Etude de la cristallisation d'une nouvelle molécule à efficacité cardiotonique dans un mélange liquide ionique - eau

Jacqueline Resende de Azevedo

▶ **To cite this version:**

Jacqueline Resende de Azevedo. Etude de la cristallisation d'une nouvelle molécule à efficacité cardiotonique dans un mélange liquide ionique - eau. Génie des procédés. Ecole des Mines d'Albi-Carmaux, 2014. Français. NNT : 2014EMAC0009 . tel-01175807

HAL Id: tel-01175807
https://theses.hal.science/tel-01175807

Submitted on 13 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

École Nationale Supérieure des Mines d'Albi-Carmaux conjointement avec l'INP Toulouse

---

Présentée et soutenue par :
Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO
le mardi 25 mars 2014

Titre :

Étude de la cristallisation d'une nouvelle molécule à efficacité cardiotonique dans un mélange liquide ionique - eau

---

École doctorale et discipline ou spécialité :
ED MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement

Unité de recherche :
Rapsodee, CNRS - UMR 5302, École des Mines d'Albi-Carmaux

Directeur(s) de Thèse :
Maria Inês RÉ
Fabienne ESPITALIER

Jury :
Gilles PONCHEL, Professeur, Faculté Pharmacie Paris-Sud, Châtenay-Malabry, Président
Fatima FARELO, Professeur, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, Rapporteur
Marc DESCAMPS, Professeur, Université Lille 1, Rapporteur
Jean-Christophe PLAQUEVENT, Directeur de Recherche CNRS, UPS, Toulouse, Examinateur
Jean-Jacques LETOURNEAU, Maître-Assistant, École des Mines d'Albi-Carmaux, Invité
Fabienne ESPITALIER, Professeur, École des Mines d'Albi-Carmaux, Co-Directeur
Maria Inês RÉ, Directeur de Recherche, École des Mines d'Albi-Carmaux, Directeur

à ma famille qui a toujours cru en moi, a soutenu mes rêves et m'a donné la force de faire face aux défis de la vie.

Remerciements

Tout d’abord, je remercie l'École des Mines d'Albi-Carmaux, et le directeur du centre RAPSODEE, Ange Nzihou, de m’avoir permis de réaliser cette thèse. J’adresse mes remerciements également au Conseil National pour le Développement Scientifique et Technologique/CNPq du Ministère de la Science et Technologie du Brésil pour le financement d’une bourse d'étude du programme "Doutorado Pleno Exterior (GDE)". Je tiens ensuite à remercier l'industrie pharmaceutique Cristália (Brésil) qui a fourni la molécule, l’objet d'étude.

Je souhaiterais remercier également Monsieur Marc Descamps et Madame Fatima Farelo, qui m’ont fait l’honneur d’être les rapporteurs de ma thèse. Ensuite, je remercie Messieurs Jean-Christophe Plaquevent et Gilles Ponchel, membres du jury. Merci pour la discussion très intéressante et constructive et pour les nouvelles pistes de recherche que vous m’avez données.

Mes plus vifs remerciements vont à mes directrices de thèse, Maria Inês Ré et Fabienne Espitalier, par l'orientation scientifique, le soutien, la patience et les conseils dans les moments les plus difficiles. Je remercie Maria Inês pour la confiance qu’elle m’a accordée dès le début et pour toutes les réflexions qu’elle m’a suscitées sur la complexité de mon travail lors de chaque discussion. Cela m'a toujours motivé pour travailler plus. Je remercie Fabienne aussi pour m'avoir aidé à comprendre les "secrets de la cristallisation" et pour tous les calculs et les bilans de matières. Je remercie également Jean-Jacques Letourneau qui appartient à cette équipe. Vos encadrements et vos compétences ont été absolument indispensables à mon travail.

Je voudrais remercier l’ensemble du personnel du centre RAPSODEE pour l'accueil, le soutien scientifique et technique. Je vous remercie aussi pour tous les bons moments passés à la salle de café, pour les cours de français et pour avoir accepté d'être mes "cobayes" lors de mes expériences comme pâtissière (gâteaux à la goyave, fruit de la passion, banane…). Je souhaite remercier plus particulièrement les techniciens et ingénieurs pour les centaines d'analyses de taille, d’angle de contact, de DSC, de MEB, de DRX, de BET, de chromatographie ionique, notamment Philippe, Séverine, Sylvie, Christine, Véronique,

Nathalie, Céline, Jean-Marie, et encore ceux qui m'ont aidé dans mes montages expérimentaux, Bruno et Laurent. Je remercie également Coralie (stagiaire) qui a beaucoup travaillé avec moi pendant quelques mois. Un grand merci aussi à Rachel, Laurence et Elsa. J'adresse mes remerciements également aux secrétaires qui m'ont aidé dans les papiers administratifs et aussi pour leur gentillesse : Anne-Marie, Valérie, et Chrystel.

Je ne peux évidemment pas oublier de remercier les doctorants, les post-doctorants et les stagiaires avec qui j'ai partagé ma vie pendant ces dernières années : Claire M., Audrey, Marie, Analice, Wellington, Zhoé, William, Graciela, Fredj, Camille, Fanny, Tassadite, Claire G., Sarah, Suênia, Nayane, Andrea, Zênia, Paulo, Bruna, Aline, Moussa, Raffaelle, Ludovic, Renaud, Christophe, Marta, Maxime, Anaïs, Julia, Graziela, Ariane, Lucia, Léonard, et Haithem. Grand merci pour tous les bons moments au laboratoire et pour toutes les soirées !

Merci à toute ma famille, mes parents, Terezinha et Héraclito, mes grands-parents, Antônio et Maria Helena et Geraldina, Davina et Pedro (*in memoriam*), mes frères, Héraclito Filho et Diego, et ma sœur, Davina, pour leur soutien tout au long de ma thèse, pour m'avoir donné l'amour même de très loin, pour supporter la distance et la "saudade" pour me voir réaliser un rêve. Cette victoire est à vous ! Un grand merci également à mes belles-sœurs Manuela et Lara pour vos encouragements. A mon petit neveu Felipe Joaquim qui a amené la joie dans toute la famille et m'a donné le plaisir d'être tatie juste après ma thèse. A mes cousines Alynne, Lívia, Prycilla et Carla pour votre écoute et pour les moments de détente au téléphone. A mes oncles, Helder et Edizio, et tantes, Luciana et Ana, pour votre présence à ma soutenance. A mes amies brésiliennes qui ont toujours pensé à moi pour que je réussisse : Roberta, Valesca, Graziela, Elis, Michele, Luciana, Aline, Raquel, Dani, Rosangela, Amanda, Rogéria et Ana Amélia.

J'aimerais également remercier Benjamin d'être là pour moi, même de très loin ; il ne m'a jamais laissé seule. Merci pour ton amour, ta patience, tes encouragements et ton soutien. Merci aussi aux familles Faramond et Roëls pour votre gentillesse et pour m'avoir reçu comme un membre de votre famille.

Je termine cette longue liste en remerciant mes amies "franco-latine". Les françaises Marie, Audrey et Claire pour votre bonne humeur, votre amitié et pour les soirées bien remplies de gourmandises. A Marie et Fanny pour l'ambiance agréable dans notre bureau. A Graciela, William et Tânia pour m'avoir fait découvrir un peu le Chili, merci pour votre

amitié. A mes amis brésiliens : Suênia qui a toujours était à mon coté, parfois comme une mère, d'autres fois comme une sœur, ou collègue de travail avec qui j'ai pu discuté de mes essais et de mes problèmes de thèse. A Nayane qui a vécu la phase de rédaction en même temps que moi, avec qui j'ai pu partager mes inquiétudes et mes réussites, et qui m'a donné chaque jour beaucoup de force et de motivation. A Andrea, Paulo, Bruna et Zênia pour tous les bons moments, pour leurs conseils et pour leurs sourires. Merci à tous pour être une famille ici pour moi.

Après ces remerciements, je voulais laisser un message pour ceux qui font une thèse ou qui pensent en faire une un jour. Faire une thèse c'est comme produire un très bon gâteau. D'une part, comme pour ce dernier, une bonne thèse a besoin d'ingrédients de qualité tels que : quelques tonnes d'étude et de travail, des kilos de courage et de patience, plusieurs jours d'essais, des heures sans dormir, des sacrifices et enfin, des pensées positives pour ne jamais lâcher. D'autre part, elle nous apprend à fêter et vibrer pour de très petites réussites, comme quand nous arrivons à séparer le jaune du blanc de l'œuf. Le bonheur nous arrive à chaque essai réalisé, à chaque cristal produit, à chaque fois que nous goûtons le plaisir de voir les connaissances scientifiques sortir du papier, et c'est là que les moments sont les plus passionnants et les plus motivants. L'arrivée de ce manuscrit, que vous êtes en train de lire, est comme voir la cerise sur le gâteau. Il est le symbole de cette conquête, la concrétisation d'un rêve. Ainsi, si comme pour moi, faire une thèse est un rêve pour vous, allez-y à fond, faîtes le nécessaire parce qu'à la fin tout vos efforts seront récompensés.

Merci à tous !

