

N° d'ordre: 19 /2010-M/CH

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE  
HOUARI BOUMEDIENE  
USTHB/ALGER

FACULTE DE CHIMIE



Présenté pour l'obtention du diplôme de

**MAGISTER**

EN: CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par

**Mme. KAFI *Ismahene Zahira* épouse DIDOUN**

**Sujet**

**Inclusion du Piroxicam à  
la  $\beta$ -cyclodextrine et  
caractérisation physico-chimique**

Soutenu publiquement le : 20 / 05 / 2010, devant le jury composé de :

<b>Mr A. BAALIOUAMEUR</b>	Professeur à l'U. S. T. H. B. <b>Président</b>
<b>Mr M .H GUERMOUCHE</b>	Professeur à l'U. S. T. H. B. <b>Directeur de mémoire</b>
<b>Mr A. DAHMANI</b>	Professeur à l'U. S. T. H. B. <b>Examineur</b>
<b>Mme S. DJEBBAR</b>	Professeur à l'U. S. T. H. B. <b>Examinatrice</b>
<b>Mme B. BOUTEMEUR</b>	Professeur à l'U. S. T. H. B. <b>Examinatrice</b>

**« Confronté à la roche, le ruisseau l'emporte toujours, non par la force mais par la persévérance »**

*par H. Jackson Brown*

*En premier lieu je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné la force et le courage d'avancer toujours*

*A mes parents qui ont toujours cru en moi. A ma mère qui m'a toujours encouragé pour aller de l'avant, malgré les embûches de la vie  
A mon mari, pour avoir été à mes côtés, même dans les moments difficiles, et d'avoir supporté ma mauvaise humeur*

*A ma fille chérie, Olfa, qui du haut de ses trois ans, est aussi digne de ce diplôme, pour le nombre de fois qu'elle a veillé avec maman, à travailler elle aussi sur son ordinateur !*

*A toute la famille KAFI*

*A toute la famille DIDOUN*

*En fin, A tous mes amis et collègues*

## **Remerciements**

*Ce travail a été effectué dans le laboratoire de chromatographie de la Faculté de Chimie de l'U.S.T.H.B.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon Directeur de thèse Monsieur le professeur Moulay Hassan GUERMOUCHE, Directeur du laboratoire de chromatographie, de m'avoir fait l'honneur d'accepté de diriger mes recherche en vu de l'obtention de ce diplôme. Je le remercie pour les discussions riches que nous avons eues, sa disponibilité et sa patience. Je n'oublierai pas son soutien.*

*Je remercie Monsieur A. BALIOUAMER, Professeur à l'U. S. T. H. B, de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me font :*

*Monsieur A. DAHMANI, Professeur à l'U.S.T.H.B*

*Madame S. DJEBBAR, Professeur à l'U.S.T.H.B, et*

*Madame B.BOUTEMEUR, Professeur à l'U.S.T.H.B,*

*qui ont bien voulu juger ce travail, je leur adresse mes sincères remerciements.*

*Mes remerciements s'adressent aussi tout particulièrement à Monsieur Djamel Eddine AKRETCHE, Vice-recteur chargé de la poste graduation et Professeur à l'U.S.T.H.B, pour avoir guidé mes pas à l'U.S.T.H.B, ses conseils et ses encouragements.*

*J'exprime mes remerciements à mes responsables hiérarchiques, Monsieur le Président Directeur Générale du Groupe SAIDAL, Boumediene DERKAOUI, et Monsieur le Directeur du Centre de Recherche et Développement, Mohamed FERKIOUI, de m'avoir autorisé à réaliser mon Magister, je leur témoigne mon profond respect.*

*J'adresse mes remerciements à l'ensemble de mes collègues et collaborateurs, tout particulièrement à Monsieur Samir AMARA pour avoir contribué à la réalisation de la partie chromatographique de la biodisponibilité in vivo et assurer mon intérim durant mon absence. Un grand merci à Monsieur Mohamed ZAOUANI, Directeur du laboratoire de pharmacotoxicologie, Madame Nozha LAZLI BOUCHENE, Maitre Assistante Pharmacologue, pour m'avoir aidé au montage du protocole de biodisponibilité in vivo, ses conseils et sa disponibilité.*

*Les personnes qui m'auront apporté leur aide et leur soutien me voient leur offrir toute ma gratitude. Parmi elles, MON AMIE AFFAF, ma collègue aussi, pour m'avoir boosté, aidé, et soutenue. Merci AFFAF. FAIROUZ, merci pour tes conseils et ta précieuse aide.*

# Inclusion du Piroxicam à la $\beta$ cyclodextrine et caractérisation physico-chimique \*

Par : M<sup>me</sup> KAFI Ismahene Zahira épouse DIDOUN\*  
Laboratoire de chromatographie\*\*- Faculté de chimie  
U.S.T.H.B

Une mauvaise solubilité du principe actif, sa forte sensibilité, des propriétés organoleptiques indésirables ou une biodisponibilité réduite sont les principales difficultés auxquelles les galénistes sont confrontés. La solution à ces problèmes a été apportée par l'utilisation de nouvelles technologies qui permettent d'obtenir de nouvelles formes pharmaceutiques, des procédés de préparations originaux (encapsulation, dispersion solide...) ou par l'emploi d'excipients variés.

Les cyclodextrines (CD) font partie des outils accessibles à la formulation. Ces molécules [1], constituées par l'enchaînement de glycopyranoses, se présentent sous la forme d'un anneau dont le diamètre varie selon le nombre d'unités les composants. Cette structure permet d'accueillir à l'intérieur de sa cavité des substances hydrophobes selon un mécanisme d'inclusion particulier [2]. L'arrangement des groupements fonctionnels périphériques de la CD confère à la molécule invitée de nouvelles propriétés physico-chimiques lui assurant de multiples applications.

C'est dans cette optique que nous nous sommes proposé dans le cadre de cette thèse de Magister d'étudier l'inclusion du piroxicam (PRX), un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) pratiquement insoluble en milieu aqueux, à la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD), selon le plan suivant :

Dans le premier chapitre, nous présentons les propriétés principales des cyclodextrines et un bref exposé des anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS).

Dans le deuxième chapitre, nous abordons les complexes d'inclusion, les principales méthodes d'inclusion, la méthode de solubilisation selon HIGUCHI & CONNORS ainsi que les principales méthodes physiques d'analyses des complexes d'inclusion.

Dans la partie expérimentale et à travers le troisième chapitre, on procède à :

- 1- La préparation des complexes d'inclusion par différents procédés
- 2- L'étude de la solubilité et diagramme de solubilité selon Higuchi et Connors
- 3- La caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion obtenus par co-évaporation par DSC, RMN et RX.
- 4- L'étude de la biodisponibilité in vitro des complexes d'inclusion obtenus par malaxage (test de dissolution)
- 5- L'étude comparative de la biodisponibilité in vivo du complexe d'inclusion obtenu par co-évaporation au CYCLADOL<sup>®</sup> comprimé à 20mg

En conclusion, après interprétation des résultats obtenus à l'issue de chaque étape et leur comparaison avec les données bibliographiques, on conclue que l'inclusion du piroxicam à la  $\beta$ -CD augmente significativement sa solubilité en milieu aqueux et par conséquent sa biodisponibilité en milieu biologique garantissant ainsi un meilleur effet thérapeutique.

- \*Thèse de Magister
- \*\*Directeur de thèse : *Mr Moulay Hassan GUERMOUCHE*, Professeur, Faculté de chimie, USTHB



# Tables des matières

Abréviations  
Liste des figures  
Liste des tableaux

**Introduction ..... 1**

## **Chapitre I**

### **Partie théorique**

**Les Cyclodextrines..... 3**

I- Présentation générale des cyclodextrines

1)-Historique..... 4

2)-Caractéristiques structurales et physico-chimiques..... 5

3)-Biodégradabilité des Cyclodextrines..... 9

4)-Toxicité des cyclodextrines..... 10

5)-Applications actuelles et futures ..... 10

**Les AINS..... 12**

II- Les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens – AINS

1)-Définition ..... 13

2)-Classification ..... 13

3)-Pharmacocinétique ..... 13

4)-Le Piroxicam (PRX)..... 14

5)-Propriétés physico-chimique du Piroxicam (PRX) ..... 14

## **Chapitre II**

**Les complexes d'inclusion..... 15**

III- Les complexes d'inclusion

1)-Présentation générale ..... 16

2)-Principales méthodes d'inclusion ..... 18

3)-Energies mises en cause ..... 18

4)-Conséquences .....	19
5)-Etude des complexes d'inclusions .....	20
1-Etude de la solubilité-Diagramme Higuchi & Connors .....	20
2-Méthodes physico-chimiques d'analyse des complexes d'inclusion .....	23

## Chapitre III

### Partie expérimentale : Préparation des complexes &

#### Méthodes.....

24

#### I-Préparation des complexes d'inclusion

1)-Matières premières .....	25
2)-Préparation des complexes d'inclusion .....	25
▪ Le mélange type filtrat .....	25
○ Détermination de la quantité de PRX en excès .....	26
○ Préparation de la gamme de solutions de βCD .....	26
▪ Le mélange par malaxage .....	27
▪ Le mélange par co-évaporation .....	27

#### II-Méthodes

1)-Mise au point et validation d'une technique de dosage du PRX en milieu aqueux .....	29
▪ Réactifs, références et solutions utilisées .....	29
▪ Appareillage .....	29
▪ Optimisation des conditions opératoires .....	29
▪ Préparation de la gamme d'étalonnage .....	29
▪ Validation de la méthode .....	30
2)-Etude de la solubilité – Diagramme de solubilité.....	31
▪ Principe .....	31
▪ Détermination de la constante d'inclusion .....	31
3)-Analyse thermique différentielle (DSC) .....	32
4)-Analyse par diffraction des rayons X (DRX) .....	32
5)-Analyse de la résonance magnétique nucléaire (RMN- <sup>1</sup> H) .....	32
6)-Etude de la biodisponibilité in vitro (test de dissolution) .....	32
7)-Etude comparative de la biodisponibilité in vivo .....	33
▪ Matériel et réactifs utilisés.....	33
○ Matériel biologique .....	33
○ Matériel non biologique .....	33
○ Réactifs .....	34
▪ Préparation des suspensions à 0.067mg/ml .....	34
▪ Méthode .....	34
▪ Protocole de prélèvement .....	35

▪ Méthode chromatographique .....	36
○ Réactifs et solvants et autres produits utilisés.....	36
○ Appareillage .....	36
▪ Conditions chromatographiques .....	36
▪ Courbes d'étalonnage .....	37
○ Courbe d'étalonnage sans sérum .....	37
- Préparation des solutions standards et gamme d'étalonnage.....	37
- Préparation des solutions mères.....	37
- Préparation de la gamme d'étalonnage .....	38
○ Courbe d'étalonnage avec sérum .....	38
- Protocole d'extraction .....	38

## Chapitre IV

<b>Résultats &amp; Discussions.....</b>	<b>40</b>
1)- Mise au point et validation d'une technique par spectrophotométrie UV/Vis pour le dosage du PRX en milieu aqueux.....	41
▪ Sensibilité .....	41
▪ Répétabilité .....	42
▪ Précision .....	43
2)-Etude de la solubilité – Diagramme de solubilité .....	43
3)-Détermination de la constante d'inclusion .....	46
4)-Analyse par DSC.....	47
5)-Analyse par DRX .....	50
6)-Analyse par RMN <sup>1</sup> H.....	54
7)-Etude de la biodisponibilité in-vitro (test de dissolution) .....	59
8)-Etude comparative de la biodisponibilité in vivo.....	64
▪ Analyse chromatographique .....	65
○ Courbes d'étalonnage .....	65
- Courbe d'étalonnage en absence du sérum .....	65
- Courbe d'étalonnage en présence du sérum .....	67
▪ Etude comparative de la biodisponibilité <i>in vivo</i> .....	71
<b>9)-Conclusion .....</b>	<b>74</b>

<b>Conclusion générale.....</b>	<b>76</b>
Bibliographie	
Annexe	

# Introduction

Une mauvaise solubilité du principe actif, sa forte sensibilité, des propriétés organoleptiques indésirables ou une biodisponibilité réduite sont les principales difficultés auxquelles les galénistes sont confrontés. La solution à ces problèmes a été apportée par l'utilisation de nouvelles technologies qui permettent d'obtenir de nouvelles formes pharmaceutiques, des procédés de préparations originaux (encapsulation, dispersion solide...) ou par l'emploi d'excipients variés.

