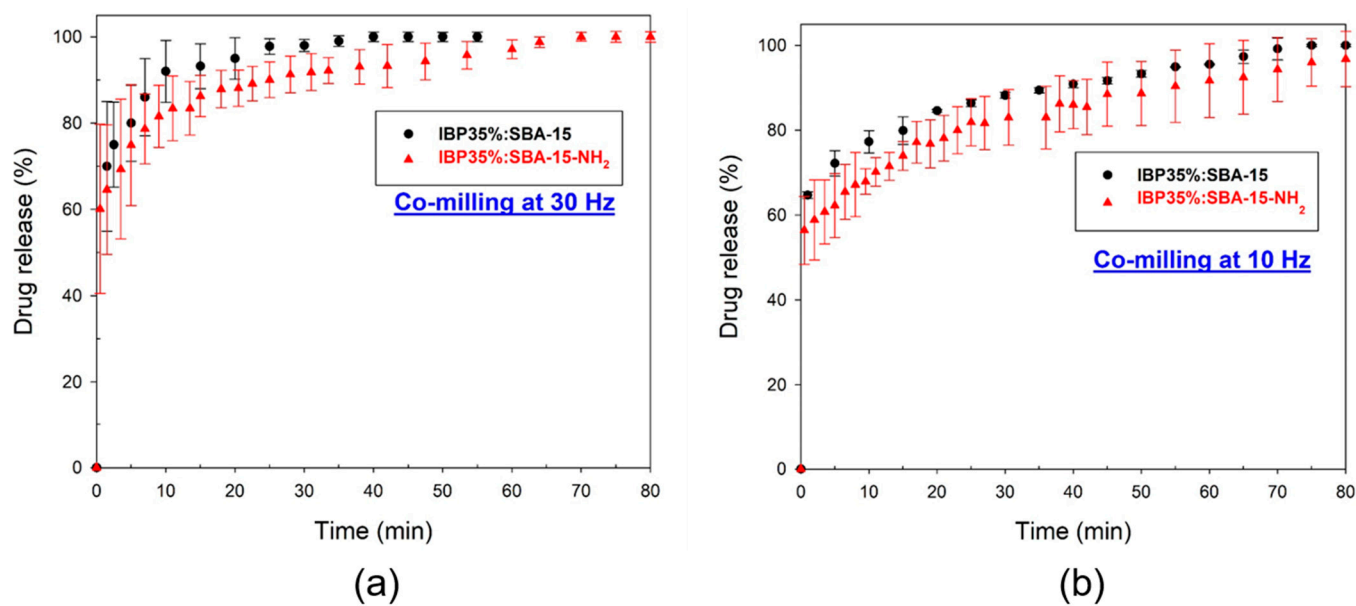


Figure A6. Release profiles of ibuprofen from SBA-15 and SBA-15-NH₂: (a) co-milled at 30 Hz and (b) co-milled at 10 Hz.