Résumé : Etude de la cristallisation d'une nouvelle molécule à efficacité cardiotonique dans un mélange liquide ionique-eau

La cristallisation par effet anti-solvant, comme technique de production de micro/nanoparticules, présente certains inconvénients. En effet, pour des molécules nouvellement synthétisées ou découvertes, comme le LASSBio-294, les solubilités dans l'eau et dans les solvants organiques sont faibles ce qui limite l'application de cette opération. L'utilisation de solvants alternatifs ouvre de nouvelles perspectives de recristallisation de ce type de molécules. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la cristallisation du LASSBio-294 en utilisant un liquide ionique comme solvant. Ce sont des sels organiques fondus à température ambiante, qui ont la particularité d'avoir une tension de vapeur nulle. Ils constituent une nouvelle classe de solvants non volatiles et ininflammables qui présentent des propriétés originales. Dans un premier temps, des liquides ioniques (LIs) dérivés du cation imidazolium ont été utilisés comme solvant alternatif. La solubilité a été mesurée dans 5 LIs, dans l'eau et dans des mélanges eau/LI. Dans l'eau pure la solubilité est très faible (5 ppm). En revanche, dans certains LIs, elle est supérieure à 200 mg/g solution. Les résultats de solubilité dans des mélanges eau/LI ont permis de choisir le rapport eau/LI pour l'obtention d'un bon rendement en solide. En complément, une étude de la stabilité du solide en suspension a été menée dans différents systèmes aqueux. Cette étude a montré sa possible hydrolyse. Dans un deuxième temps, la recristallisation a été réalisée avec le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthyl phosphonate [emim][$CH_3O(H)PO_2$] comme solvant et l'eau comme anti-solvant. Deux approches sont présentées en vue de favoriser le mélange : l'utilisation de dispositifs de mélange et l'introduction des ultrasons pendant le processus de cristallisation. L'influence de paramètres tels que le rapport anti-solvant/solvant, la concentration initiale et la présence d'additifs a été étudiée. Les solides formés puis séchés en étuve ont été caractérisés par granulométrie laser, microscopie électronique à balayage, diffractométrie de rayons X, calorimétrie différentielle à balayage et test de dissolution. Malgré une diminution de la taille des particules élémentaires, l'état d'agglomération des cristaux obtenus n'a pas permis une augmentation de la vitesse de dissolution. En modifiant le mode de séchage (séchage par atomisation), cette agglomération est réduite et la dissolution améliorée. De plus, la présence d'un polymère entérique en solution lors du séchage par atomisation des cristaux synthétisés a eu un effet notable sur la structure des agglomérats formés. Ces derniers peuvent se désagréger, se disperser et se dissoudre rapidement.

Mots clés : Molécule hydrophobe, Cristallisation, Liquide ionique, Solubilité, Atomisation

Abstract : Crystallization study of a new cardiotonic drug in an ionic liquid-water mixture

The anti-solvent crystallization allows obtaining micro/nanoparticles, but it presents some disadvantages. In the case of new pharmaceutical molecules, as the LASSBio-294, the solubility in water or organic solvents is very low limiting the application of this operation. The use of Ionic Liquids (ILs) as alternative solvents opens new perspectives in pharmaceutical processing through anti-solvent crystallization process. Unlike conventional solvents, ILs are entirely composed of ions. ILs are organic salts, usually liquid at room temperature, and which are composed of a relatively large asymmetric organic cation and of an inorganic or organic anion. ILs derived from imidazolium cation are used as alternative solvents for this drug, water being used as anti-solvent. First, the solubility is measured in 5 ILs, in water and in water/IL mixtures. In pure water, the solubility is very low (5 ppm). However, for some ILs, it is greater than 200 mg/g solution. The results of solubility in water/IL mixtures permit to choose a water/IL ratio leading to a good solid theoretical yield. Then recrystallization is performed with 1-ethyl-3-methylimidazolium methyl phosphonate [emim][$CH_3O(H)PO_2$] as the preferred solvent. Anti-solvent crystallization represents a class of process characterized by the mixing between a solution and an anti-solvent to produce solid particles. The influence of solvent/anti-solvent ratio, initial concentration, and additives is studied. The solids formed and dried in an oven are characterized by laser granulometry, scanning electron microscopy, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and dissolution test. Despite the decrease of elementary particles size, the agglomeration state of particles does not permit to improve the dissolution rate. The agglomeration is reduced and the dissolution improved by modifying the drying process (spray drying). Moreover, the presence of an enteric polymer during the spray drying process has a significant impact on the structure of the formed agglomerates. These are disaggregated, dispersed and dissolved very quickly.

Keywords: Poor water-soluble drug, Crystallization, Ionic liquid, Solubility, Spray-drying