Les cyclodextrines (CD) font partie des outils accessibles à la formulation. Ces molécules [1], constituées par l'enchaînement de glycopyranoses, se présentent sous la forme d'un anneau dont le diamètre varie selon le nombre d'unités les composants. Cette structure permet d'accueillir à l'intérieur de sa cavité des substances hydrophobes selon un mécanisme d'inclusion particulier [2].

Même si de nombreuses molécules d'Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) sont disponibles, sur le marché mondial des médicaments, il existe néanmoins des raisons précises à vouloir renforcer l'arsenal thérapeutique avec des médicaments plus efficaces et surtout plus sûrs, en exploitant les progrès de la pharmacologie et certaines avancées dans le domaine des techniques pharmaceutiques.

Les AINS sont parmi les médicaments les plus utilisés dans le monde. Cette classe thérapeutique constitue 4 à 6 % de l'ensemble des prescriptions médicamenteuses sans oublier que certains AINS peuvent être délivrés sans ordonnance. Les AINS sont le traitement de choix lors de la prise en charge des pathologies rhumatismales mais la limitation majeure de leur utilisation provient de leurs effets indésirables notamment des gastrites, des ulcérations digestives et des saignements. L'hémorragie digestive induite par les AINS est une complication potentiellement grave due au développement ou à l'exacerbation d'ulcères gastriques et duodénaux [3]. Une des nouvelles perspectives par l'approche galénique repose sur l'encapsulation des AINS dans les cyclodextrines.

Dans le domaine de la formulation pharmaceutique, les cyclodextrines qui sont des molécules stables, non absorbées et dénuées de toxicité peuvent théoriquement avoir des applications multiples.

La formation de complexes entre une substance médicamenteuse et les cyclodextrines permet de modifier certaines caractéristiques physico-chimiques de la molécule encapsulée.

Parmi les plus documentées, on peut citer, le masquage du goût ou d'une odeur désagréable [4-5] ou bien une augmentation de la stabilité en empêchant les réactions d'oxydation dues au contact du principe actif avec l'air ou à son exposition à la lumière [6]. Cependant, l'intérêt majeur des composés d'inclusion est qu'ils présentent généralement ***une solubilité aqueuse largement supérieure à celle de la molécule invitée laissant ainsi espérer une meilleure biodisponibilité [7].***

De nombreuses données indiquent que les AINS encapsulés se dissolvent *in vitro* plus rapidement que les molécules de base [8], alors que les modifications pharmacocinétiques s'appuient principalement sur l'apparition précoce d'un pic plasmatique [9]. L'encapsulation moléculaire permet ainsi de limiter l'action irritante de l'AINS en s'opposant au contact direct de la molécule incluse avec la membrane stomacale mais aussi en diminuant le temps de présence du principe actif dans la lumière gastrique suite à l'augmentation de sa vitesse de dissolution dans les fluides digestifs et l'accélération de son absorption.

En s'appuyant sur ce qui précède, on se propose dans le cadre de cette thèse de Magister d'étudier l'inclusion du piroxicam PRX, un AINS pratiquement insoluble en milieu aqueux, à la  $\beta$ -cyclodextrine  $\beta$ -CD.

Pour réaliser ce travail, nous avons procédé à :

- 1- La préparation des complexes d'inclusion par différents procédés
- 2- L'étude de la solubilité et diagramme de solubilité selon Higuchi & Connors
- 3- La caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion obtenus par co-évaporation. Les techniques d'analyses utilisées sont : DSC, RMN et RX
- 4- L'étude de la biodisponibilité *in vitro* des complexes d'inclusion obtenus par malaxage (test de dissolution)
- 5- L'étude comparative de la biodisponibilité *in vivo* du complexe d'inclusion obtenu par co-évaporation et celle du CYCLADOL<sup>®</sup> comprimé à 20mg.

# **Chapitre I**

## **Partie Théorique**

**Les cyclodextrines**

# I- Présentation générale des cyclodextrines

## 1)-Historique :

L'histoire des cyclodextrines débute il y a un peu plus d'une centaine d'années : en 1891, Villiers [10] isole 3 g d'une substance cristalline issue de la digestion bactériologique d'un kilogramme d'amidon. Il en détermine la composition et lui attribue la formule brute suivante :  $(C_6H_{10}O_5)_2, 3H_2O$ . Il décide de la nommer "cellulosine" du fait de ses propriétés proches de celles de la cellulose : résistance à l'hydrolyse acide, propriétés non réductrices. Il observe également l'existence de deux formes cristallines distinctes correspondant probablement à l' $\alpha$ -CD et à la  $\beta$ -CD.

Ce n'est que 20 ans plus tard que Shardingier isole la souche microbienne *Bacillus macerans* [11,12] responsable de la formation de ces dextrines cristallisées, les dextrines désignant l'ensemble des produits de dégradation. Il distingue deux produits cristallins différents : la "dextrine  $\alpha$  cristallisée" et la "dextrine  $\beta$  cristallisée". Cette différenciation fut rendue possible par leur capacité à former des adduits de couleurs distinctes avec des molécules de diiode [13].

Au début des années 30, l'équipe de Pringsheim, bien que se basant sur des études pouvant être discutées, découvre la capacité de ces dextrines à former des complexes avec divers composés organiques [14,15]. Ce n'est qu'en 1936, que Freudenberg *et coll.* arrivent à la conclusion que les "dextrines de Shardingier" sont des oligosaccharides constitués d'un enchaînement d'unités maltoses liées par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidiques, et postulent pour une structure cyclique [16]. Elle sera confirmée par French et Rundle en 1942. Ils déterminèrent la structure exacte de l' $\alpha$ -CD et de la  $\beta$ -CD, tandis que celle de la  $\gamma$ -CD ne sera élucidée qu'à la fin des années 40 [17].

Au début des années 50, les propriétés d'inclusion des CDs sont étudiées de manière intensive par Cramer [18]. En 1953, un premier brevet sur l'application des CDs dans la formulation de composés à visée biologique est déposé par Freudenberg, Cramer et Plieninger [19].

Depuis les années 70, et après plusieurs études concluant à la non-toxicité des CDs, elles sont produites et utilisées dans l'industrie.

Aujourd'hui, la production de  $\beta$ -CD est supérieure à 1000 T/an et son prix continue de baisser (quelques euros par kilogramme). D'autres CDs naturelles ou modifiées

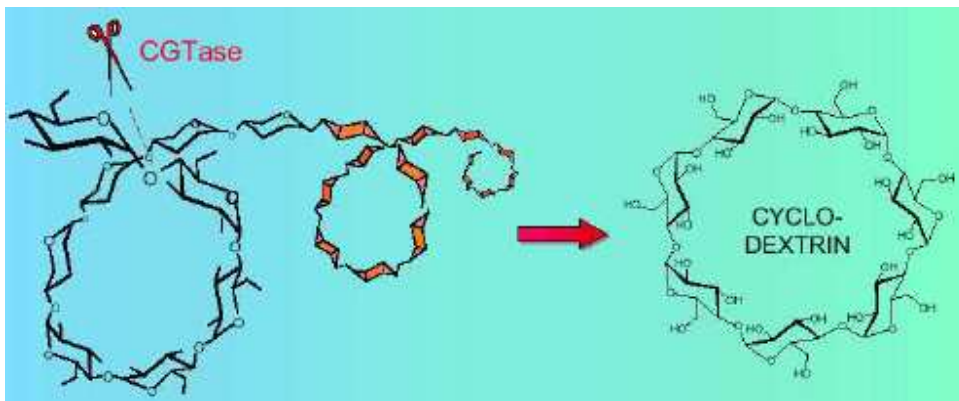
sont également produites industriellement. Enfin, le nombre de publications consacrées à ces molécules-cages n'a cessé d'augmenter, et ceci de façon exponentielle : CD-NEWS a recensé plus de 20 000 publications parues entre 1985 et fin 2002 [20]

## **2)-Caractéristiques structurales et physico-chimiques:**

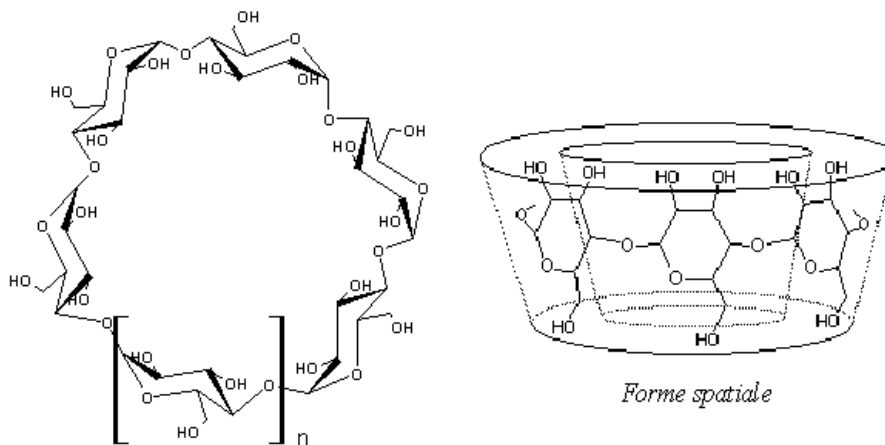
Les cyclodextrines sont donc des oligosaccharides cycliques non réducteurs, obtenues industriellement par la dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase), d'origine bactérienne (*Bacillus macerans*, *Alkalophylic bacillus*,...). La structure hélicoïdale de la macromolécule est alors détruite au profit d'une structure cyclique (**figure n°1**).

Les trois CDs les plus fréquemment rencontrées sont l' $\alpha$ -, la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -cyclodextrine constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosiques, liées entre elles par des liaisons glycosidiques de type  $\alpha(1\rightarrow4)$  (**figure n° 2**).

Il existe également des CDs de plus grandes tailles ( $\delta$ -CD,  $\epsilon$ -CD... respectivement constituées de 9, 10... unités) et de taille plus petite (4, 5 unités) qui ont été isolées ou synthétisées. La synthèse totale de ces molécules demeure marginale car les rendements obtenus lors des réactions de glycosylation sont souvent très faibles.