References

- Thayer, A.M. Form and function. *Chem. Eng. News* **2007**, *85*, 17–30. [\[CrossRef\]](#)
- Vallet-Regi, M.; Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I.; Manzano, M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: Current insights. *Molecules* **2018**, *23*, 47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vallet-Regi, M.; Ramila, A.; Del Real, R.P.; Perez-Pariente, J. A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308–311. [\[CrossRef\]](#)
- Juere, E.; Kleitz, F. On the nanopore confinement of therapeutic drugs into mesoporous silica materials and its implications. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *270*, 109–119. [\[CrossRef\]](#)
- Trzeciak, K.; Chotera-Ouda, A.; Bak-Sypien, I.; Potrzebowski, M. Mesoporous silicaparticles as drug delivery systems-The state of the art in loading methods and the recent progress in analytical techniques for monitoring these processes. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 950. [\[CrossRef\]](#)
- Prestidge, C.A.; Barnes, T.J.; Lau, C.-H.; Barnett, C.; Loni, A.; Canham, L. Mesoporous silicon: A platform for the delivery of therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2007**, *4*, 101–110. [\[CrossRef\]](#)
- Malfait, B.; Correia, N.; Ciotonea, C.; Dhainaut, J.; Dacquín, J.-P.; Royer, S.; Tabary, N.; Guinet, Y.; Hédoux, A. Manipulating the Physical states of confined ibuprofen in SBA-15 based drug delivery systems obtained by solid-state loading: Impact of the loading degree. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153*, 154506–154513. [\[CrossRef\]](#)
- Beinier, M.; Rengarajan, G.; Pankaj, S.; Enke, D.; Steinhart, M. Manipulating the crystalline state of pharmaceuticals by nanoconfinement. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1381–1385. [\[CrossRef\]](#)
- Dengale, S.J.; Grohgan, H.; Rades, T.; Lobmann, K. Recent advances in coamorphous drug formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *100*, 116–125. [\[CrossRef\]](#)
- Trzeciak, K.; Kazmierski, S.; Wielgus, E.; Potrzebowski, M. DiSupLo-New extremely easy and efficient method for loading of active pharmaceutical ingredients into the pores of MCM-41 mesoporous silica particles. *Microporous Mesoporous Mater.* **2020**, *308*, 110506–110523. [\[CrossRef\]](#)
- Ambrogio, V.; Perioli, L.; Pagano, C.; Marmottini, F.; Moretti, M.; Mizzi, F.; Rossi, C. Econazole Nitrate-loaded MCM-41 for an antifungal topical powder formulation. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4738–4745. [\[CrossRef\]](#)
- Skorupska, E.; Jeziorna, A.; Potrzebowski, M. Thermal Solvent-free method of loading of pharmaceutical cocrystals into the pores of silica particles: A case of naproxen/picolinamide cocrystal. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 13169–13180. [\[CrossRef\]](#)
- Ahern, R.J.; Hanrahan, J.P.; Tobin, J.M.; Ryan, K.B.; Crean, A.M. Comparison of fenofibrate–mesoporous silica drug-loading processes for enhanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 400–409. [\[CrossRef\]](#)
- Malfait, B.; Correia, N.; Mussi, A.; Paccou, L.; Guinet, Y.; Hédoux, A. Solid-state loading of organic molecular materials within mesoporous silica matrix: Application to ibuprofen. *Microporous Mesoporous Mater.* **2019**, *277*, 203–207. [\[CrossRef\]](#)
- Trzeciak, K.; Kazmierski, S.; Druzicki, K.; Potrzebowski, M. Mapping of Guest Localization in Mesoporous Silica Particles by Solid-State NMR and Ab Initio Modeling: New Insights into Benzoic Acid and p-Fluorobenzoic Acid Embedded in MCM-41 via Ball Milling. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125*, 10096–10109. [\[CrossRef\]](#)
- Moutamenni, B.; Tabary, N.; Paccou, L.; Guinet, Y.; Hédoux, A. MAL: High performance method for loading hydrophobic molecular materials into MCM-41 mesoporous silica-analysis of confined L-tryptophan by Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1254*, 132383. [\[CrossRef\]](#)
- Balas, F.; Manzano, M.; Colilla, M.; Valler-Regi, M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 514–522. [\[CrossRef\]](#)
- Colilla, M.; Manzano, M.; Vallet-Regi, M. Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3*, 403–414.
- Malfait, B.; Paccou, L.; Correia, N.; Guinet, Y.; Hedoux, A. Identification of an amorphous-amorphous two-step transformation in indomethacin embedded within mesoporous silicas. *Microporous Mesoporous Mater.* **2021**, *328*, 111502. [\[CrossRef\]](#)
- Guinet, Y.; Paccou, L.; Danede, F.; Hedoux, A. Confinement of molecular materials using a solid-state loading method: A route for exploring new physical states and their subsequent transformation highlighted by caffeine confined to SBA-15 pores. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 34564–34571. [\[CrossRef\]](#)
- Willart, J.-F.; Descamps, M. Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 905–920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gibaldi, M.; Feldman, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. *J. Pharm. Sci.* **1967**, *56*, 1238–1242. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* **2010**, *67*, 217–223. [\[PubMed\]](#)
- Hédoux, A. Recent developments in the Raman and infrared investigations of amorphous pharmaceuticals and protein formulations: A review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *100*, 133–146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hédoux, A.; Guinet, Y.; Descamps, M. The contribution of Raman spectroscopy to the analysis of phase transformations in pharmaceutical compounds. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 17–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Galeener, F.L.; Sen, P.N. Theory for the first-order vibrational spectra of disordered solids. *Phys. Rev. B* **1978**, *17*, 1928–1933. [\[CrossRef\]](#)
- Shuker, R.; Gammon, R. Raman-scattering selection-rule breaking and the density of states in amorphous materials. *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *25*, 222–225. [\[CrossRef\]](#)