Sommaire

Introduction générale **15**

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique **23**

1.1 Introduction **25**

1.2 Complexité du développement du médicament **25**

1.3 L'intérêt d'une action sur le PA dans le contrôle de la phase biopharmaceutique et de la biodisponibilité **28**

1.3.1 La phase biopharmaceutique 29

1.3.1.1 La phase de libération 29

1.3.1.2 La phase de dissolution 30

1.3.2 Définition de biodisponibilité 34

1.3.3 Moyens d'amélioration de la biodisponibilité du PA 35

1.3.3.1 Techniques de réduction de la taille des particules 37

1.4 Rappels sur la cristallisation en solution **41**

1.4.1 Sursaturation 41

1.4.2 Nucléation 42

1.4.2.1 Nucléation primaire homogène 43

1.4.2.2 Nucléation primaire hétérogène 45

1.4.2.3 Nucléation secondaire 46

1.4.3 Croissance 47

1.4.4 Agglomération 48

1.4.4.1 Mécanismes de collision 50

1.4.4.1.1 Collision péricinétique 50

1.4.4.1.2 Collision orthocinétique 51

1.4.4.2 Efficacité d'agglomération 52

1.5 Cristallisation par effet anti-solvant **52**

1.5.1 Mode d'addition du solvant et de l'anti-solvant 54

1.5.2 Le processus de mélange 56

1.5.2.1 Hydrodynamique d'une suspension 56

1.5.2.2 Macro et micro-mélange 57

1.5.2.3 Temps caractéristiques 59

1.5.3 La cristallisation anti-solvant assistée par ultrasons 60

1.5.4 Choix du solvant et de l'anti-solvant 64

1.6 Etat de l'art en matière d'utilisation des liquides ioniques (LIs) dans le domaine pharmaceutique 68

1.6.1 Définition 68

1.6.2 Historique 69

1.6.3 Propriétés 70

1.6.4 Applications 73

1.6.4.1 Synthèse 74

1.6.4.2 Solubilisation 75

1.6.4.3 Systèmes de libération 76

1.6.4.4 LIs dans les processus de cristallisation 77

1.6.4.4.1 Additifs pour la cristallisation de protéines 77

1.6.4.4.2 Solvants pour la cristallisation de molécules pharmaceutiques 78

1.6.4.4.3 LIs comme molécules actives 79

1.7 LASSBio-294 : le problème posé 80

1.8 Conclusions 84

Chapitre 2 : Techniques de caractérisation 87

2.1 Introduction 89

2.2 Produits 89

2.3 Méthodes de caractérisation 90

2.3.1 Analyses en phase solide 90

2.3.1.1 Granulométrie laser 90

2.3.1.2 Microscopie électronique à balayage (MEB) 92

2.3.1.3 Pycnométrie à hélium 92

2.3.1.4 Goutte posée 93

2.3.1.5 Diffractométrie de rayons X 93

2.3.1.6 Calorimétrie différentielle à balayage 96

2.3.2 Analyses en phase liquide 97

2.3.2.1 Quantification de la molécule en solution 97

2.3.2.1.1 Quantification à partir de solutions aqueuses 98

2.3.2.1.2 Quantification à partir de solutions contenant des LIs 102

2.4 Mesures de solubilité du LASSBio-294 102

2.4.1 Solubilité dans des milieux aqueux 103

2.4.2 Solubilité dans des LIs et dans des milieux contenant des LIs 104

2.5 Stabilité du LASSBio-294 dans des milieux aqueux 104

2.5.1 Influence du pH sur la stabilité de la molécule en solution 105

2.5.2 Influence de la teneur en solide sur la dégradation de la molécule 105

2.6 Détermination de la pureté du solide 105

2.6.1 Quantification des impuretés organiques 106

2.6.2 Quantification du solvant résiduel 107

2.7 Détermination de la viscosité des solutions LI/LASSBio-294 et des mélanges Eau/LI 110

2.8 Conclusions 112

Chapitre 3 : Solubilité du LASSBio-294 115

3.1 Introduction 117

3.2 Étude de solubilité dans des milieux aqueux 117

3.2.1 Solubilité dans des milieux aqueux sans additifs 117

3.2.2 Solubilité dans des milieux aqueux avec additifs 121

3.3 Étude de stabilité chimique 123

3.3.1 Influence du pH sur la stabilité de la molécule en solution 123

3.3.2 Influence de la teneur en solide sur la dégradation de la molécule 125

3.3.3 Mécanisme de dégradation 131

3.4 Étude de solubilité dans les milieux contenant des LIs 133

3.4.1 Solubilité dans les LIs purs 133

3.4.1.1 L'influence du type d'anion 136

3.4.1.2 L'influence du type de cation 137

3.4.2 Effet de la température sur la solubilité du LASSBio-294 dans l'eau et dans les LIs dérivés du cation [emim] 139

3.4.3 Solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges eau/LI dérivés du cation [emim] 139

3.4.4 Effet de la température sur la solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges eau/LI 142

3.4.5 Viscosité des solutions de LI/LASSBio-294 et des mélanges Eau/LI 142

3.5 Conclusions 145

Chapitre 4 : Cristallisation par effet anti-solvant du LASSBio-294 147

4.1 Introduction 149

4.2 Procédé de cristallisation du LASSBio-294 par effet anti-solvant 149

4.3 Mode de mélange des solutions 151

4.4 Mélange du solvant et de l'anti-solvant avec pré-mélangeur 152

4.4.1 Protocole 152

4.4.2 Résultats et discussion 154

4.4.2.1 Hydrodynamique 155

4.4.2.2 Etude de l'influence des paramètres opératoires 158

4.4.2.2.1 Influence du type de pré-mélangeur 158

4.4.2.2.2 Influence de la vitesse d'agitation 159

4.4.2.2.3 Influence de la concentration initiale de LASSBio-294 165

4.4.2.2.4 Influence du rapport massique solvant/anti-solvant 168

4.4.2.2.5 Influence des additifs 172

4.5 Mélange du solvant et de l'anti-solvant sans pré-mélangeur 177

4.5.1 Protocole 178

4.5.2 Résultats et discussion 179

4.5.2.1 Hydrodynamique 179

4.5.2.2 Etude de l'influence des paramètres opératoires 181

4.5.2.2.1 Effet du mode de mélange rapide ou goutte-à-goutte avec et sans ultrasons 181

4.5.2.2.2 Effet des ultrasons sur le mode d'addition rapide 185

4.5.2.2.3 Effet des ultrasons sur le mode d'addition goutte-à-goutte 188

4.6 Caractérisation des cristaux secs 193

4.6.1 Granulométrie du solide sec 194

4.6.2 Rendement et pureté 194

4.6.3 Angle de contact et teneur résiduelle en LI 194

4.6.4 Diffraction de rayons X 197

4.7 Optimisation du processus de lavage des cristaux 197

4.7.1 Protocole 197

4.7.2 Résultats et discussion 198

4.8 Optimisation du procédé de séchage des cristaux 200

4.8.1 Protocole 200

4.8.2 Résultats et discussion 201

4.9 Conclusions 204

Chapitre 5 : Propriétés de dissolution des cristaux synthétisés 207

5.1 Introduction 209

5.1.1 Partie 1 : Étude de la dissolution in vitro du LASSBio-294 209

5.1.1.1 Protocole 209

5.1.1.2 Traitement mathématique des résultats 211

5.1.1.2.1 Facteurs de différence et de similarité *f1* et *f2* 211

5.1.1.2.2 Mécanisme de libération 212

5.1.1.3 Résultats et discussion 213

5.1.1.3.1 Cinétique de dissolution du LASSBio-294 sous sa forme originale 213

5.1.1.3.2 Influence des conditions de mélange entre les phases organique et aqueuse sur les propriétés de dissolution des cristaux synthétisés 214

5.1.1.3.2.1 Données expérimentales 214

5.1.1.3.2.2 Traitement mathématique 216

5.1.1.4 Influence du mode de séchage sur les propriétés de dissolution des cristaux synthétisés 218

5.1.1.4.1.1 Données expérimentales 218

5.1.1.4.1.2 Traitement mathématique 220

5.1.2 Partie 2 : Proposition d'une formulation gastro-résistante pour les cristaux de LASSBio-294 synthétisés 221

5.1.2.1 Méthodes 221

5.1.2.1.1 Protocole de production de la formulation 221

5.1.2.1.2 Test de stabilité de la formulation gastro-résistante de LASSBio-294 en milieu acide 222

5.1.2.1.3 Etude de la dissolution des formulations gastro-résistantes de LASSBio-294 222

5.1.2.2 Résultats et discussion 222

5.1.2.2.1 Test de stabilité de la formulation gastro-résistante de LASSBio-294 en milieu acide 222

5.1.2.2.2 Étude de la dissolution des formulations gastro-résistantes de LASSBio-294 225

5.1.2.2.2.1 Traitement mathématique 228

5.2 Conclusions 229

Conclusion générale et perspectives 231

Références Bibliographiques 239

Annexes 267

Liste des symboles 297

Liste des figures 305

Liste des tableaux 315

Introduction générale

Le 3,4-méthylendioxybenzoyl-2-thiénylhydrazone, LASSBio-294, est un nouveau bioactif de la classe N-acylhydrazone qui a été synthétisé en vue de développer de nouvelles thérapies permettant de simplifier le traitement des maladies cardiovasculaires (Lima et al. 2000; Barreiro 2002). Des études biologiques ont caractérisé le LASSBio-294 comme étant une molécule capable d'augmenter la contraction des muscles cardiaques et de favoriser la vasodilatation par un mécanisme différent de celui induit par les glycosides cardiaques et β–adrénergiques agoniste (Gonzalez-Serratos et al. 2001; Sudo et al. 2001; Silva et al. 2002). Ces effets thérapeutiques prometteurs indiquent que le LASSBio-294 est un nouveau candidat efficace pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (Gonzalez-Serratos et al. 2001) et la prévention de l'infarctus du myocarde (Sudo et al. 2001; Costa et al. 2010). Toutefois, comme toute molécule faiblement hydrosoluble, elle présente une faible solubilité et une mauvaise dissolution dans le tractus gastro-intestinal, ce qui limite son absorption effective et sa biodisponibilité après administration par voie orale. Une amélioration de sa biodisponibilité peut avoir pour conséquence de réduire et d'optimiser considérablement la dose du médicament à administrer.

Diverses propriétés telles que le faciès des cristaux, la cristallinité, la distribution de taille des particules et la cinétique de dissolution peuvent être modifiées de différentes façons, y compris la recristallisation. Parmi les techniques de recristallisation, la cristallisation antisolvant a été utilisée avec succès pour améliorer la cinétique de dissolution, comme indiqué par un certain nombre de travaux dans la littérature (Zhang et al. 2009; Müller et al. 2011; Viçosa et al. 2012). Cette technique est caractérisée par le mélange d'une solution avec un anti-solvant pour produire des particules solides. Ce mélange génère une forte sursaturation qui induit ensuite la nucléation, la croissance et éventuellement l'agglomération de cristaux. Une difficulté associée à cette technologie est que la molécule doit être soluble dans au moins un solvant, ce qui crée un problème pour les molécules nouvellement synthétisées ou découvertes, car elles sont faiblement solubles dans l'eau et dans les solvants organiques. Le but de cette étude est d'identifier d'autres solvants pour la cristallisation anti-solvant du LASSBio-294 en présence d'eau comme anti-solvant. Les solvants alternatifs retenus pour cette étude sont les liquides ioniques (LIs).

Contrairement aux solvants classiques, les LIs sont entièrement composés d'ions. Ce sont des sels organiques, généralement liquides à température ambiante, et qui sont composés d'un assez grand cation organique dissymétrique (par exemple alkyle pyridinium, dialkyl imidazolium) et un anion inorganique ou organique (parmi d'autres halogénure,

hexafluophosphate, tétrafluoroborate et d'ions sur la base d'amides fluorés). Ils sont disponibles dans le commerce, et le nombre de LIs rapportés dans la littérature continue à augmenter. Ils apparaissent comme de nouveaux solvants pour remplacer les composés organiques volatils traditionnellement utilisés comme solvants industriels. En raison de leur pression de vapeur négligeable, le risque de pollution de l'air est réduit (Lourenço et al. 2012). En outre, les LIs présentent le potentiel d'être "façonner sur mesure" puisque leurs propriétés physico-chimiques peuvent être finement réglées par un choix approprié du cation et/ou de l'anion. De plus, il existe une très large gamme de combinaisons potentielles de cations et d'anions qui peuvent être synthétisés pour produire un LI. Il en résulte que ces solvants peuvent être conçus pour une application particulière ou présenter un ensemble de propriétés intrinsèques telles que l'acidité, la basicité, l'hydrophilicité /hydrophobicité, la miscibilité (Huddleston et al. 2001) dans l'eau et la toxicité (Azevedo et al. 2013). Ainsi, la combinaison de ces excellentes propriétés permet de concevoir des procédés écologiques sur la base LIs (Freire et al. 2007).

La possibilité de choisir les propriétés des LIs en manipulant la combinaison anion-cation, en association avec leurs propriétés de solvant et dans certains cas leurs miscibilités dans l'eau, est considérée comme une caractéristique prometteuse au regard de leur potentiel en tant que solvants pour dissoudre les médicaments pharmaceutiques peu solubles dans l'eau. Les recherches dans ce domaine ont porté sur la capacité des LIs pour solubiliser des molécules pharmaceutiques tels que l'albendazole et le danazol (Mizuuchi et al. 2008), le paracétamol et l'ibuprofène (Smith et al. 2011), l'érythromycine (Manic & Najdanovic-Visak 2012), l'isoniazide et le pyrazine-2-carboxamide (Lourenço et al. 2012; Melo et al. 2013). Notre groupe de travail a mis en évidence des résultats prometteurs pour la cristallisation anti-solvant de la rifampicine en utilisant un LI dérivé du cation imidazolium en tant que solvant et un tampon phosphate en tant qu'anti-solvant (Viçosa et al. 2012). Des nanoparticules amorphes avec une meilleure solubilité et une vitesse de dissolution plus rapide sont obtenues.

L'obtention de cristaux fins avec une meilleure vitesse de dissolution du LASSBio-294 est un des challenges de cette thèse.

Hypothèse et méthode de travail

L'hypothèse principale utilisée dans ce travail est que l'on peut solubiliser le LASSBio-294 dans un liquide ionique et la recristalliser par effet anti-solvant. Cette molécule est très peu soluble dans des solvants organiques.

Nous savons que cristalliser n'est pas une opération simple. Il est nécessaire de bien maîtriser le choix du solvant et de l'anti-solvant, le ratio massique entre eux, puis de contrôler les conditions opératoires comme le type de mélange (micro et macro), et la concentration initiale de la molécule à cristalliser. Tous ces paramètres peuvent influencer les étapes de nucléation, croissance et agglomération des cristaux.

Nous savons aussi que cristalliser en utilisant des liquides ioniques comme solvants représente un défi supplémentaire. Les propriétés physicochimiques de cette catégorie de solvants sont différentes de celles de solvants organiques telle que la viscosité, qui peut avoir un impact (encore inconnu) sur le mélange entre le solvant et l'anti-solvant. De plus, des questions encore ouvertes se posent :

Question 1. Comment choisir le bon liquide ionique "solvant" pour une molécule donnée ?

Question 2. Quels sont les avantages/limitations du procédé de cristallisation par effet anti-solvant où le solvant est un liquide ionique ?

Question 3. Comment quantifier le solvant résiduel dans le solide ? Quel est l'effet du solvant résiduel ?

Des éléments de réponse seront apportés par ces travaux de recherche.

Notre molécule est un nouveau candidat pour un médicament. Cependant, ses propriétés physicochimiques sont méconnues… C'est alors un double défi qui se traduit par un plan et une méthode de travail pour la réalisation de cette thèse.

Pour répondre aux objectifs exposés, le travail se structure en deux parties principales, l'une bibliographique, l'autre expérimentale. La partie bibliographique (Chapitre 1) fait l'état du contexte scientifique relatif à l'application des liquides ioniques dans le domaine pharmaceutique.