**Figure n°1** : Action de la CGTase sur l'amidon.

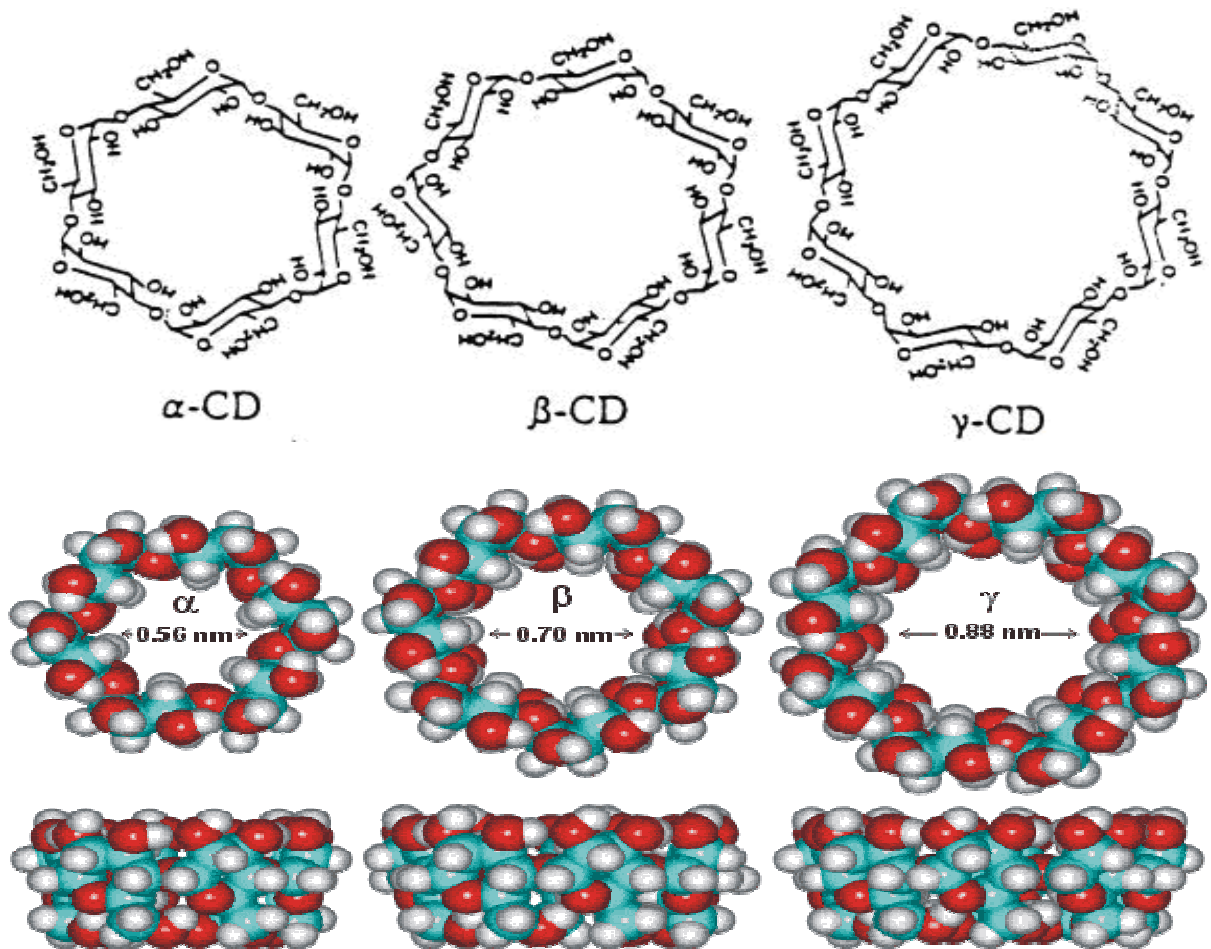


**n= 6,  $\alpha$ -cyclodextrine**  
**n=7,  $\beta$ -cyclodextrine**  
**n=8,  $\gamma$ -cyclodextrine**

**Figure n°2 :** Formule développée générale des cyclodextrines et représentation schématique de leur structure tridimensionnelle.

Différentes nomenclatures sont utilisées dans la littérature pour l'appellation des CDs. La  $\beta$ -cyclodextrine se retrouve par exemple sous le nom de  $\beta$ -dextrine de Sharding, cyclomaltoheptaose, cycloheptaglukan, cycloheptaamylose,  $\beta$ -CD, BCD ou C7A. En nomenclature systématique, si l'on omet la configuration absolue des centres stéréogènes, elle se nomme de la façon suivante : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35-heptakis (hydroxyméthyl)-2, 4, 7, 9, 12, 14, 17, 19, 22, 24, 27, 29, 32, 34-tétradécaoxaocyclo [31.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>.2<sup>28,31</sup>]nonatétracontane-36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49-tétradécole. Le terme  $\beta$ -CD sera employé dans ce document.

Les CDs ont une structure tridimensionnelle en forme de cylindre conique dont la paroi est constituée par des unités glucoses, en conformation chaise <sup>4</sup>C<sub>1</sub> [21,22] (figure n° 3).



**Figure n° 3** : Structures tridimensionnelles des cyclodextrines naturelles

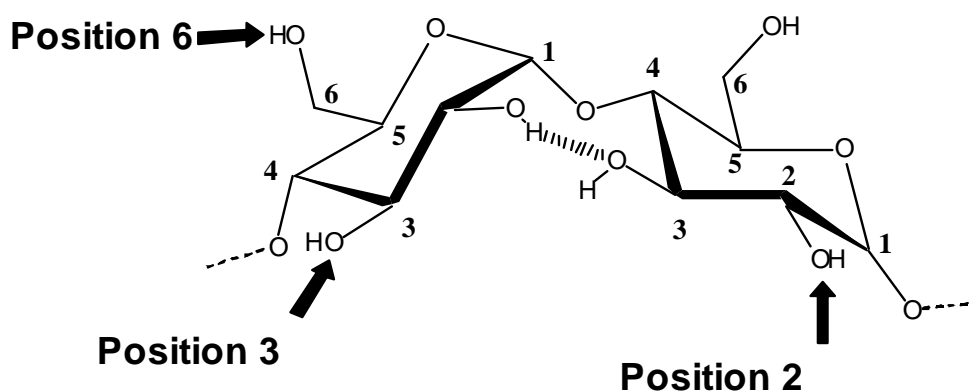
( $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -CD de gauche à droite).

Tous les hydroxyles secondaires (OH-2, OH-3) sont situés sur le côté le plus grand du tronc conique alors que les hydroxyles primaires (OH-6) sont localisés sur le petit côté. La présence de ces groupements hydroxyles sur les deux bords de la couronne confère à la partie extérieure de la CD un caractère hydrophile (surface en contact avec le solvant), alors que l'intérieur de la cavité, tapissée d'atomes d'hydrogène (H-3, H-5, H-6) et de l'oxygène inter-glycosidique (O-4), est hydrophobe.

De plus, les paires d'électrons non liantes des oxygènes inter-glycosidiques sont dirigées vers l'intérieur de la cavité, y produisant une densité électronique élevée.

La cavité est donc dotée d'un caractère de *base de Lewis* sans pour autant donner un caractère acide à la partie extérieure de la cyclodextrine.

La structure des CD est stabilisée par une véritable ceinture de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les OH-2 d'une unité glucose et les OH-3 de l'unité voisine (**figure 4**). Dans le cas de la  $\beta$ -CD, cette ceinture de liaisons hydrogène rend sa structure très rigide et lui confère une faible solubilité dans l'eau par rapport aux autres CD.



**Figure n°4** : Liaison hydrogène intramoléculaire.

En revanche, la présence de ces liaisons n'empêche pas la déformation de la cavité dans le cas de la  $\gamma$ -CD. Cette déformation va en s'accroissant chez les CD dont le nombre d'unités glucose est supérieur à 8 et agit de façon défavorable sur leur propriété d'inclusion.

Les principales caractéristiques structurales et physico-chimiques de l' $\alpha$ -, de la  $\beta$  et de la  $\gamma$ -CD sont reportées dans le tableau suivant (**tableau n° I**) :

**Tableau n° I** : Caractéristiques physico-chimiques des principales CD.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
<b>Nombre d'unités glucoses</b>	6	7	8
<b>Formule brute</b>	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
<b>MM (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	972	1135	1297
<b>Solubilité dans l'eau (g.L<sup>-1</sup>) à 25°C</b>	145	18,5	232

$[\alpha]_D^{25} \text{ } ^\circ\text{C} (\text{H}_2\text{O}, c=1)$	+ 150°	+ 162°	+ 177°
<b>Ø cavité (Å) (petit côté – grand côté)</b>	4,3 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
<b>Hauteur du tore (Å)</b>	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
<b>Volume approx. cavité (Å<sup>3</sup>)</b>	174	262	427
<b>Nombre moyen de molécules d'eau dans la cavité</b>	6 - 8	12	13

Les cyclodextrines sont entourées de molécules d'eau d'hydratation, relativement faciles à éliminer (par séchage), et de molécules d'eau incluses dans la cavité qui ne peuvent être elles que remplacées, mais non éliminées.

Le caractère amphiphile des CDs, lié à leur structure spatiale, leur confère une propriété majeure : celle de former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une ou plusieurs molécules invitées hydrophobes. Pour cette raison, elles appartiennent à la famille des « molécules cages ».

### **3)-Biodégradabilité des Cyclodextrines :**

La biodégradation des cyclodextrines naturelles ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD) est rapide et complète, dans des conditions expérimentales idéales, leur pourcentage de biodégradabilité atteint 90% après 15 jours d'incubation tandis que seulement 5.6 % de CD acétylées a été observé après 45 jours.

La substitution par des groupements méthyl ou hydroxypropyl affecte aussi la biodégradation de la  $\beta$ -CD. Seulement 20% de hydroxypropyl-CD sont dégradés après 100 jours indiquant que ce type de CD est tout de même partiellement dégradable dans ces conditions [23].

### **4)-Toxicité des cyclodextrines :**

En général, les cyclodextrines naturelles et leurs dérivées plus hydrophiles sont seulement capables de passer à travers les membranes biologiques lipophiles, telles la cornée, les muqueuses ou la peau, avec de grandes difficultés. Même la  $\beta$ -CD méthylée qui est plus ou moins lipophile ne diffuse pas facilement à travers les membranes biologiques, bien qu'elle interagisse de manière plus efficace avec les membranes que les dérivés hydrophiles. Gerloczy et Coll (1988) ont ainsi montré que seule une très faible quantité de diméthyle- $\beta$ -cyclodextrine radio-marquée est absorbée transdermiquement. On peut supposer que le haut poids moléculaire des CDs est une des causes limitant ce passage.

Toutes les études de toxicité ont démontré que l'administration orale de cyclodextrines est non toxique, ceci étant dû à leur très faible absorption gastro-intestinale (0,1 à 3%). Le caractère hémolytique des cyclodextrines est bien connu mais n'apparaît en fait qu'à forte concentration [23, 25].

## **5)-Applications actuelles et futures :**

C'est cette propriété remarquable qu'ont les CDs de complexer en milieu aqueux un panel impressionnant de molécules hôtes qui fait que l'on trouve dans la littérature de nombreux domaines d'application dans la formulation de composés actifs [26,28].

Dans l'industrie, les propriétés des CDs sont largement exploitées dans le milieu pharmaceutique ; un grand nombre de spécialités à base de CDs, sont commercialisées à travers le monde [29,30].

Les principales CDs utilisées à l'heure actuelle par l'industrie pharmaceutique sont les  $\beta$ -CD normales ou modifiées. On trouve quelques exemples avec l' $\alpha$ -CD et la  $\gamma$ -CD. La plupart des médicaments à base de CDs sont administrés par voie orale (comprimés, dragées, sirops,...).

Cependant, on remarque que toutes les spécialités administrées par voie nasale ou oculaire utilisent des CDs modifiées (methyl- $\beta$ -CD, hydroxypropyl- $\beta$ -CD). Ces systèmes d'absorption font appel à des mécanismes de passage transmembranaire.

Ces mécanismes sont sans doute facilités par le caractère amphiphile que confèrent les groupements alkyles greffés sur les CDs employées.

Beaucoup de ces médicaments sont utilisés comme anti-inflammatoires (Piroxicam), mais on trouve d'autres applications. Le marché des CDs est un marché mondial : les entreprises pharmaceutiques qui commercialisent ces produits sont européennes (Servier, Novartis, Fabre (France), Betafarm (Allemagne), Pfizer (Suède),...), américaines (CTD, NCI,...), japonaises (Takeda, Ono,...) et sud-américaines (Aché (Brésil), Gador (Argentine)).

Il existe également beaucoup d'applications dans les domaines de l'agroalimentaire, de la cosmétique, des détergents et aussi du textile [31]. Actuellement, les applications des CDs dans la formulation des pesticides restent encore modestes car l'industrie des pesticides est très sensible au coût des matières premières. Toutefois, une baisse rapide des coûts de production de la  $\beta$ -CD pourrait rapidement changer la donne dans ce secteur d'activité.

Les applications industrielles faisant appel aux CDs représentent un marché en plein essor. Il suffit de voir le très grand nombre de brevets nationaux et internationaux déposés ces dernières années, couvrant l'exploitation de ces applications. Dans ce domaine, le Japon est un exemple significatif [32].

Dans les domaines plus fondamentaux et technologiques, les CDs trouvent aussi de nombreuses applications. En chimie analytique, les CDs ont un potentiel incroyable pour la séparation chirale (HPLC, Electrophorèse capillaire) [33,34]. Elles sont aussi des catalyseurs chimiques efficaces [35,37] et sont utilisées dans la conception d'enzymes artificielles [38,40].