28. Hedoux, A.; Derollez, P.; Guinet, Y.; Dianoux, A.J.; Descamps, M. Low-frequency vibrational excitations in the amorphous and crystalline states of triphenyl phosphite: A neutron and Raman scattering investigation-art. no. 144202. *Phys. Rev. B* **2001**, *63*, 144202. [[CrossRef](#)]
29. Donohue, M.D.; Aranovich, G.L. Classification of Gibbs adsorption isotherms. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1988**, *76–77*, 137–152. [[CrossRef](#)]
30. Yildiz, R.; Lorgouilloux, Y.; Dhainaut, J.; Ciotonea, C.; Dacquain, J.-P.; Royer, S.; Courtois, C. Assembly of SBA-15 into hierarchical porous monoliths replicating polymeric scaffolds. *Microporous Mesoporous Mater.* **2022**, *337*, 111908. [[CrossRef](#)]
31. Buchenau, U.; Zorn, R. A relation between fast and slow motions in glassy and liquid selenium. *Europhys. Lett.* **1992**, *18*, 523–528. [[CrossRef](#)]
32. Ribeiro, M.C.C. Low-frequency Raman spectra and fragility of imidazolium ionic liquids. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 24503–24506. [[CrossRef](#)]
33. Malfait, B.; Paccou, L.; Derollez, P.; Guinet, Y.; Hedoux, A. Capabilities of low-wavenumber Raman spectroscopy for analyzing the mechanism of devitrification of molecular glasses. *J. Raman Spectrosc.* **2019**, *50*, 1027–1033. [[CrossRef](#)]
34. Guinet, Y.; Paccou, L.; Danede, F.; Willart, J.F.; Derollez, P.; Hédoux, A. Comparison of amorphous states prepared by melt-quenching and cryomilling polymorphs of carbamazépine. *Int. J. Pharm.* **2016**, *509*, 305–313. [[CrossRef](#)]
35. Hédoux, A.; Paccou, L.; Guinet, Y.; Willart, J.-F.; Descamps, M. Using the low-frequency Raman spectroscopy to analyze the crystallization of amorphous indomethacin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *38*, 156–164. [[CrossRef](#)]
36. Hédoux, A.; Guinet, Y.; Paccou, L.; Danede, F.; Derollez, P. Polymorphic transformation of anhydrous caffeine upon grinding and hydrostatic pressurizing analyzed by low-frequency Raman spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 162–170. [[CrossRef](#)]
37. Inocêncio, S.; Cordeiro, T.; Matos, I.; Danède, F.; Sotomayor, J.C.; Fonseca, I.M.; Correia, N.T.; Corvo, M.C.; Dionísio, M. Ibuprofen incorporated into unmodified and modified mesoporous silica: From matrix synthesis to drug release. *Microporous Mesoporous Mater.* **2021**, *310*, 110541. [[CrossRef](#)]
38. Song, S.; Hidajat, K.; Kawi, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: Influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* **2005**, *21*, 9568–9575. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Résumé

Les principes actifs sont synthétisés la plupart du temps à l'état cristallin. Cet état est stable mais présente une biodisponibilité faible par rapport à un état amorphe. Le confinement d'un principe actif dans des matrices de silice mésoporeuses est une des stratégies permettant de stabiliser son état amorphe et de contrôler sa libération. Le développement de cette stratégie a fait l'objet de plusieurs études afin de répondre aux problématiques liées à la formulation d'un médicament. Les méthodes régulièrement utilisées pour le chargement reposent sur le phénomène de capillarité, soit par dissolution en de solvants parfois toxiques, ou par fusion du principe actif qui peut engendrer une dégradation chimique. Ces deux méthodes sont incompatibles avec une application thérapeutique. Le chargement par broyage est une méthode récente qui a été développée dans le but de lever ce verrou technologique. Le travail de cette thèse a consisté d'une part à optimiser cette méthode de chargement mais également à étendre son champ d'application à des systèmes biomoléculaires.

Resume

Active pharmaceutical ingredients are mostly synthesized in crystalline state. This state is stable but has low bioavailability compared to an amorphous state. The confinement of an active ingredient in mesoporous silica matrices is one of the strategies to stabilize its amorphous state and control its release. The development of this strategy has been the subject of several studies to address the issues related to drug formulation. The methods regularly used for loading rely on the phenomenon of capillarity, either by dissolution in sometimes toxic solvents, or by melting the active pharmaceutical ingredient which can lead to chemical degradation. Both of these methods are incompatible with therapeutic applications. Milling-assisted loading is a recent method that has been developed to overcome this technological barrier. The work of this thesis consisted on optimizing this loading method and also extending its application to biomolecular systems.