La partie expérimentale se décompose en 4 parties décrites ci-après (Figure 1) :

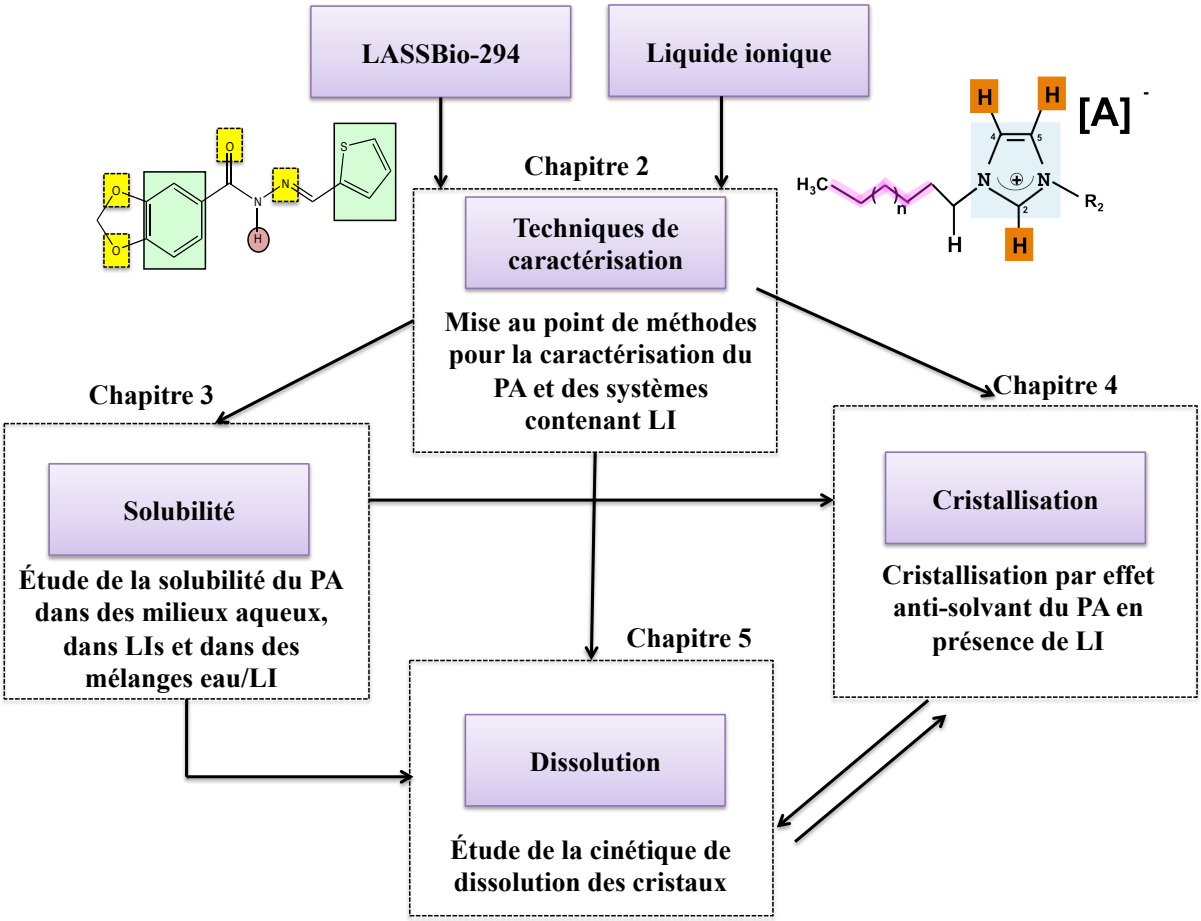


Figure 1. Stratégie de travail sur la cristallisation du LASSBio-294 par effet anti-solvant en présence de liquides ioniques.

Une première partie (Chapitre 2) est consacrée à la mise au point de techniques de caractérisation de la molécule (en phase solide et en phase liquide) (*réponse à la question 3*).

Dans la deuxième partie (Chapitre 3) des mesures de solubilité de notre molécule dans des milieux aqueux, dans des liquides ioniques et dans des mélanges liquide ionique/eau sont

réalisées et les résultats analysés. Ce travail s'intègre dans le cadre de la compréhension de la nature des interactions soluté-solvant en vue de la compréhension des phénomènes menant à la solubilisation de la molécule en question (*tentative de réponse à la question 1*).

La troisième partie (Chapitre 4) est dédiée à l'étude de la cristallisation de notre molécule par effet anti-solvant. L'objectif est de synthétiser des cristaux dans des conditions opératoires variées et de les caractériser (*tentative de réponse à la question 2*).

Dans une dernière, partie les propriétés de dissolution des cristaux synthétisés sont mesurées et comparées (Chapitre 5). De plus, dans cette partie, une formulation gastro-résistante est proposée pour réduire une éventuelle dégradation de la molécule en milieu acide.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Introduction

Cette partie bibliographique a pour but de décrire les différents aspects du problème traité dans ce travail. Le chapitre démarre par une brève présentation d'informations d'ordre général (dissolution, biodisponibilité, devenir du médicament dans l'organisme, intérêt d'une action sur la molécule active elle-même dans le contrôle de sa biodisponibilité).

Dans un second temps, nous présentons de façon synthétique les diverses notions théoriques sur la cristallisation en solution et plus particulièrement sur la cristallisation par effet anti-solvant qui seront nécessaires pour l'analyse et l'interprétation des résultats expérimentaux.

Des liquides ioniques seront utilisés comme solvants de cette molécule. Un état de l'art en matière d'utilisation de ces types de solvants dans le domaine pharmaceutique est alors présenté. Enfin, nous terminerons cette partie par une présentation de la molécule de notre intérêt, le LASSBio-294.

1.2 Complexité du développement du médicament

Le processus de développement d'un médicament se décompose en trois grandes étapes de recherche et développement (Figure 1.1).

La toute première phase (ETAPE 1) est consacrée à la découverte et à la fabrication d'une nouvelle substance ou molécule (PA, principe actif d'intérêt pharmaceutique). Ceci se situe encore avant la phase appelée phase préclinique (ETAPE 2) ou phase 0, dans laquelle le PA sera testée sur plusieurs modèles expérimentaux comme objets d'études (des cultures de tissus ou des animaux).

Les études précliniques (ETAPE 2) sont constituées par une première étape de recherche en synthèse chimique permettant de mettre en avant des PA à développer, qui est suivie d'études de toxicologie, de pharmacologie et de pharmacocinétique réalisées en conditions *in vitro* et chez l'animal (Lombardino & Lowe 2004). L'objectif est de fournir une quantité suffisante de données pharmacologiques et toxicologiques qui permettront de passer à la phase clinique (tests effectués sur les humains) avec une marge de sécurité raisonnable et prédéfinie.

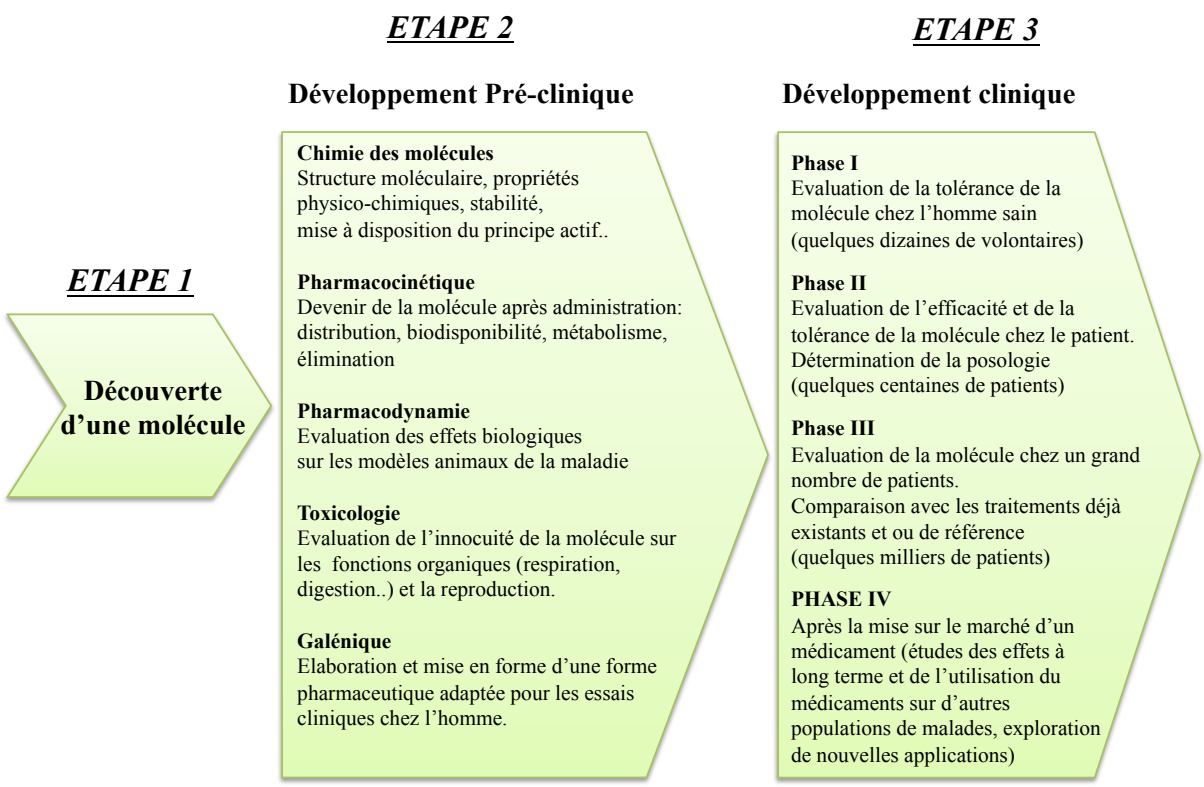


Figure 1.1. Les grandes étapes du développement d'un médicament.