Enfin, les applications des CDs dans les industries chimiques et biotechnologiques sont également en expansion [41,42].

# **Les AINS**

## **II- Les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens - AINS**

### **1)-Définition :**

Se sont des médicaments dépourvus de noyau stéroïde, ayant une action anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont comme principal mode d'action l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (PG) par inhibition d'une enzyme: la cyclo-oxygénase (COX). Il en existe de très nombreuses molécules. Ces médicaments sont l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde et en Algérie aussi.

Leur bénéfice thérapeutique est cependant limité par la survenue d'effets indésirables potentiellement graves, principalement digestifs mais aussi rénaux, pulmonaires, cutanés...etc., qui les placent au premier rang de la pathologie iatrogène médicamenteuse.

### **2)-Classification :**

Plusieurs familles d'AINS 'classiques' existent :

- Les dérivés de l'acide carboxylique : l'acide tiaprofénique, le Diclofonac, Flurbiprofène, Ibuprofène, Kétoprofène, Naproxène.
- Les dérivés de l'oxicam : le meloxicam, le *piroxicam*, le ténoxiam.
- Les dérivés des fénamates,
- Les dérivés indoliques: l'indométhacine, le sulindac,
- Les dérivés pyrazolés : la phénylbutazone.

### **3)-Pharmacocinétique :**

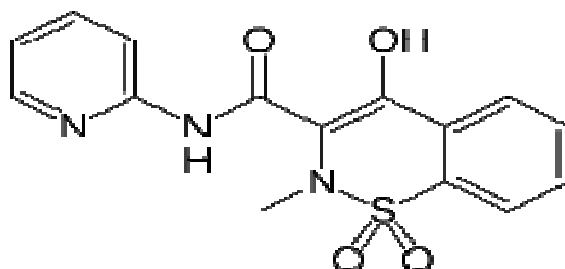
La demi-vie d'élimination permet de classer les AINS en produit d'action brève (0,25 à 6,8 heures : aspirine, ketoprofène, indométhacine...) et produit d'action longue (13 à 68 heures : sulindac, diflunisal, naproxen, piroxicam...). La fixation aux protéines plasmatiques est élevée, source de possibles interactions, avec déplacement et augmentation de forme libre (active) donc risque de surdosage subit [43,44].

### **4)-Le Piroxicam (PRX):**

Le piroxicam est un AINS du groupe des oxicams. Il possède des propriétés antalgique, antipyrétique, anti-inflammatoire et Inhibiteur des fonctions plaquettaires. L'ensemble de ces propriétés est lié à une inhibition de la synthèse des prostaglandines [45].

### **5)-Propriétés physico-chimique du Piroxicam (PRX) :**

Le PRX est une poudre cristalline, blanche ou légèrement jaune, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans l'éthanol. *Le PRX présente le phénomène de polymorphisme [46].*



**Figure n° 5:** Structure chimique du PRX

**Tableau n°II :** Propriétés physico chimiques du Piroxicam

<b>Non du produit de référence</b>	<b>Féldène®</b> (laboratoire princeps)
<b>Dénomination Commune Internationale (DCI)</b>	Piroxicam (selon BANM :British Approved Name Modified et USAN (United States Approved Name)
<b>Groupe chimique</b>	AINS (oxicams)
<b>Dénomination chimique</b>	I. 2H-1,2-BENZODIAZEPINE-3-CARBOXAMIDE, 4-HYDROXY-2-PYRIDYNIL1-,1,1-DIOXIDE II. 4-HYDROXY-2-METHYL-N-2-PYRIDIL-2H-1.2-BENZOTHIAZIDE-3-CARBOXAMIDE1,1-DIOXIDE
<b>Formule brute</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S</b>
<b>Poids moléculaire (g/mol)</b>	<b>331.5</b>
<b>Point de fusion (°C)</b>	Forme aiguille : 196°C-198°C Forme cubique : 199°C- 201°C

**Remarque :** la forme cubique est la forme thérapeutiquement active.

# Chapitre II

## Les complexes d'inclusion

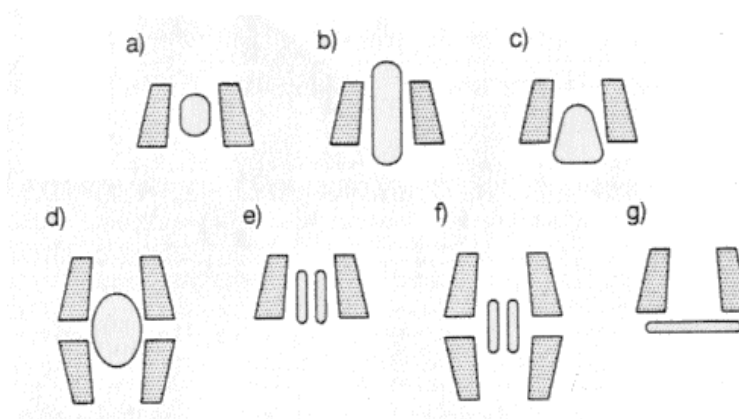
### **III-Les complexes d'inclusion**

#### **1)-Présentation générale :**

Un complexe d'inclusion est une association moléculaire entre une ou plusieurs molécules dont l'une est l'hôte (cyclodextrines) et l'autre l'invitée (la molécule). La molécule "invitée" est alors encapsulée (complexée) de façon totale ou partielle au sein de la molécule "hôte". Les liens qui unissent ces différentes entités sont des interactions faibles, non covalentes, pouvant être de type électrostatique, hydrophobe, ou de Van der Waals. Des liaisons hydrogène ou des empilements  $\pi$ - $\pi$  peuvent également intervenir dans ce processus, ce qui entraîne une dissociation aisée et douce des composés de ces derniers.

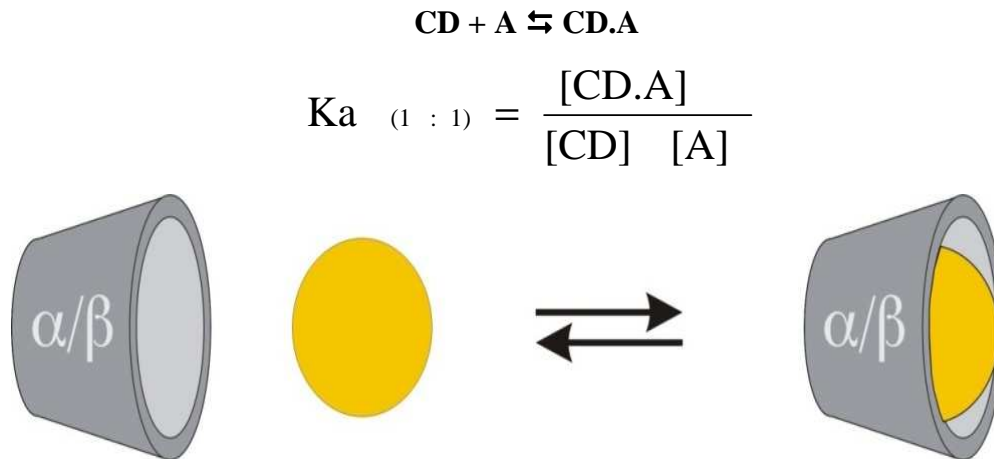
Cramer a introduit en 1951 la notion de *complexe d'inclusion* pour traduire le transfert d'un ligand d'une solution aqueuse vers la cavité d'une cyclodextrine [47]. Cette cavité est, comme vu précédemment, occupée par des molécules d'eau; cette occupation est énergétiquement défavorisée du fait des interactions polaire– apolaire. Cette eau pourra alors être facilement substituée par une "molécule invitée" appropriée, moins polaire qu'elle. Ce phénomène donne dans ce cas naissance à des interactions de type Van der Waals et lorsque la structure de la molécule invitée le permet, à la formation de liaisons hydrogène qui peuvent également stabiliser le complexe.

Les complexes formés entre la (les) cyclodextrine(s) "hôte(s)" et la (les) molécule(s) "invitée(s)" peuvent être de plusieurs types (**figure n°6**) : on distingue les complexes d'inclusion (a-f) et les complexes d'association (g) [48].



**Figure n°6:** Diverses structures en solution aqueuse de complexes cyclodextrines-invités décrits dans la littérature (d'après Wenz, 1994) ; **a)** inclusion complète ; **b)** inclusion "axiale" ; **c)** inclusion partielle (capping) ; **d)** complexe 2:1; **e)** complexe 1:2; **f)** complexe 2:2; **g)** complexe "non-spécifique"

Le plus fréquemment, il s'agit de complexes d'inclusion de type 1:1. En solution, le complexe étant régi par des forces d'interactions faibles, un équilibre s'établit entre les formes dissociées et associées. Cet équilibre thermodynamique s'exprime par une constante d'association  $K_a$ . Dans le cas d'une CD et d'une molécule invitée A, il est régi par la relation suivante (**figure n°7**):



**Figure n° 7:** Complexe d'inclusion de type 1:1 cyclodextrine - molécule invitée

La formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et une molécule invitée confère à ce complexe de nouvelles propriétés physico-chimiques et biologiques différentes de celles de la CD et de la molécule incluse prises séparément :

- modification de la solubilité dans l'eau,
- modification des propriétés spectrales,
- modification de la réactivité chimique (protection à l'oxydation, à l'hydrolyse, réactions énantiosélectives, Diels-Alder,...),
- diminution de la diffusion et de la volatilité (dans le cas de substances volatiles),
- modification des propriétés chirales (séparation d'énantiomères en chromatographie),
- modification des propriétés biologiques (par exemple, le caractère hémolytique)

L'exploitation de ces capacités d'inclusion et la biocompatibilité des CDs ont entraîné un accroissement du nombre et de la diversité de leurs applications [49-53].

## **2)-Principales méthodes d'inclusion :**

La bibliographie fait référence à plusieurs techniques de préparation des complexes d'inclusion, on citera : la co-précipitation/co-évaporation, l'inclusion par l'utilisation de fluides supercritiques tel que le CO<sub>2</sub>, l'atomisation (spray drying), la lyophilisation (freeze

drying) [54,56], le mélange humide (dump mixing), le mélange physique ou mélange à sec (physical mixture) [57], la complexation par malaxage (Kneading) [58].

Pour toutes ces méthodes, il est important de savoir que les quantités utilisées sont régies par le rapport d'inclusion.

### **3)-Energies mises en cause :**

En solution aqueuse, la cavité des CDs est occupée par des molécules d'eau énergiquement non-favorables (interaction polaire-apolaire), ce qui permet une substitution aisée par des molécules invitées de moindre polarité que l'eau.

Plusieurs contributions énergétiques ont été mises en évidence pour expliquer les interactions entrant en jeu lors de la formation de complexes par des CDs.

- Adaptation stérique : par des changements conformationnels de la molécule invitée et/ou de la cyclodextrine (conformation induite) lors du processus d'inclusion.
- Formation de liaisons hydrogène.
- Interactions de Van der Waals : forces de dispersion de London et interactions dipôle-dipôle induit.
- Interactions hydrophobes, dipôle-dipôle, de transfert de charges et électrostatiques.
- Relargage de molécules d'eau à «haute-enthalpie» de la cavité de la cyclodextrine.
- Relargage de molécules de solvant de la cavité de la cyclodextrine avec un gain d'entropie.
- Relâchement des tensions du macrocycle.

C'est l'action simultanée de plusieurs de ces interactions qui rend effective l'inclusion spécifique, les phénomènes de reconnaissances moléculaires étant dus à la coopération de multiples interactions faibles. Ce phénomène d'inclusion-complexation ne fait intervenir aucune liaison covalente mais uniquement des forces telles que les liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, ce qui permet ainsi le relargage de la molécule invitée, ouvrant la voie à de multiples applications.

#### **4)-Conséquences :**

L'inclusion d'invités dans la cavité des CDs, influence les propriétés de celles-ci, ouvrant la voie à de nombreuses études tant théoriques qu'industrielles. Les propriétés physico-chimiques des invités se trouvent modifiées du fait de la formation de complexes d'inclusions :

- Le déplacement chimique en RMN est modifié du fait de ce changement d'environnement anisotropique.
- Lorsque des composés achiraux sont inclus dans une CD, le complexe formé est optiquement actif et montre un important effet de Cotton induit en dichroïsme circulaire.
- Parfois le maximum en UV est déplacé de plusieurs nm.

- La fluorescence est aussi très influencée car la molécule fluorescente passe d'un milieu aqueux à un milieu apolaire.

La réactivité chimique des molécules incluses est aussi modifiée lors de l'inclusion. Le plus souvent elle est diminuée car l'invité se trouve stabilisé, mais la cyclodextrine peut aussi agir comme catalyseur. La diffusion et la volatilité sont modifiées, ainsi que les propriétés chromatographiques des molécules incluses, en particulier en chromatographie chirale [59].

## **5)-Etude des complexes d'inclusions :**

Il existe plusieurs techniques permettant d'étudier ces complexes d'inclusion, elles permettent de mettre en évidence leur formation et, de déterminer leur stœchiométrie et leur stabilité.

Ces différentes techniques reposent sur les modifications des propriétés physico-chimiques ou optiques de la molécule complexée liée à la modification de son microenvironnement.

### **1-Etude de la solubilité-Diagramme Higuchi & Connors :**

Cette approche, telle que développée par Higuchi et Connors [60], est très couramment utilisée pour l'évaluation de l'utilisation potentielle des cyclodextrines afin d'augmenter la solubilité de composés hydrophobes en milieux aqueux. Elle permet en effet d'obtenir le profil de la courbe de solubilité de la molécule invitée en fonction de la concentration en CDs et donc de prouver l'augmentation de la solubilité en présence de CDs.

Le principe de cette méthode consiste à ajouter le composé invité en quantité excédentaire à des solutions de CDs de concentrations croissantes, puis à doser la quantité de composé invité dissous, généralement par UV ou par HPLC. Un diagramme de solubilité de l'invité en fonction des concentrations de CDs peut ainsi être établi. Deux types de diagrammes sont généralement observés: **types A et B (figure n°8) [61]**.

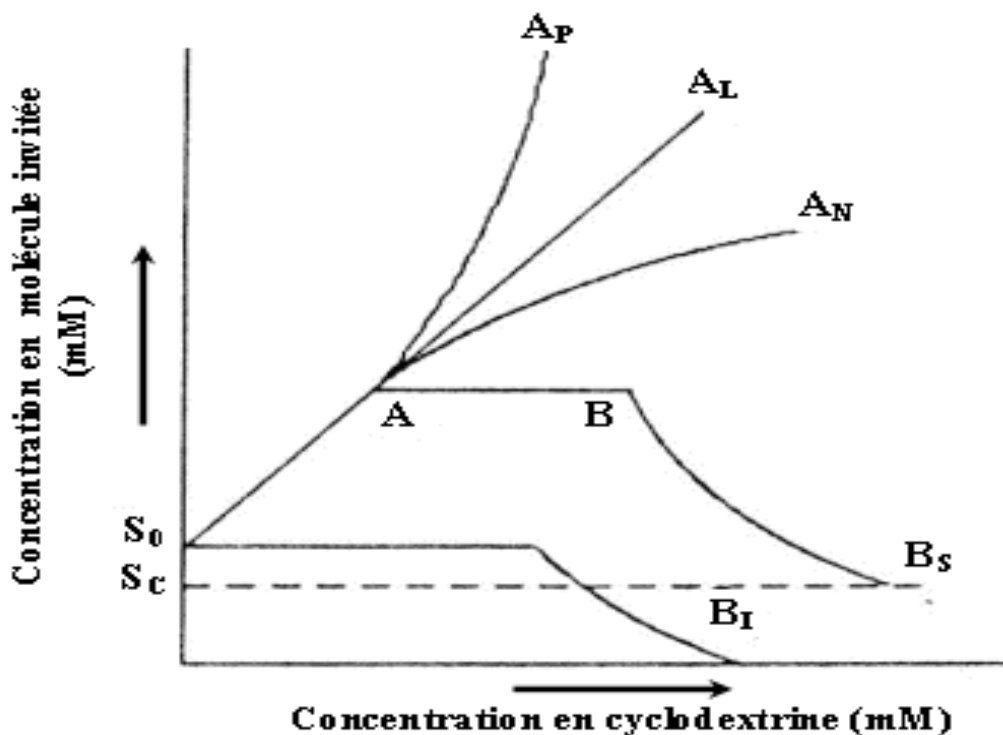
Dans le diagramme de **type A**, la solubilité de l'invité augmente avec la concentration en cyclodextrines. Il y a formation d'un ou plusieurs complexes solubles. Les courbes de type A sont subdivisées en trois (03) sous types **A<sub>L</sub>**, **A<sub>P</sub>** et **A<sub>N</sub>** :

- **A<sub>L</sub>** : représente une augmentation linéaire de la solubilité du composé invité en fonction de la CD. Elle correspond à la formation exclusive d'un composé d'inclusion dont la stœchiométrie est équimolaire (1 : 1 ou 2 : 2 ou 3 : 3)

- **A<sub>P</sub>** : cette courbe est dite «positive», c'est-à-dire incurvée vers le haut.
- **A<sub>N</sub>**: cette courbe est dite «négative», c'est-à-dire incurvée vers le bas. Cependant, son origine reste incertaine, elle pourrait être due à un changement de la constante de formation du complexe, à l'altération du solvant ou bien encore à l'association de molécules de ligands entre elles à de fortes concentrations.

Dans le diagramme de **type B**, la solubilité du composé d'inclusion est inférieure à celle de la cyclodextrine pure: la solubilité de l'invité augmente dans la première partie de la courbe à cause de la formation du composé d'inclusion, mais quand la limite de solubilité est atteinte, la formation accrue de composé d'inclusion provoque sa précipitation, représentée par un plateau. Lorsque l'excès de principe actif est consommé, on observe une décroissance qui serait liée à l'inclusion du principe actif dissout et à sa précipitation concomitante. Ce diagramme est subdivisé en deux (02) sous types **B<sub>S</sub>** et **B<sub>I</sub>** :

- **B<sub>S</sub>** : caractérise la formation de complexes à solubilité limitée.
- **B<sub>I</sub>** : caractérise la formation de complexes insolubles.



**Figure n°8** : Diagrammes de solubilité de phase selon HIGUCHI & CONNORS

L'établissement de ces diagrammes de solubilité permet de calculer à partir de la portion ascendante rectiligne de la courbe, une constante de stabilité apparente  $K_s$  ( $M^{-1}$ ), en se fondant sur l'équation suivante, dans le cas où la stœchiométrie du complexe est 1:1 [62]:

$$K_s = \frac{a}{S_0 (1 - a)}$$

Avec :

**a** : pente de la droite ascendante du diagramme de solubilité.

**S<sub>0</sub>** : solubilité apparente du principe actif dans l'eau (M).

## **2-Méthodes physico-chimiques d'analyse des complexes d'inclusion :**

Les complexes d'inclusion peuvent être isolés lorsqu'ils forment des substances cristallines stables.

De nombreuses techniques d'analyses physico-chimiques, telles que la *spectroscopie IR*, *l'analyse enthalpique différentielle DSC*, *la spectroscopie UV- Visible*, *l'analyse cristallographique RX*, *la spectroscopie RMN*, *la spectrométrie de masse MS...*, permettent de mettre en évidence, de caractériser et de déterminer les constantes d'association de ces complexes [63-67].

Aussi, si la molécule invitée présente un caractère d'intérêt pharmaceutique, et dans le but de prouver son efficacité, deux tests sont nécessaires dans ce domaine, il s'agit des *tests de biodisponibilité in vitro et in vivo*, car ces derniers démontrent, l'efficacité améliorée du complexe d'inclusion obtenu, en milieu biologique simulé et en milieu biologique réel (qu'il soit animal ou humain).

# Chapitre III

## Partie expérimentale

### Préparation des complexes & Méthodes

#### I-Préparation des complexes d'inclusion

##### 1)-Matières premières :

**Le principe actif :** est un anti-inflammatoire non stéroïdien, le piroxicam, disponible au GROUPE SAIDAL, pour la fabrication des produits PRIXAM<sup>®</sup> comprimé dispersible à 20mg et solution injectable.

Donc le choix de cette molécule a été motivé par plusieurs critères :

- Sa disponibilité
- Sa classe thérapeutique, étant l'une des plus utilisées en Algérie
- Sa faible solubilité dans l'eau

- Une perspective de développement d'un générique du CYCLADOL<sup>®</sup> comprimé à 20mg anti-inflammatoire à base du complexe d'inclusion piroxicam- $\beta$ -cyclodextrine.

**La Cyclodextrine :** Le choix du type de cyclodextrine à étudier a été basé sur les informations récoltées par la recherche bibliographique dans les travaux antérieurs consultés. En effet, vu la taille de l' $\alpha$ -CD et de la  $\gamma$ -CD, nous avons choisi la  $\beta$ -cyclodextrine.

Aussi le coût de la  $\beta$ -CD et sa disponibilité sur le marché s'avèrent des critères déterminants pour son utilisation, en effet elle revient beaucoup moins chère que l' $\alpha$ -CDs et  $\gamma$ -CDs.

## **2)-Préparation des complexes d'inclusion :**

Trois types de complexes d'inclusion ont été préparés (avec différents rapports molaires) lors de ce travail pratique.

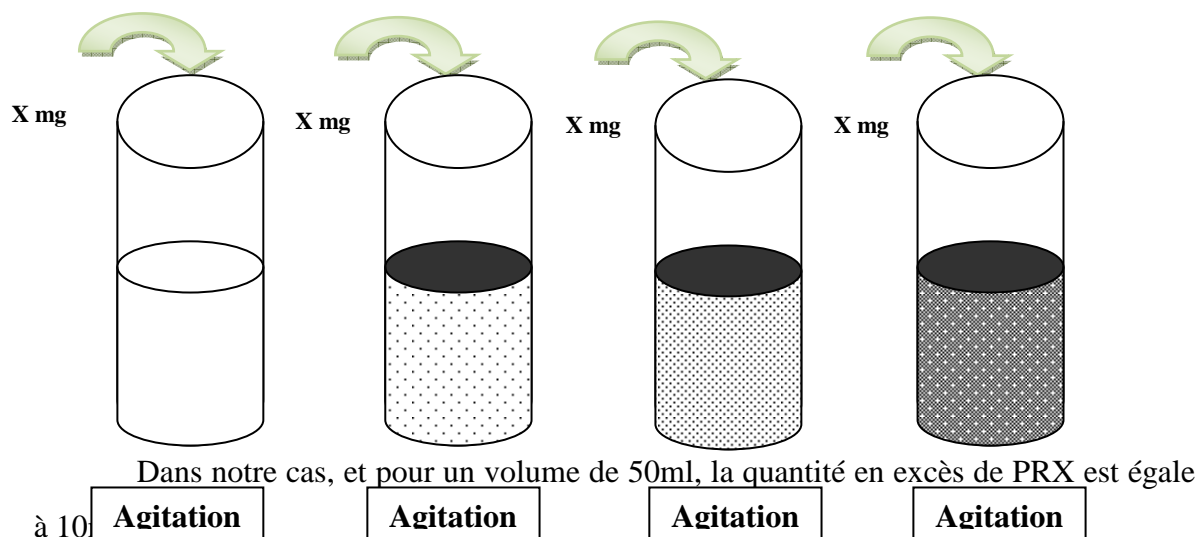
### **▪ Le mélange type filtrat :**

Un excès de PRX est proposé à des solutions aqueuses de  $\beta$ -CD de titres croissants. Après agitation magnétique à 25°C, pendant trois heures, les suspensions sont filtrées et les solutés dosés par spectrophotométrie UV/Vis. Le mélange ainsi préparé sera utilisé pour l'étude de la solubilité du PRX en milieu aqueux.

○ **Détermination de la quantité de PRX en excès :**

La détermination de la quantité de PRX en excès se fait par ajout successif jusqu'à saturation du milieu.