Les caractéristiques principales d'un bon candidat médicament sont :

- ✓ stable dans des conditions variées (température, lumière, humidité, pH) ;
- ✓ atoxique, non mutagène ;
- ✓ actif sur différents modèles animaux ;
- ✓ facilement synthétisable au niveau industriel ;
- ✓ brevetable ;
- ✓ bien absorbable par voie orale.

Les études cliniques (ETAPE 3) se font chez l'homme en 4 phases distinctes. La phase I correspond à une étude de sécurité d'emploi chez le volontaire sain par administration d'une dose unique. La phase II se fait chez le volontaire sain (phase IIa) ou malade (phase IIb). Il s'agit de déterminer l'activité du PA par une évaluation de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie et d'en déduire les doses optimales d'utilisation. La phase III est notamment constituée d'études de comparaison à un placébo ou au traitement de référence et

permet d'évaluer le rapport bénéfice risque. La phase IV correspond aux essais réalisés après l'autorisation de mise sur le marché (AMM) qui ont pour objectif d'évaluer l'efficacité à long terme et de chercher des effets indésirables grâce à la pharmacovigilance.

Un ratio résume la grande complexité du développement du médicament : 1/10 000. Pour 10 000 entités chimiques découvertes, une seule aboutie à un médicament enregistré (Figure 1.2). Le nombre de molécules dont le développement est interrompu, est très élevé dans les phases précliniques du développement. Pour 97,5% des entités chimiques découvertes, les phases précliniques ne seront pas favorables et la recherche sera interrompre. Sur les 250 entités chimiques enregistrées aux termes des études précliniques pour être testées en recherche clinique, seulement 10 feront l'objet d'un dépôt de brevet dont 5 feront l'objet d'étude de phase 2 et une seule aboutira à un médicament commercialisé (Lipsky & Sharp 2001; Lebret et al, 2010). Les principales raisons de l'interruption du développement sont liées à l'absence d'efficacité, à la toxicité ou aux propriétés pharmacocinétiques insuffisantes (van de Waterbeemd & Gifford 2003). Les coûts associés à toutes ces phases de développement sont de l'ordre du milliard d'euros (Houlton 2008). Le processus de développement d'un médicament est donc long, réglementé, risqué et coûteux (DiMasi et al. 2003).

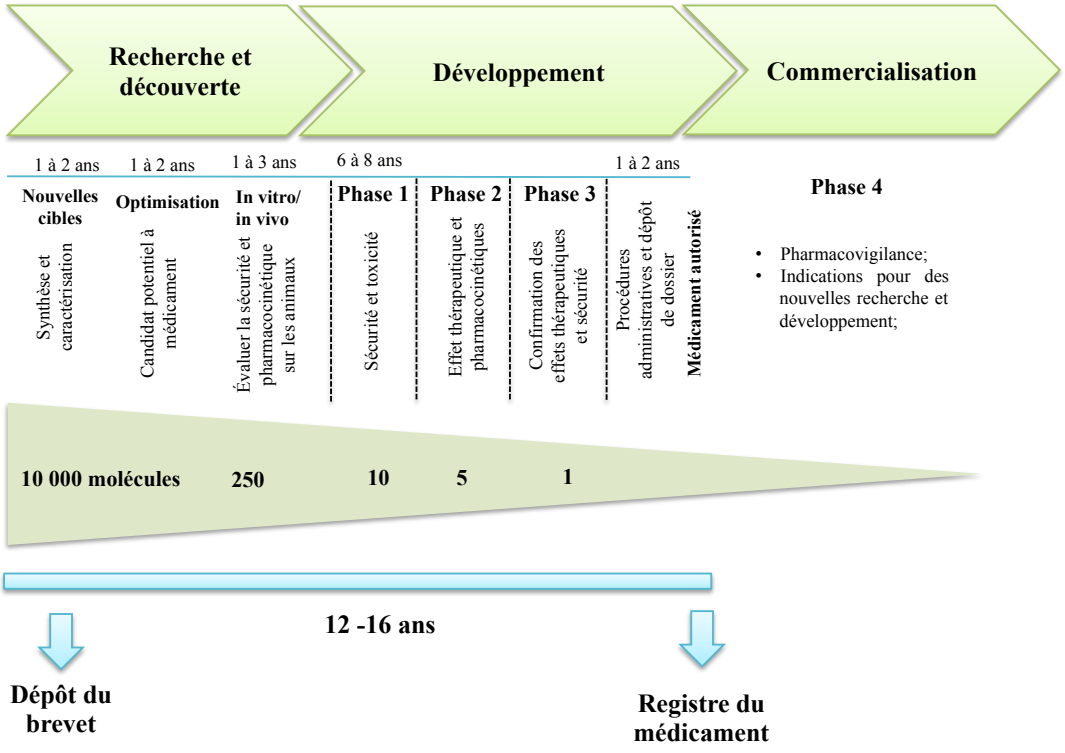


Figure 1.2. Grandes étapes du développement d'un nouveau médicament.

1.3 L'intérêt d'une action sur le PA dans le contrôle de la phase biopharmaceutique et de la biodisponibilité

La principale priorité de la recherche et développement en galénique concerne l'amélioration de la solubilité ou de la vitesse de dissolution des PA dans les milieux aqueux, et, au final, celle de l'observance du patient durant la totalité de son traitement par diminution du nombre de prises et/ou des effets indésirables. Pour ce faire, deux axes de recherche peuvent être suivis : soit une action sur le PA lui-même, soit une action sur sa mise en forme par une élaboration de systèmes thérapeutiques sophistiqués qui vont attribuer au PA incorporé une efficacité thérapeutique ciblée, programmée, voire optimisée.

L'augmentation de l'efficacité d'un médicament se fait donc par plusieurs voies : d'une part, le ciblage thérapeutique permet de personnaliser le traitement et, *in fine*, d'augmenter la biodisponibilité du PA ; d'autre part, la modification du PA lui-même a pour but d'optimiser sa vitesse de dissolution, sa solubilité ainsi que sa perméation à travers les membranes biologiques.

Pour comprendre l'intérêt d'une action sur le PA lui-même, nous commencerons par décrire brièvement les étapes d'assimilation et de l'action du médicament par et sur l'organisme (Figure 1.3) : les phases biopharmaceutique, pharmacocinétique et pharmacodynamique.

La phase biopharmaceutique est la première à avoir lieu une fois le médicament administré. Elle consiste à mettre à disposition le PA dans l'organisme et conditionne donc la quantité de médicament pénétrant dans le milieu intérieur. Pour une formulation destinée à la voie orale, elle se compose de deux phases successives : la libération du PA de la forme pharmaceutique et la dissolution. Dans le cas d'une administration par voie injectable, les étapes de libération et de dissolution sont inexistantes puisque le PA est directement administré en solution.

Une fois la phase biopharmaceutique effectuée, le médicament atteint la circulation sanguine générale de façon à pouvoir atteindre sa cible (le site d'action et ses récepteurs auxquels il est destiné) : c'est la phase pharmacocinétique, qui se compose de quatre étapes successives (la résorption ou absorption, la distribution dans l'organisme, le métabolisme et l'élimination de l'organisme).

La phase pharmacodynamique correspond à l'action du médicament sur l'organisme (action thérapeutique/toxicité).

Les phases biopharmaceutique et pharmacocinétique sont celles sur lesquelles la formulation peut avoir un impact directe.

Nous ne décrirons plus en détail que la phase biopharmaceutique puisque c'est sur celle-ci que les modifications des caractéristiques physiques du PA envisagées dans ce travail auront un impact direct.

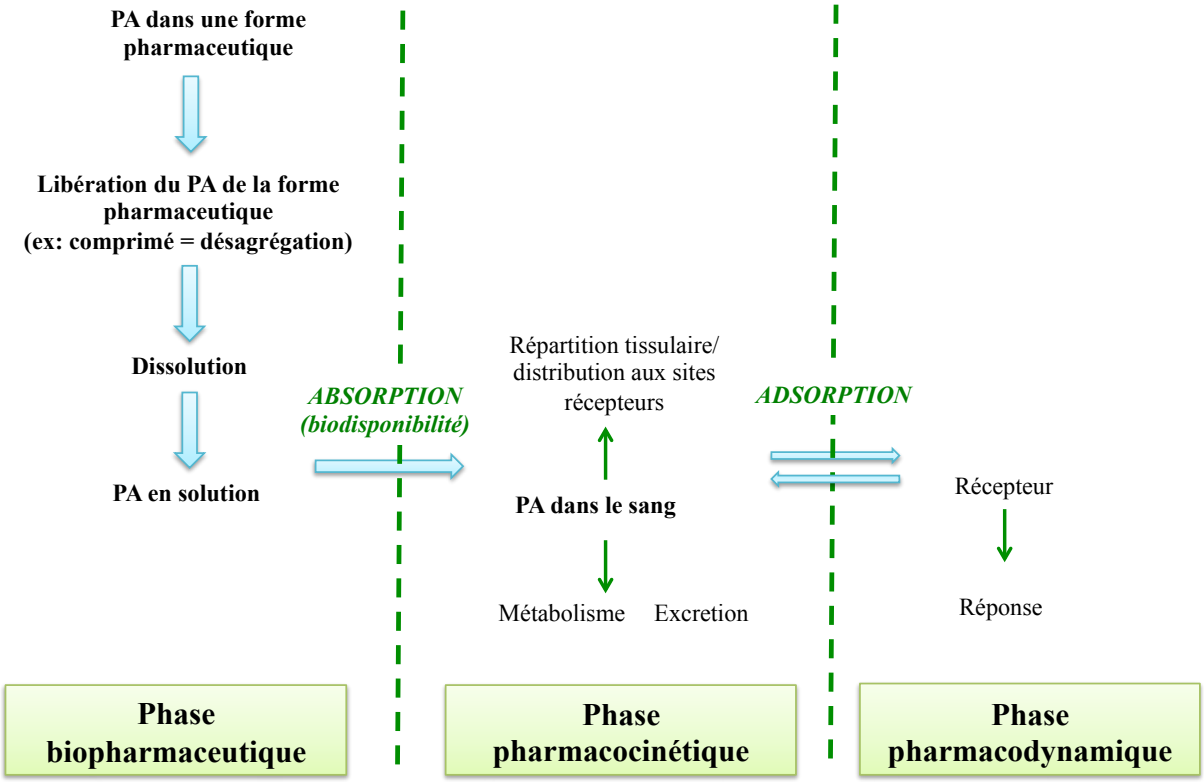


Figure 1.3. Le devenir du médicament dans l'organisme : de l'ingestion à la réponse pharmacologique (Modifiée de IFSI, Colmar. Cours de Pharmacocinétique de l'IFSI de Colmar. [En ligne] [Juillet 2011] http://ifsicolmar.perso.neuf.fr/cours.html._Thèse de Mathieu 2012).