**Schématisation :**



○ **Préparation de la gamme de solutions de  $\beta$ -CD :**

La quantité en excès =  $3 * X$  mg de soluté

1- Préparation d'une solution mère de  $\beta$ -CD à 60mmol dans 50ml d'eau distillée:

On pèse 1.326g de  $\beta$ -CD, on les dissout dans 50ml d'eau distillée.

( $M_r(\beta\text{-CD}) = 1135\text{g/mol}$ )

On réalise les dilutions nécessaires pour obtenir des concentrations de  $\beta$ -CD allant de 0 à 60mmol/l, dans un volume de 50ml.

2- On ajoute ensuite un excès de PRX de 10mg. Les flacons sont mis sous agitation à 25°C, pendant 03 heures pour stabiliser l'équilibre [68,69].

3- Après avoir filtré les solutions, on procède à leur dilution (125 $\mu$ l dans 5ml d'eau distillée), et on procède à un scanning entre 200nm et 400nm pour déterminer les densités optiques des différentes solutions

▪ **Le mélange par malaxage :**

Deux mélanges à différentes proportions en PRX/  $\beta$ -CD sont préparés : 1mole/ 2moles, 1mole/ 3moles.

Mélange	PRX (mg)	$\beta$ -CD (mg)
M1 : 1mole/2moles	331.4	2270
M2 : 1mole/3moles	331.4	3405

La méthode générale de préparation par malaxage suit les étapes suivantes :

- Pré-mélange des poudres,
- Mouillage avec de l'eau purifiée,
- Malaxage à 30°C pendant 60 minutes,
- Séchage en étuve ventilée à 40°C et,
- Calibration sur grille de 0.5mm

Le grain ainsi préparé, est rempli manuellement dans des gélules pour l'étude de sa biodisponibilité in-vitro (test de dissolution).

#### ▪ Le mélange par co-évaporation :

Les complexes d'inclusion en PRX/ $\beta$ -CD avec un rapport molaire 1:1 et 1: 2.5, sont préparés par la méthode de co-évaporation.

Pour préparer un complexe de 1500mg on a :

**\*pour un rapport équimolaire PRX :  $\beta$ -CD (1 :1) :**

$$m_{PRX} + m_{\beta-CD} = 1500 \text{ mg} \leftrightarrow m_{PRX} = 1500\text{mg} - m_{\beta-CD} \quad (\text{I})$$

$$n_{\beta-CD} / n_{PRX} = 1 = (m_{\beta-CD} * M_{PRX}) / (m_{PRX} * M_{\beta-CD}) \quad (\text{II})$$

On remplace (I) dans (II), on obtient :

$$m_{PRX} = 339,07 \text{ mg}$$

$$m_{\beta-CD} = 1160,93 \text{ mg}$$

**\*pour un rapport PRX :  $\beta$ -CD (1 :2,5) :**

$$m_{PRX} = 159,91 \text{ mg}$$

$$m_{\beta-CD} = 1343,09 \text{ mg}$$

Les étapes de préparation sont les suivantes:

- Tamiser les quantités PRX et  $\beta$ -CD ( $m_{\text{PRX}}$ ,  $m_{\beta\text{-CD}}$ ) à travers un tamis de 0,5 mm.
- Dissoudre une quantité  $m_{\beta\text{-CD}}$  dans 10ml de méthanol à l'aide d'un ultrason.
- Ajouter la quantité  $m_{\text{PRX}}$  et mélanger pendant 30 minutes à vitesse moyenne.
- Evaporer à sec tout le méthanol à l'aide d'un courant d'azote.

**Remarque:**

Avant toute manipulation, il est nécessaire de dessécher la poudre obtenue dans l'étuve à 40°C, afin d'éviter toute trace d'eau.

## **II-Méthodes :**

### **1)-Mise au point et validation d'une technique de dosage du PRX en milieu aqueux :**

#### **▪ Réactifs, références et solutions utilisées :**

Piroxicam matière première

Eau distillée

#### **• Appareillage :**

Balance SARTORIUS

Distillateur ROS 700

Spectrophotomètre d'absorption UV-Vis CECIL 9000

#### **▪ Optimisation des conditions opératoires :**

A partir d'une solution concentrée de PRX matière première dans l'eau distillée (environ 1mg/ml), on effectue un scanning UV entre 200nm et 400nm.

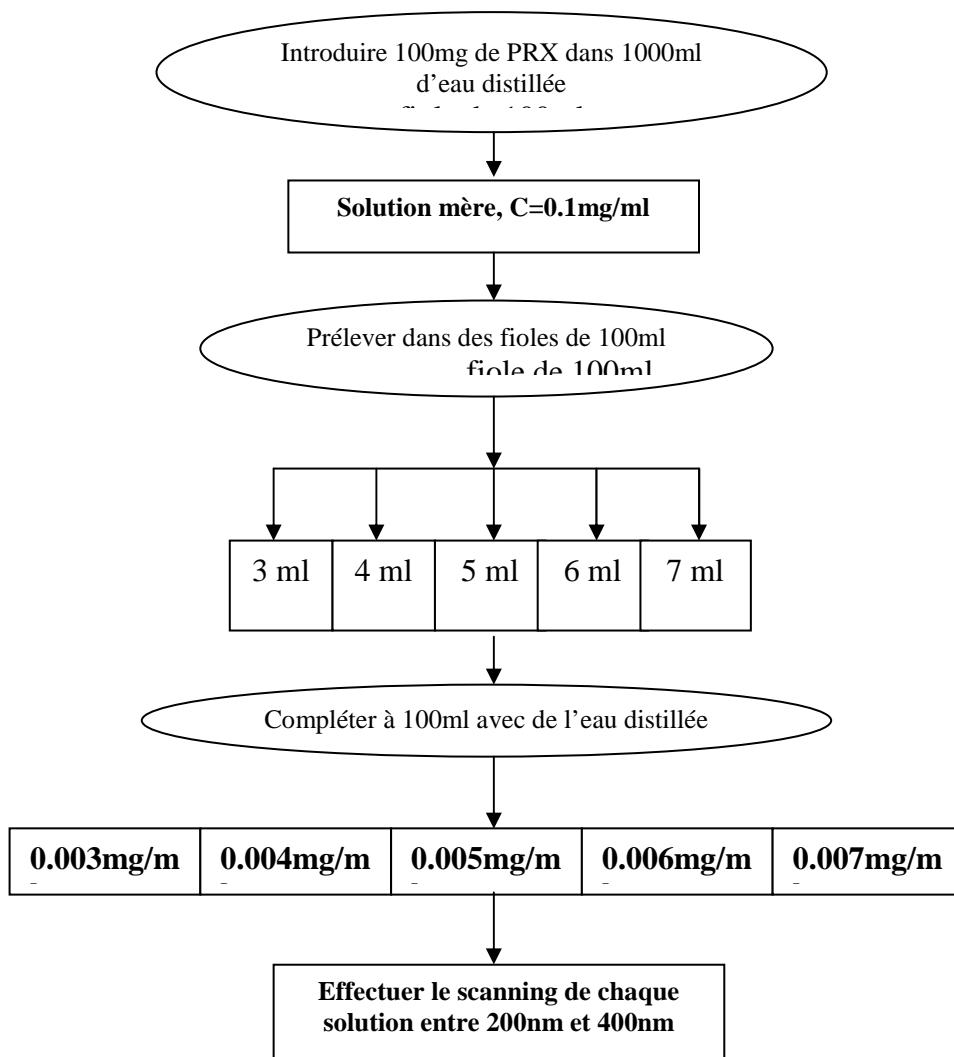
On obtient une densité optique très élevée, la solution à 1mg/ml en PRX est très concentrée, on procède alors à sa dilution jusqu'à obtention d'un maximum d'absorption d'une densité optique se situant entre 0.5 et 0.6.

Après avoir effectué les dilutions nécessaires, on retient une concentration de  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml en PRX qui donne un maximum d'absorption d'environ 0.5.

#### **▪ Préparation de la gamme d'étalonnage :**

La réalisation d'une courbe d'étalonnage pour le dosage du PRX en milieu aqueux est nécessaire, cette dernière sera notre référence pour l'étude de la solubilité du PRX en présence de la  $\beta$ -CD.

Une gamme d'étalonnage a été préparée à différentes concentrations en PRX, allant de 60% à 140%, selon le schéma suivant :



### ▪ Validation de la méthode :

Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue [70].

La validation d'une méthode d'analyse repose sur l'étude de plusieurs paramètres :

- **Sensibilité :** afin de vérifier la sensibilité de la méthode de dosage, une gamme d'étalonnage à différentes concentrations en PRX, allant de 60% à 140% a été préparée. L'étude est répétée sur 03 jours successifs.
- **Répétabilité :** afin de vérifier la répétabilité de la méthode de dosage, l'analyse d'une solution de PRX à  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml en PRX (100%), est analysée 10 fois en un seul jour.

- **Précision** : pour évaluer la reproductibilité de la méthode de dosage, l'analyse d'une solution de PRX à  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml est reproduite sur 03 jours successifs.

## 2)-Etude de la solubilité – Diagramme de solubilité:

### ▪ Principe :

La solubilité des substances hydrophobes, augmente souvent par complexation. Cette technique a été développée par HIGUCHI et CONNORS. Son principe consiste à déterminer la solubilité du PRX en milieux aqueux, et d'étudier son inclusion dans la  $\beta$ -CD.

Pour cela, un excès de PRX a été ajouté à des solutions de  $\beta$ -CD de titres croissants (mélanges type filtrat). La solubilité du PRX en présence de la  $\beta$ -CD, en milieu aqueux est déterminée par la méthode UV/visible, précédemment validée.

On calcule ensuite la concentration en PRX des différentes solutions (filtrats) à partir de la courbe d'étalonnage de la méthode UV/Vis, et ce afin de tracer le diagramme de solubilité.

### ▪ Détermination de la constante d'inclusion :

La constante de stabilité apparente  $K$  de l'inclusion du PRX à la  $\beta$ CD en milieu aqueux, est calculée à partir de la pente de la droite du diagramme de solubilité et de l'intersection de la droite à l'axe des origines  $S_0$ , en utilisant l'équation suivante :

$$K_{PRX:\beta CD} = \text{pente} / S_0 \text{ [mol]} (1 - \text{pente})$$

### **3)-Analyse thermique différentielle (DSC) :**

L'analyse thermique différentielle a été réalisée sur un appareil de type TA INSTRUMENT 2886 [71-72]. Les conditions opératoires utilisées sont les suivants :

- Vitesse de chauffage : 5°C/min.
- Masse des échantillons prélevés: 2-10 mg.
- Echelle de température : 50-250°C.

### **4)-Analyse par diffraction des rayons X (DRX) :**

L'analyse a été réalisée sur un appareil de type SIEMENS. Les diffractogrammes ont été enregistrés pour des valeurs de  $2\theta$  allant de 5° à 35° [73].

### **5)-Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN- <sup>1</sup>H) :**

Les analyses RMN du proton ont été enregistrées sur un appareil BRÜKER (400 MHZ). Les déplacements chimiques sont donnés par rapport à une référence externe, le tetraméthylsilane (TMS) ( $\delta=0\text{ppm}$ ) et le solvant employé est le DMSO-d6 [74].

### **6)-Etude de la biodisponibilité in vitro (test de dissolution) :**

L'évaluation de la biodisponibilité in vitro a été réalisée à l'aide d'un dissolutest type PHARMATEST, composé d'un bain thermostaté à 37°C, dans lequel baignent six réacteurs. Ces récipients sont remplis d'un milieu de dissolution approprié similaire au milieu gastrique, et sont maintenus sous agitation par un système de palettes dans lequel les gélules préparées sont placées.

La vitesse et la durée d'agitation sont normalisées par la pharmacopée américaine USP 30<sup>ème</sup> édition. Ce système est relié à un spectrophotomètre U.V/Visible pour le dosage automatique des concentrations du PRX dissout en fonction du temps [75].

Conditions opératoires :

<b>Appareil</b>	Dissolutest PHARMATEST à panier
<b>Milieu de dissolution</b>	Milieu gastrique simulé (sans pepsin, pH=1,2)
<b>Volume du milieu</b>	900ml
<b>Vitesse de rotation</b>	50tr/min
<b>Température du milieu de dissolution</b>	37°C±0.5 °C
<b>Porosité des filtres</b>	10µm
<b>Débit de la pompe</b>	5ml/min
<b>Cuve optique</b>	10 mm
<b>Longueur d'onde</b>	333nm

Le dosage est effectué par la méthode UV-Vis précédemment validée.

### **7)-Etude comparative de la biodisponibilité in vivo :**

Cette étude a été réalisée par l'administration orale (par gavage gastrique) de deux suspensions à 0,067mg/ml, préparées à partir du complexe d'inclusion C2, obtenu par co-évaporation, et du CYCLADOL® cp à 20mg, à deux lots de 12 rats de race *wistar* femelles, dont le poids moyen est d'environ 200g.

#### **▪ Matériel et réactifs utilisés:**

##### **○ Matériel biologique :**

Rats race *wistar*, Nombre= 24, Sexe : femelle, Poids : (200g-240g),  
Provenance : CRD- Sidal

##### **○ Matériel non biologique :**

- Gaze
- Tubes capillaires
- Tubes héparinés (pour les prélèvements)
- Tubes Ependorff (pour la conservation du sérum)
- Portoirs

○ **Réactifs :**

- Ether
- Eau physiologique

▪ **Préparation des suspensions à 0,067mg/ml :**

La posologie du PRX chez l'adulte est en moyenne de 20mg par prise, si l'on considère que le poids moyen chez un adulte (humain) est de 60 kg, alors on aura une prise équivalente à 0,33mg/Kg.

Or le poids moyen des rats *wistar*, utilisés dans notre expérience, est de 200g, donc la prise est de 0,067mg/rat= 0,067mg/ml ingéré.

C'est sur cette base que nous avons préparé les suspensions à base du C2 et du CYCLADOL<sup>®</sup> cp, à une concentration de 0,067mg/ml dans de l'eau physiologique.

▪ **Méthode :**

- Mise à jeun des animaux la veille du test.
- Administration à t<sub>0</sub>, par gavage gastrique des suspensions préparées.
- Réalisation des prélèvements veineux par ponction du sinus rétro- orbitaire après une légère anesthésie à l'éther, aux différents temps suivants :
  - Première heure = 15', 30', 45', 60'
  - Deuxième heure = 75', 90', 120'
  - Troisième heure = 150', 180'
  - Quatrième heure = 210', 240'
  - Sixième heure
  - Vingt quatre heures

▪ **Protocole de prélèvement :**

- Répartir les animaux (24) en deux lots et procéder à leur codification ;
- Chaque lot de (12) est réparti en sous-lot ;
- Marquer les animaux de chaque lot selon la codification suivante :  
 [Lot n° 1 = PC, correspondent au Complexe d'inclusion 2, lot n° 2 : CY, correspondent au CYCLADOL®].

**Tableau n°III :** Codification des animaux

Temps de prélèvement	Lot 1 : essai PC		Lot 2 : essai CY	
	Sous-lot 1/ n° prélèvement	Sous-lot 1'/ n° prélèvement	Sous-lot 2/ n° prélèvement	Sous-lot 2'/ n° prélèvement
0	PC1/1	PC1*/1	CY1/1	CY1*/1
15	PC2/1	PC2*/1	CY2/1	CY2*/1
30	PC3/1	PC3*/1	CY3/1	CY3*/1
45	PC4/1	PC4*/1	CY4/1	CY4*/1
60	PC5/1	PC5*/1	CY5/1	CY5*/1
75	PC6/1	PC6*/1	CY6/1	CY6*/1
90	PC1/2	PC1*/2	CY1/2	CY1*/2
120	PC2/2	PC2*/2	CY2/2	CY2*/2
150	PC3/2	PC3*/2	CY3/2	CY3*/2
180	PC4/2	PC4*/2	CY4/2	CY4*/2
210	PC5/2	PC5*/2	CY5/2	CY5*/2
240	PC6/2	PC6*/2	CY6/2	CY6*/2
6h	PC1/3	PC1*/3	CY1/3	CY1*/3
24h	PC2/3	PC2*/3	CY1/3	CY1*/3

Légende de la codification :

- **PC1/1** : PC1= C2 sous lot 1, 1= rat n°1/ 1= premier prélèvement
- **PC1\*/1** : PC1\*= C2 sous lot 2, 1=rat n°1/1= premier prélèvement
- **CY2\*/2** : CY2\*= CYCLADOL® sous lot 2, rat n°2/2= deuxième prélèvement.....

Après centrifugation des prélèvements sanguins, le sérum récupéré est préservé dans le congélateur à -20°C. Ces derniers sont décongelés avant extraction et analyse par HPLC.

▪ **Méthode chromatographique :**

○ **Réactifs et solvants et autres produits utilisés:**

- CYCLADOL® cp à 20mg
- Piroxicam
- Naproxen
- Methanol grade HPLC
- Acetonitrile grade HPLC
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0.04 mole/l (SIGMA-ALDRITCH).
- Acide ortho phosphorique à 10% (SIGMA-ALDRITCH).

○ **Appareillage :**

Le matériel chromatographique utilisé est constitué de :

- Une pompe Jasco PU-980 (intelligent HPLC pump).
- Un dégazeur waters IN-LINE degasser.
- Un injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20  $\mu\text{l}$ .
- Un détecteur Waters 2487 (Dual absorbance detector) couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM<sup>32</sup>

▪ **Conditions chromatographiques :**

Afin de réaliser cette étape nous nous sommes basé sur une méthode chromatographique publiée [76], pour son application nous avons réalisé quelques ajustements. Le Naproxen (NPX) est utilisé comme étalon interne.

<b>Conditions chromatographiques</b>	
<b>Colonne</b>	Colonne HPLC type waters Spherisorb reversed-phase (C18) 250x 4,6mm, 5µm
<b>Phase mobile</b>	Acétonitrile - Méthanol-0.04 mol L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 40 :10 :50 (V/V), le pH est ajusté à 3.8 en ajoutant de l'acide ortho phosphorique à 10%
<b>Longueur d'onde</b>	330nm
<b>Débit</b>	1 ml/mn
<b>Etalon interne</b>	Naproxen
<b>Volume injecté</b>	20µl

▪ **Courbes d'étalonnage :**

La réalisation d'une courbe d'étalonnage pour le dosage du PRX est nécessaire, cette dernière sera notre référence pour l'évaluation des concentrations plasmatiques.

○ **Courbe d'étalonnage sans sérum :**

- **Préparation des solutions standards et gamme d'étalonnage:**

Afin de préparer une gamme d'étalonnage standard en PRX allant de 0,01 µg/ml à 5µg/ml, avec une concentration d'étalon interne maintenue constante à 2µg/ml, nous avons procédé comme suite :

- **Préparation des solutions mères:**

- Solution mère PRX= 10mg de PRX dans 10ml de phase mobile, C=1000µg/ml
- Solution mère NPX= 10mg de NPX dans 10ml de phase mobile, C=1000µg/ml
- Solution fille : SF NPX= 100µg/ml
- Solution fille 1 : SF1 PRX= 100µg/ml
- Solution fille 2 : SF2 PRX= 10µg/ml
- Solution fille 3 : SF3 PRX= 1µg/ml

- **Préparation de la gamme d'étalonnage :**

**Tableau n°IV :** Gamme d'étalonnage sans sérum

	<b>C (µg/ml)</b>	<b>V PRX (µl)</b>	<b>V NPX (µl)</b>	<b>V phase mobile (µl)</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>930</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>2.5</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>955</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>2</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>960</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>1.5</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>965</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>970</b>
<b>SF2 PRX/SF NPX</b>	<b>0.5</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>930</b>
<b>SF3 PRX/SF NPX</b>	<b>0.05</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>930</b>
<b>SF3 PRX/SF NPX</b>	<b>0.025</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>955</b>
<b>SF3 PRX/SF NPX</b>	<b>0.01</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>970</b>

La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant le rapport de surface PRX/NPX en fonction de la concentration en µg/ml.

o **Courbe d'étalonnage avec sérum :**

- **Protocole d'extraction :**

L'extraction du PRX à partir du sérum a été effectuée par défécation, et ce en ajoutant à chaque tube :

- 1ml de d'acétonitrile - méthanol (3 :1)
- 1mg de ZnSO<sub>4</sub>
- 1mg de MgSO<sub>4</sub>

La préparation de la gamme d'étalonnage se fait de la même façon que précédemment, les volumes de PRX et de NPX sont ajoutés à différents volumes de sérum blanc (humain).

La gamme d'étalonnage sérum chargé est comprise entre 0,025 µg/ml et 5µg/ml, la concentration de l'étalon interne est maintenue à 2µg/ml.

**Tableau n°V :** Gamme d'étalonnage avec sérum

	<b>C (µg/ml)</b>	<b>V PRX (µl)</b>	<b>V NPX (µl)</b>	<b>V sérum (µl)</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>930</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>2.5</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>955</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>2</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>960</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>1.5</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>965</b>
<b>SF1 PRX/SF NPX</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>970</b>
<b>SF2 PRX/SF NPX</b>	<b>0.5</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>930</b>
<b>SF3 PRX/SF NPX</b>	<b>0.05</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>930</b>
<b>SF3 PRX/SF NPX</b>	<b>0.025</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>955</b>

La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant le rapport de surface PRX/NPX en fonction de la concentration en µg/ml.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1]: **DUCHENE D., DEBRUERE B., BRETILLON A.**, Les cyclodextrines: nature, origine et intérêt en pharmacie galénique, *Labo. Pharma.* 32 (348), 842.850, **1984**
- [2]: **CRAMER F., HETTLER H.**, Inclusion compounds of cyclodextrins, *Die Naturwissenschaften* 54 (24), 625.632, **1967**
- [3]: **NAÏMA ZERROUK, ALAIN TOMAS, DAN BENHAMMOU, JEAN-CLAUDE CHAUMEIL**, *Médecine thérapeutique.* Volume 6, Number 5, 384-92, Mai **2000**
- [4]: **BREVET D'INVENTION RÉF. WO 2008/107569 20080912**, Complexes d'inclusion de cystéine, leur préparation et les compositions les contenant. **2008**
- [5]: **JOZSEF SZEJTLI**, Past, present, and future of cyclodextrin research, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 76, No. 10, pp. 1825–1845, **2004**
- [6]: **ABDULILAH DAWOUD BANI-YASEEN, NATHIR F. AL-RAWASHDEH AND IDREES AL-MOMANI**, Influence of inclusion complexation with  $\beta$ -cyclodextrin on the photostability of selected imidazoline-derived drugs, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, volume 63, Numbers 1-2, pp 109-115. **2008**
- [7]: **MARCUS E. BREWSTER, THORSTEINN LOFTSSON**, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 645–666. **2007**
- [8]: **DUCHENE D., VAUTION C., GLOMOT F.** La biodisponibilité des principes actifs par inclusion dans les cyclodextrines. *STP Pharma* 1 : 323-332. **1985**
- [9]: **NAMBU N., SHIMODA M., TAKAHASHI Y., UEDA I.L., NAGAI T.** Bioavailability of powdered inclusion compounds of nonsteroidal antiinflammatory drugs with beta cyclodextrin in rabbits and dogs. *Chem Pharm Bull* 26 : 2952-2956. **1978**
- [10]: **VILLIERS A.**, *c. r. acad. sci.*, 112, 536, **1891**
- [11]: **SCHARDINGER F.**, *Wien. klin. wochschr.*, 17, 207. **1904**
- [12]: **SCHARDINGER F.**, *Zentralbl. bakteriol. parasitenkd.*, 14, 772. **1905**
- [13]: **SCHARDINGER F.**, *Zentralbl. bakteriol. parasitenkd.*, 29, 188. **1911**
- [14]: **PRIGSHEIM H.**, *Chemistry of the saccharides*, McGraw-Hill : New-York, p 280. **1932**
- [15]: **PRIGSHEIM H.**, *A Comprehensive Survey of Starch Chemistry*, Walton R. P., Ed., Chemical Catalogue Co., Inc. : New York, NY, p 35. **1928**