1.3.1 *La phase biopharmaceutique*

1.3.1.1 La phase de libération

Le PA est mis à disposition dans l'organisme de manière différente selon le type de formulation : pour un comprimé, elle se fait la plupart du temps par désintégration de la forme solide, puis par la désagrégation en particules de petite taille, ce qui facilite l'étape de

dissolution qui suit. Dans le cas d'une gélule, la libération se résume à l'ouverture de la gélule. Enfin, dans le cas d'une suspension ou solution, cette étape n'existe pas puisque le PA est directement à disposition de l'organisme. Cette étape peut être rapide dans le cas d'une forme pharmaceutique à libération rapide et plus lente dans le cas d'une forme à libération prolongée.

1.3.1.2 La phase de dissolution

Pour traverser les membranes biologiques ou pour être absorbé, le PA doit être dispersé à l'état de molécules, en milieu aqueux, au niveau du site d'absorption. Lors de l'administration d'un comprimé par exemple, la paroi digestive correspond au site d'absorption, et le PA doit être solubilisé à l'intérieur du tube digestif pour être absorbé. La vitesse de dissolution quant à elle dépend des caractéristiques du PA lui-même mais aussi de celles du site d'absorption (Aulton 2002).

La dissolution est un processus dynamique de transfert des molécules ou ions d'un état solide vers le solvant par unité de temps. On peut décrire ce processus comme la résultante de 4 étapes (Figure 1.4) :

1) Libération des molécules au niveau de la surface du solide ;

2) Désorption du soluté ;

3) Transport des molécules vers l'interface solide-solution ;

4) Transport du soluté hors de l'interface.

Les trois premières étapes sont regroupées sous le nom de réactions de surface, tandis que l'étape 4 est appelée diffusion volumique (Garcia 2000; Aulton 2002).

La vitesse de réaction globale de dissolution est contrôlée par le processus le plus lent; si les phénomènes de surface sont rapides, la vitesse de la dissolution globale sera égale à la vitesse de transfert du soluté hors de l'interface, on parle de réaction contrôlée par la diffusion volumique. Inversement, quand les phénomènes de surface sont plus lents que le transfert des espèces hors de l'interface, on parle d'une dissolution contrôlée par la réaction de surface.

Dans ce cas, les étapes 1 à 3 sont généralement considérées comme les plus lentes et limitent le processus global de dissolution (Garcia 2000).

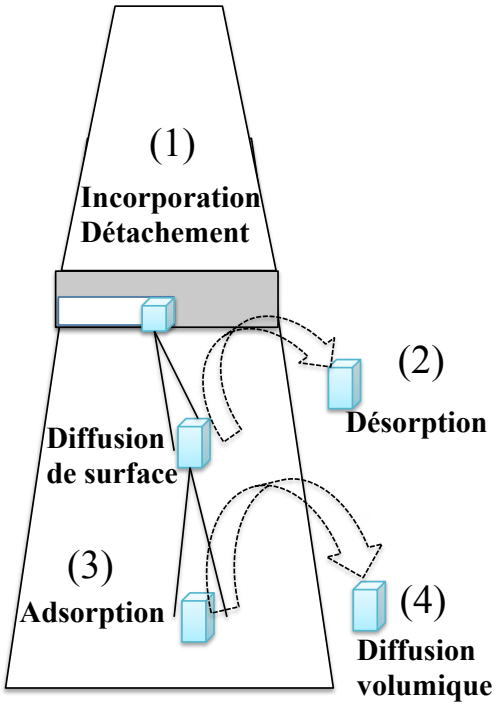


Figure 1.4. Illustration du processus de dissolution et ses quatre étapes (Modifiée de Garcia 2000).

Le modèle cinétique le plus souvent utilisé pour décrire le processus de dissolution est le modèle du film (Mersmann 2001; Garcia 2000). On suppose qu'il existe au voisinage du solide deux couches successives : la couche d'adsorption et la couche de diffusion. Ce modèle décrit le transfert de matière entre les phases et en particulier d'un liquide vers un solide (Figure 1.5). Il suppose que la dissolution se décompose en deux étapes :

1) Désintégration des unités de croissance du réseau cristallin (dans la couche d'adsorption) ;
2) Transfert de matière de celles-ci vers l'interface cristal/solution ou vers la solution.

Ce dernier transfert de matière est influencé par le coefficient de diffusion dans le film d'épaisseur δ. Au sein de la solution, la concentration en molécules est C_i. Dans le film de diffusion, il existe un gradient de concentration. La concentration à l'interface des deux

couches (adsorption/désorption) est notée C_i^{int} ($C_i^{int} \geq C_i$), et la concentration à la surface du cristal, C_i*. Cette dernière est supposée être égale à la concentration à saturation.

En dépit de l'agitation, on peut supposer que le solide est entouré par un film liquide stagnant d'épaisseur constante. Les molécules solides diffusent spontanément à travers ce film et accèdent à la solution. La diffusion est décrite par la première loi de Fick :

$$J_i = -D_{i,mélange} \frac{\partial C_i}{\partial r} \qquad \text{Équation 1}$$

où J_i est la vitesse de diffusion (définie comme la quantité de matériau i qui passe par unité de temps perpendiculairement à travers d'une surface unitaire), $D_{i,mélange}$ le coefficient de diffusion de la molécule i dans le mélange, et $\partial Ci/\partial r$ le gradient de concentration à travers le film.

On peut exprimer la dérivée $\frac{\partial C_i}{\partial r}$ par $(C_i^* - C_i)/h$ Équation 2

En utilisant cette expression, et désignant le volume du solvant V et la surface de la dissolution de solide A, l'équation devient:

$$\frac{V}{A}\frac{dC_i}{dt} = \frac{D_{i,mélange}}{h}\left(C_i^* - C_i\right) \qquad \text{Équation 3}$$

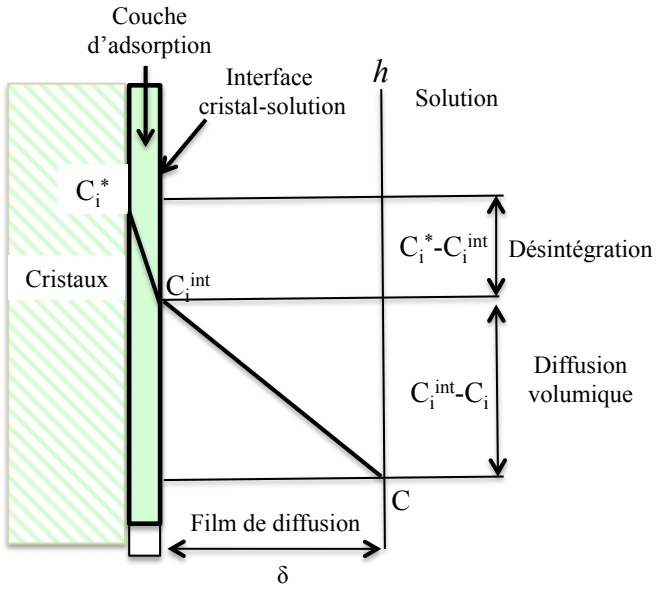


Figure 1.5. Modèle du film pour la dissolution d'un solide.

La forme plus familière de l'équation de dissolution (aussi appelé équation Noyes - Whitney), qui décrit l'augmentation de la masse de soluté *dmi* dans le temps *dt* en raison de la dissolution, est obtenue en réarrangeant l'équation avec M_i la masse molaire du solide :

$$\frac{dmi}{dt} = \frac{D_{i,mélange}}{h} AM_i V\left(C_i^* - C_i\right) \qquad \text{Équation 4}$$

Pour éliminer l'effet de saturation du solvant et augmenter la capacité du solide à se dissoudre afin de délivrer la quantité souhaitée du médicament, les méthodes de dissolution sont réalisées en condition "sink" (Rohrs 2001; Gowthamarajan & Singh 2010). En pratique, cette condition est vraie si le volume de dissolution est suffisamment grand : entre 3 et 10 fois le volume nécessaire pour solubiliser totalement le médicament. Lorsque la condition "sink" est maintenue ($C_i << C^*$), l'équation se simplifie en:

$$\frac{dmi}{dt} = \frac{D_{i,mélange}}{h} AM_i VC_i^* \qquad \text{Équation 5}$$

La phase de dissolution implique de nombreux mécanismes variés, d'où la multitude de facteurs sur lesquels il est possible d'intervenir pour favoriser ou non la dissolution du PA, selon que l'on veuille accélérer, prolonger ou retarder l'action du médicament :

L'épaisseur de solvant autour de la particule

Plus l'épaisseur de solvant autour de la particule est fine (i.e. plus **h** est faible), plus la dissolution est rapide (i.e. le rapport **dmi/dt** augmente), tant que la solution n'est pas saturée (i.e. **Ci ≠ C*).** La dissolution peut reprendre une fois qu'une fraction de produit dissous a quitté la couche de diffusion vers le liquide environnant, qui ne doit donc lui-même pas être saturé.