- [16]: FREUDENBERG K., BLOMQUIST G., EWALD L., SOFF K., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 69, 1258. 1936
- [17]: FREUDENBERG K., CRAMER F., *Z. NATURFORSCH.*, 3b, 464. 1948
- [18]: CRAMER F., *Einschlussverbindungen (Inclusion compounds)*, Springer-Verlag : Berlin, 1954.
- [19]: FREUDENBERG K., CRAMER F., PLIENINGER H., German Patent 895769, 1953
- [20]: *Cyclodextrin News*, 17 (4). 2003
- [21]: SAENGER W., JACOB J., GESSLER K., STEINER T., HOFFMANN D., SANBE H., KOIZUMI K., SMITH S. M., TAKAHA T., *Chem. Rev.*, 98 (5), 1787-1802. 1998
- [22]: HARATA K., *Chem. Rev.*, 98 (5), 1803-1828. 1998
- [23]: H. KHALIL, Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols: Solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines», Thèse de doctorat (Ecole doctorale: Chimie de Lyon), 2004
- [24]: J. PITHA, Cyclodextrin Derivatives with Enhanced Solubility Power and Lower Toxicity, Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins (Ed. L. J. J. Torres), May 31–June 3, Santiago de Compostela, Spain, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 210–215. 1998
- [25]: JÓZSEF SZEJTLI, Past, present, and future of cyclodextrin in research, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 76, No. 10, pp. 1825–1845, 2004
- [26]: UEKAMA K., HIRAYAMA F., IRIE T., Cyclodextrin drug carrier system., *Chem. Rev.*, 98(5), 2045-2076, 1998
- [27]: DUCHENE D., Cyclodextrins and their industrial uses, Editions de Santé: Paris, p 448. 1987
- [28]: DUCHENE D., New trends in cyclodextrins and derivatives, Editions de Santé: Paris, p 635. 1991
- [29]: RAJEWSKI R. A., STELLA V. J., *J. Pharm. Sci.*, 85(11), 1142-1159, 1996
- [30]: FRÖMING K.-H., SZEJTLI J., Cyclodextrins in pharmacy, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, p 224, 1994
- [31]: HEDGES A. R., *Chem. Rev.*, 98(5), 2035-2044, 1998
- [32]: HASHIMOTO H., *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 44(1-4), 57-62, 2002
- [33]: PETERSSON P., REESE S.L., YI G., YUN H., MALIK A., BRADSHAW J.S., ROSSITER B.E., LEE M.L., MARKIDES K.E., *J. Chromatogr. A.*, 684, 297-309, 1994
- [34]: SCHURIG V., NOWOTNY H-P., *ANGEW. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29, 939-957, 1990
- [35]: TAKAHASHI K., *Chem. Rev.*, 98(5), 2013-2034, 1998

- [36]: KUNISHIMA K., YOSHIMURA K., MORIGAKI H., KAWAMATA R., TERAO K., TANI S., *J. Am. Chem.Soc.*, 123, 10760, **2001**
- [37]: MOTHERWELL W. B., BINGHAM M. J., SIX Y., *Tetrahedron*, 57, 4663, **2001**
- [38]: BRESLOW R., ZHANG B., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5882-5883, **1992**
- [39]: ZHANG B., BRESLOW R., *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 1676-1681, **1997**
- [40]: BRESLOW R., DONG S. D., *Chem. Rev.*, 98(5), 1997-2012, **1998**
- [41]: SZEJTLI J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers : Dordrecht, p 450, **1988**
- [42]: ATWOOD J. L., LEHN J.-M., *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Eds, vol. 3, *Cyclodextrins*, SZEJTLI J., OSA T., Eds., Pergamon : Oxford, U.K., p 693, **1996**
- [43]: ALLAIN H., BEZIER A., LABLACHE-COMBIR B., prévention secondaire des pathologies athérombotique: à quelle dose prescrire l'aspirine, la lettre du pharmacologue ; 7 : 35-38. **1993**
- [44]: MENARD G., ALLAIN H., LE ROCHO S., MOREL G., BENETON C., Enquête d'un jour en officine sur la consommation d'antalgiques et d'antipyrétiques ; thérapie 1993 ; 48 : 263-267. **1993**
- [45]: VIDAL **2009**
- [46]: PHARMACOPEE EUROPEENNE **2009**
- [47]: CRAMER F., *Chem. Ber.*, 84, 851-854. **1951**
- [48]: WENZ G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 803-822. **1994**
- [49]: MÁR MÁSSON, BIRNA VIGDÍS SIGURDARDOTTIR, KRISTJÁN MATIHIASSON, AND THORSTEINN LOFTSSON, Investigation of Drug–Cyclodextrin Complexes by a Phase-Distribution Method: Some Theoretical and Practical Considerations, Faculty of Pharmacy, University of Iceland; Hofsvallagata, 53, IS-107 Reykjavík, Iceland. **2005**
- [50]: TASNEEM REHANA, S. RAMAKRISHNA, K. P. R. CHOWDARY, AND PRAKASH V. DIWAN1,  $\beta$ -Cyclodextrin Complexes of Celecoxib: Molecular-Modeling, characterization, and Dissolution Studies Submitted: Narender Reddy, **2004**
- [51]: SHYAM SHIMPI, BHASKAR CHAUHAN, PRAJAKTA SHIMPI, *Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration». Acta Pharm.* 55, 139–156. **2005**
- [52]: LAURA RIBEIRO, THORSTEINN LOFTSON AND DOMINGOS FERREIRA, Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine\_sulfobutyl ether  $\beta$ -Cyclodextrin binary and ternary complexes», pharmaceutical technology, faculty of pharmacy, university of porto; Porto, Portugal. **2003**

- [53]: MARIA LETIZIA MANCA, MARCO ZARU, GUIDO ENNAS AND ANNA MARIA FADDA**, Diclofenac- $\beta$ -Cyclodextrin Binary Systems: Physicochemical Characterization and In Vitro Dissolution and Diffusion Studies, Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università di Cagliari, Italy. Università di Cagliari, Monserrato (CA), Italy. **2005**.
- [54]: THORSTEINN LOFTSSON, MARCUS E. BREWSTER AND MÀR MÀSSON**, Role of Cyclodextrins in Improving Oral Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Iceland, Reykjavik, Iceland. Department of Pharmaceutical Sciences, Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, Beerse, Belgium. **2004**
- [55]: M. J. ARIAS, J. R. MOYANO, P. MUNOZ**, Study of Omeprazol- $\gamma$ -cyclodextrin Complexation in the solide state, 26(3), 253-259. **2000**
- [56]: GUL MAJID KHAN, FARMANULLAH WAZIR AND JIA-BI ZHU. GUL MAJID KHAN**, Ibuprofen-cyclodextrin Inclusion Complexes: Evaluation of Different Complexation Methods, Department of Pharmaceutics, Gomal University, Dera Ismail Khan, NWFP, Pakistan. The Sciences 1 (4): 193-199. July - August, **2001**
- [57]: SANJULA BABOOTA, MONA DHALIWAL, AND KANCHAN KOHLI**, Physicochemical Characterization, In Vitro Dissolution Behavior, and Pharmacodynamic Studies of Rofecoxib-cyclodextrin Inclusion Compounds. Preparation and Properties of Rofecoxib Hydroxypropyl b-cyclodextrin Inclusion Complex : Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard, (Hamdard University), New Delhi-110062, India. **2005**
- [58]: SHYAM SHIMPI, BHASKAR CHAUHAN, PRAJAKTA SHIMPI** «Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration». Acta Pharm. 55, 139–156. **2005**
- [59]: S. WEISSE**, «Complexes cyclodextrine/esters de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée», Thèse de doctorat (Université Paris XI), **2002**
- [60]: HIGUCHI T, CONNORS KA**. Phase solubility diagram. Adv Anal Chem Instrum.; 4:117-212. **1965**
- [61]: RAJESWARI CHALLA, ALKA AHUJA.**, Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review, n°43, Department of Pharmaceutics, Hamdard, University, New Delhi 110062, India. **2005**
- [62]: P. BONNET**, Etude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrines et de leurs complexes d'inclusion», Thèse de doctorat (Université Orleans), **2001**
- [63]: SCHNEIDER H.-J., HACKET F., RÜDIGER V., IKEDA H.**, *Chem. Rev.*, 98 (5), 1755-1786. **1998**

- [64]: REKHARSKY M. V., INOUE Y., *Chem. Rev.*, 98 (5), 1875-1918. **1998**
- [65]: SZENTE L., *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, ATWOOD J.L., DAVIES J.E.D., MACNICOL D.D., VÖGTLE F., LEHN J.-M., EDS., vol. 3, *Cyclodextrins*, chap. 8, Pergamon : Oxford, U.K., 253-278. **1996**
- [66]: TSUKUBE H., FURUTA H., ODANI A., TAKEDA Y., KUDO Y., INOUE Y., LIU Y., SAKAMOTO H., KIMURA K., *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., Vögtle F., Lehn J.-M., Eds., vol. 8, *Physical methods in supramolecular chemistry*, chap. 10, Pergamon : Oxford, U.K., 425-482. **1996**
- [67]: CONNORS K.A., *Chem. Rev.* 97, 1325-1357. **1997**
- [68]: HAMADA Y., NAMBU N., NAGANI T., Interactions of  $\alpha$ - and  $\beta$  cyclodextrine with several non steroidal anti-inflammatory drugs in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull*, 23, 1205-1211, **1975**
- [69]: KUROZOMI Y., NAMBU N., NAGANI T., Inclusion compounds of non steroidal anti inflammatory and other slightly water-soluble drugs with  $\alpha$  and  $\beta$  cyclodextrine in powdered form, *Chem Pharm. Bull*, 23, 3062-3068, **1975**
- [70]: ICH Q2B: Validation of analytical procedures methodology. **1997**
- [71]: THIERRY VAN HEES\*, GERALDINE PIEL, SANDRINE HENRY DE HASSONVILLE, BRIGITTE EVRARD, LUC DELATTRE, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 347–353. **2002**
- [72]: E. REDENTI, T. PEVERI, M. ZANOL, P. VENTURA, G. GNAPPI, A. MONTENERO, A Study on the differentiation between amorphous piroxicam: $\beta$ -cyclodextrin complex and a mixture of the two amorphous components, *Int. J. Pharm.* 129 289– 294. **1996**
- [73]: GUO XILIANG, YANG YU, ZHAO GUOYAN, ZHANG GUOMEI, CHAO JIANBIN, SHUANG SHAOMIN, Study on inclusion interaction of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives, *Spectrochimica Acta Part A* 59, 3379\_ 3386. **2003**
- [74]: FRONZA G. ; MELE A. ; REDENTI E. ; VNETURA P., Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the inclusion complex of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin, *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 81, n°12, pp. 1162-1165. **1992**

**[75]: MARTIAL SAUCEAU\*, ELISABETH RODIER, JACQUES FAGES, Preparation**

of inclusion complex of piroxicam with cyclodextrin by using supercritical carbon dioxide, J. of Supercritical Fluids 47, 326–332. **2008**

**[76]: SAVASER A., KARATAS A., OZKAN Y., YUKSEL N., OZKAN S.A, BAYKARA T., Validated LC Determination of the piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in tablets and in human plasma, chromatographia, 59, 555-560; **2004****

**[77]: CASTILLO, J.A., PALOMO-CANALES, J., GARCIA, J.J., LASTRES, J.L., BOLAS, F. AND TORRADO, J.J., Preparation and characterization of albendazole  $\beta$ -cyclodextrin complexes. Drug Dev. Ind. Pharm. 25: 1241-1248. **1999****

**[78]: GRACIELA M. ESCANDAR, Spectrofluorimetric determination of piroxicam in the presence and absence of  $\beta$ -cyclodextrin, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina, **1999****

**[79]: BREVET: (WO/2005/097201) complexes d'inclusions comprenant du piroxicam, une cyclodextrine et l'arginine, **2005****

**[80]: Urgences pratiques, n°66, rubrique pharmacologie, BREXIN® piroxicam bêta-cyclodextrine (DCI) “de la douleur à la sédation“. **2006****