La taille des particules

On remarque aussi par l'Equation 3 l'importance de la surface spécifique des particules de PA en contact avec le solvant : plus cette surface de contact avec le solvant est importante (i.e. plus **A** est grand), plus la vitesse de dissolution est grande.

La concentration à saturation (ou solubilité) du PA

Depuis quelques années, la Food and Drug Administration (FDA) a mis en place un système de classification des PA utilisés pour la voie orale, le Biopharmaceutics Classification System (BCS) (Babu & Nangia 2011). Ce système permet de classer les PA selon leur capacité à être dissous dans l'eau (solubilité aqueuse) et leur capacité à traverser les membranes biologiques (perméation). Quatre classes majeures de molécules sont distinguées, numérotées de I à IV (Figure 1.6) (Babu & Nangia 2011; Amidon et al. 1995; FDA 2000). Plus la différence entre la concentration à saturation et celle du milieu environnant est importante ($C^* - C_i$), plus la vitesse de dissolution est grande. Ainsi, si le PA est plus rapidement absorbé dans les membranes biologiques qu'il n'est dissous, alors la différence de concentration sera importante, et la vitesse de l'absorption sera limitée par la vitesse de dissolution du PA.

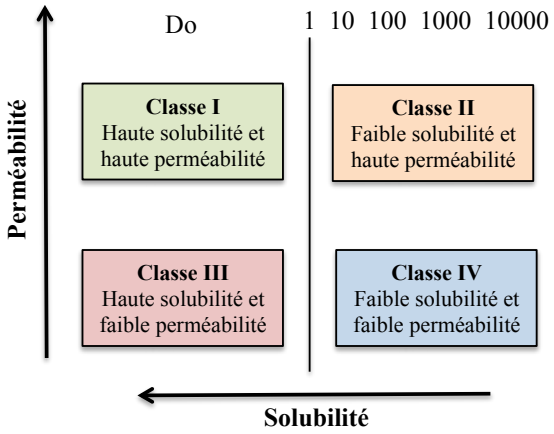


Figure 1.6. Système de classification biopharmaceutique selon Amidon (1995). (Modifiée de Babu & Nangia 2011).

1.3.2 *Définition de biodisponibilité*

Selon l'European Medicines Evaluation Agency (EMEA), la biodisponibilité se définit comme étant la vitesse et l'étendue avec lesquelles la substance active ou sa fraction active est absorbée à partir de sa formulation pharmaceutique et devient disponible au site d'action (EMEA 2001).

Étant donné que le site d'action n'est généralement pas identifié, la biodisponibilité est redéfinie comme étant la vitesse et l'étendue avec lesquelles la substance ou sa fraction active gagne la circulation générale c'est-à-dire parvient jusqu'à la circulation artérielle (aorte). La

biodisponibilité est donc une propriété du médicament qui rend compte à la fois du taux de PA qui atteint la circulation générale et de la vitesse à laquelle il y parvient.

On recherche des biodisponibilités élevées, proches de 100 % pour différentes raisons (Mathieu 2012) :

- pour avoir une meilleure sélectivité des effets du médicament et par conséquent ne pas gaspiller de la substance active,
- pour ne pas avoir à augmenter inutilement les doses et exposer correctement les sujets ayant les biodisponibilités les plus faibles,
- pour ne pas offrir des opportunités d'interactions conduisant à des effets secondaires par des augmentations inattendues de la biodisponibilité,
- pour avoir des expositions systémiques reproductibles entre les sujets : plus la biodisponibilité est faible, plus la variabilité inter-sujet est importante.

1.3.3 *Moyens d'amélioration de la biodisponibilité du PA*

Parmi plusieurs solutions d'amélioration de l'effet d'un médicament, trois objectifs principaux guident la recherche de la forme de présentation du PA à l'organisme :

Une première voie d'amélioration de l'effet d'un médicament est la recherche de formulations dont l'administration est la moins invasive qu'il soit (voie orale, voie pulmonaire, voie nasale), de façon à rendre le traitement plus confortable d'utilisation pour le patient et ainsi améliorer son observance. De plus, pour atteindre leur cible et être efficaces, ces molécules, quand elles sont administrées par voie orale, doivent passer du tractus gastro-intestinal au flux sanguin pour ensuite être transportées sous forme dissoute par le plasma sanguin jusqu'à l'organe cible.

Une deuxième voie est de chercher à contrôler dans le temps la libération de la molécule active. En effet, lorsqu'un médicament à demi-vie courte est administré, un pic d'activité apparaît dès les premières heures, alors qu'il peut être souhaitable d'étaler l'effet

thérapeutique sur plusieurs jours ou davantage. Les systèmes à libération contrôlée (prolongée, retardée…) trouvent ici l'une de leurs principales applications.

Enfin, une troisième voie est d'augmenter la biodisponibilité d'un PA. Malgré une recherche abondante, un certain nombre de nouvelles molécules se trouvent bloquées dans leur développement en raison d'une trop faible biodisponibilité. Les causes sont multiples : mauvaise solubilité en raison du caractère hydrophobe des PA (la plupart des molécules actives issues de la recherche étant insolubles dans les milieux aqueux), vitesse de dissolution faible ou faible perméabilité aux membranes biologiques.

En effet, si la biodisponibilité du PA est trop faible, une dose plus importante devra être employée, avec tous les risques que cela comporte. Compte tenu de la variabilité biologique intrinsèque à toute espèce vivante, il est essentiel que la dose active soit la plus faible possible afin de réduire au minimum la dose à administrer et de prévenir ainsi tout accident chez les patients les plus réceptifs. Par conséquent, il est essentiel, en R&D pharmaceutique, de pouvoir évaluer toutes les possibilités d'amélioration de la biodisponibilité et de développer des techniques de formulation appropriées.

Pour ce faire, plusieurs voies de travail sont envisageables. Elles comprennent des modifications physiques et chimiques, modification du pH ou de la composition du solvant, et compléxation par des cyclodextrines, entre autres. Le Tableau 1.1 regroupe les principaux avantages et inconvénients de chacune de ces techniques.

La voie chimique permet par exemple d'envisager la formation de sels plus ou moins solubles. Les substances ionisées sont plus solubles dans l'eau que celles non ionisées. La formation de sels à partir d'un PA a donc pour but de transformer une substance peu ionisée et donc peu hydrosoluble en un sel ionisé plus hydrosoluble. Un co-cristal, à son tour, est un matériau cristallin comprenant au moins 2 composés différents. La substance active associée à une molécule non toxique en quantité stœchiométrique. La mise en place de co-cristaux permet d'augmenter la vitesse de dissolution, notamment des substances actives non ionisables aux pH physiologiques.

La voie physique, quant à elle, permet d'envisager la modification de l'état cristallin des PA et de la taille des cristaux. Les particules solides se présentent sous forme cristalline ou amorphe. Il est souvent difficile d'identifier le système cristallin des poudres utilisées en

pharmacie si elles ont été pulvérisées finement. Il est donc important de connaître la structure, cristalline ou amorphe, des matières premières utilisées car il existe des différences de propriétés physiques notables entre ces deux types, qui pourront avoir des répercussions sur l'activité pharmacologique aussi bien que sur la stabilité chimique. Généralement, les structures amorphes sont plus solubles que les structures cristallines : il faut davantage d'énergie pour arracher une molécule au réseau organisé cristallin plutôt que pour l'arracher de l'assemblage inorganisé que constitue le réseau amorphe. Enfin, la réduction de la taille des cristaux permet d'envisager une vitesse de dissolution accrue, comme expliqué précédemment (1.3.1.2).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons à la technique de réduction de la taille des particules. Ce processus est utilisé pour augmenter la vitesse de dissolution et améliorer l'absorption des molécules car il produit une augmentation de surface spécifique ou un changement de l'état solide (Aulton 2002; Rasenack & Müller 2002; Müller et al. 2011; Viçosa et al. 2012; Williams et al. 2013).

1.3.3.1 Techniques de réduction de la taille des particules

Il existe différents procédés pour la réduction de la taille de particules. En général, ces opérations sont réparties dans deux modes de synthèse appelées "*top-down"* et "*bottom-up"* (Zhang et al. 2011), schématisés dans la Figure 1.7.

Dans le mode top-down, la formation de particules commence avec des particules solides de taille supérieure au micromètre. Ces grosses particules sont mécaniquement broyées pour l'obtention de particules plus petites. Dans le mode *bottom-up*, les particules sont formées par association des molécules à partir du niveau moléculaire jusqu'à la formation des cristaux (Florence & Konstantin, 2010; Zhang et al. 2011).

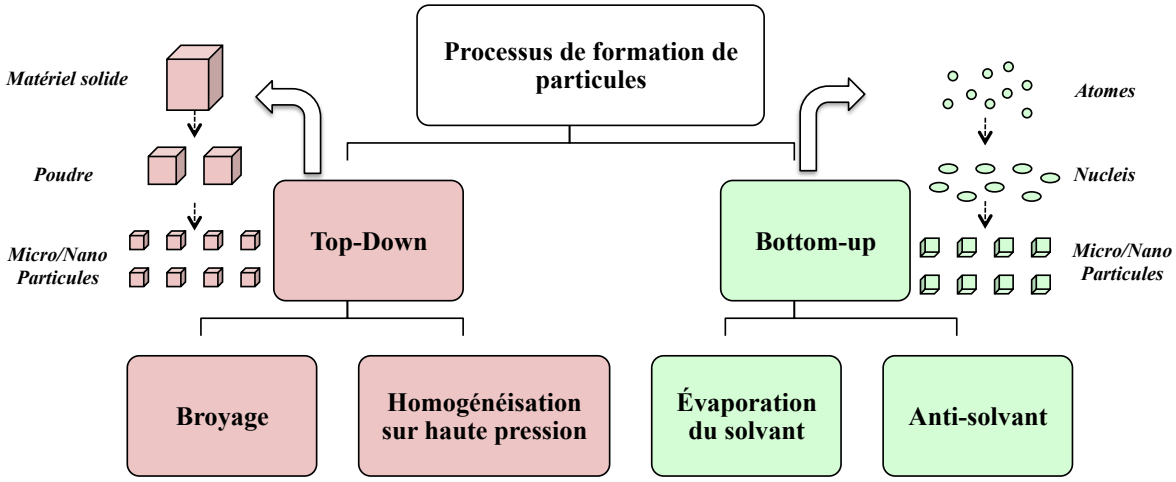


Figure 1.7. Schéma des processus de formation de particules (micro ou nano) sur les modes d'opération *Top-down* et *Bottom-up*.

Le processus top-down démarre à partir de macro-suspensions et la diminution de la taille est obtenue par broyage (Van Eerdenbrugh et al. 2008; Salazar et al. 2012). Les broyeurs sont généralement des broyeurs à billes avec des billes de différentes tailles, typiquement de 1 à 2 mm. La molécule est dispersée dans une solution avec un agent tensioactif. La suspension obtenue est ensuite introduite dans ce type de broyeur. Dans le processus de broyage avec le mouvement et le frottement des billes, les particules initiales (en général dans la gamme d'une dizaine ou centaine de micromètres) sont réduites à la taille du micron. Cette opération est toutefois accompagnée d'une érosion du matériau des billes, phénomène connu pour ce type d'équipement (Zhang et al. 2011). Par ailleurs, la technique de broyage présente les avantages suivants : une technologie simple, un processus à faible coût en matière d'équipement et la possibilité de production industrielle (traitement par lot). Les inconvénients sont une longue durée du processus, une érosion potentielle des billes de broyage et la contamination des produits de masse et le coût énergétique.

Tableau 1.1. Exemple de techniques d'amélioration de la solubilité et de la cinétique de dissolution de molécules hydrophobes.

Techniques	***Avantages***	***Inconvénients***	***Références***
Modification physique *1) Réduction de la taille*			
Micronisation	Technologie connue, liberté d'exploitation, forme posologique solide possible	Mauvais contrôle de la distribution de la taille des particules, amélioration insuffisante du taux de dissolution	(Rasenack et al. 2003); (Paulino et al. 2013)
Nanocristaux	Produits établis sur le marché, forme posologique solide possible	Nécessité de contrôler la croissance et agglomération des cristaux	(Dong et al. 2009);(Douroumis & Fahr 2007)(Zhang et al. 2006);
2) Changement d'état solide			
Dispersions solides amorphes	Réduction de la taille des particules, mouillabilité	Instabilité pendant le processus ou le stockage (état amorphe)	(Khoo et al. 2000); (Alonzo et al. 2011);(Chokshi et al. 2007)
Co-cristaux	Modification des propriétés physiques (solubilité, mouillabilité, propriétés mécaniques)	Difficulté dans le processus d'élaboration; Les deux composés doivent avoir des solubilités similaires	(Good & Rodríguez-Hornedo 2009);(Tomaszewska et al. 2013); Kawakami 2012)
Modification chimique			
Formation des sels	Les sels d'une molécule acide ou basique ont, généralement, des solubilités plus élevées que leurs formes acides ou basiques correspondantes	Généralement la forme de sels est moins stable chimiquement que la forme cristalline	(Venkatesh et al. 1996);(Serajuddin 2007);(Hawley & Morozowich 2010)(Kawakami 2012)
Modification du pH/composition solvant			
Contrôle du pH	Effet sur l'ionisation des molécules et solubilisation	Risque de précipitation lors de la dilution avec un milieu dans lequel le composé est moins soluble (pH); Possible accélération d'hydrolyse, de catalyse et de dégradation	(Chaudhary et al. 2012); (Venkatesh et al. 1996)
Surfactants/co-solvants	Réduction de la tension de surface et augmentation de la solubilité des molécules hydrophobes dans le milieux aqueux	Mauvaise tolérance dans l'utilisation chronique; perte de la capacité solvant sur la dispersion, menace importante de précipitation lors de la dilution	(Seedher & Bhatia 2003);(Nielsen et al. 2008)
Systèmes de libération			
Compléxation par des cyclodextrines	Augmente la stabilité, la mouillabilité et la dissolution des molécules hydrophobes	Possible toxicité, coût de production. Faible efficacité de compléxation (rendement faible)	(Challa et al. 2005);(Lahiani-Skiba et al. 2006)
Micelles/ Microémulsions	Relativement facile à fabriquer	Forte concentration de tensioactif / co-tensioactif	(Constantinides 1995);(Date & Nagarsenker 2008);(Kokot & Zmidzińska 2001)

Une autre technique de broyage est l'homogénéisation à haute pression (Gao et al. 2008; Lai et al. 2009; Xiong et al. 2008). Ce type de broyage est réalisé dans des chambres de collision frontale de deux courants de liquide à des pressions allant jusqu'à 1700 bar (Y ou Z format) ou à l'aide de pistons ; la dispersion (suspension) circule dans un canal cylindrique de diamètre de l'ordre de quelques centimètres (environ 2-4 cm) et passe, à une grande vitesse, par un rétrécissement brusque de canaux (de l'ordre de 3-25 microns, en fonction de la pression appliquée). Les forces de cisaillement et la cavitation mènent à la rupture des particules pour former des particules de plus petites tailles (Keck & Müller 2006; Zhang et al. 2011).

La technologie *bottom-up* comprend des méthodes de cristallisation. De fines particules sont formées par exemple par réaction chimique ou par addition d'un anti-solvant. En effet, la cristallisation par effet anti-solvant est une technique prometteuse en vue de la production de particules ultrafines. Elle a été testée avec succès pour produire des particules ultrafines de molécules peu solubles dans l'eau tels que la budésonide (Rasenack et al. 2003), le danazol (Zhao et al. 2007), le dipropionate de béclométhasone (Wang et al. 2007), la prednisolone (Li et al. 2007), l'atorvastatine calcique (Zhang et al. 2009), l'hydrocortisone (Lai et al. 2009), spironolactone (Dong et al. 2009; Dong et al. 2011), la griséofulvine et le fénofibrate (Meng et al. 2009).

Le procédé de cristallisation par effet anti-solvant a particulièrement retenu notre attention afin de réduire la taille de cristaux d'une nouvelle molécule en développement ouvrant des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et la prévention de l'infarctus du myocarde, appelée LASSBio-294. Malgré son potentiel thérapeutique, cette molécule originale peut avoir une efficacité limitée notamment de par sa faible solubilité dans les milieux aqueux. Une amélioration de ses propriétés de dissolution est envisagée de par la réduction de la taille des cristaux de la molécule synthétisée.

Avant de présenter la molécule de notre intérêt, la partie suivante de cette synthèse bibliographique s'attachera à rappeler quelques notions fondamentales de la cristallisation en solution telle que la sursaturation et les phénomènes de nucléation, de croissance cristalline et d'agglomération. Après ces quelques rappels de cristallisation en solution, nous pouvons détailler le procédé de cristallisation par effet anti-solvant et le processus de mélange solvant/anti-solvant qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail.

1.4 Rappels sur la cristallisation en solution

La cristallisation est une opération durant laquelle un changement de phase se développe et une phase solide cristalline se forme à partir d'un solide fondu ou d'une solution. Elle permet de fabriquer des cristaux dont les propriétés peuvent être finement contrôlées.

Dans l'industrie pharmaceutique, la cristallisation est une des étapes les plus sensibles. En raison de l'utilisation finale des produits pharmaceutiques, le contrôle de l'opération se doit d'être particulièrement strict. En vertu des objectifs thérapeutiques des produits, les propriétés telles que la morphologie, la structure cristalline (polymorphes), la taille des cristaux, ou encore la distribution de tailles, doivent être parfaitement maîtrisés. En effet, ces propriétés conditionnent la vitesse de dissolution in vivo des médicaments, ou biodisponibilité, et donc de ce fait l'effet du principe actif dans l'organisme.

1.4.1 *Sursaturation*

La force motrice du processus de cristallisation est la sursaturation. Elle définit l'état d'un mélange binaire soluté/solvant dont la concentration en soluté dépasse l'équilibre. Les solutions sont dans un état métastable car elles ne sont pas dans un état d'équilibre thermodynamique. Cependant, une faible perturbation peut suffire à les y amener.

La sursaturation est définie par la différence entre le potentiel chimique du solide en solution μ_i^L et le potentiel chimique du solide en solution à l'équilibre $\mu_i^{L,*}$:

$$\Delta\mu_i = \mu_i^L(T,P) - \mu_i^{L,*} \qquad \text{Équation 6}$$

La cristallisation du solide est possible lorsque le potentiel chimique du soluté en solution est supérieur à celui du solide en solution à l'équilibre ($\Delta\mu_i > 0$) (Mersmann 2001).

La différence de potentiel chimique ou force motrice de cristallisation $\Delta\mu_i$ peut être calculée à partir des concentrations en soluté dans la solution, C_i, et dans la solution saturée, C_i^*, et des coefficients d'activité dans la solution, γ_i, et dans la solution saturée, γ_i^*, et k_B la constante de Boltzmann :

$$\Delta\mu_i = k_B T \ln\left(\frac{\gamma_i C_i}{\gamma_i^* C_i^*}\right) \qquad \text{Équation 7}$$

Le rapport de sursaturation est défini par :

$$S = \frac{\gamma_i}{\gamma^*} \frac{C_i}{C_i^*}$$ Équation 8

Pour atteindre un état de sursaturation, plusieurs méthodes sont possibles : diminution de la température, évaporation du solvant, par réaction chimique ou par addition d'un anti-solvant. Cette dernière a été la méthode utilisée dans le cadre de ce travail.

1.4.2 *Nucléation*

C'est l'étape qui permet l'apparition de nouveaux cristaux dans la solution en conduisant à la formation de germes ou nuclei qui permettront la croissance cristalline. Pour que le phénomène de nucléation se produise, le mélange solvant/soluté doit être hors équilibre, dans la zone de sursaturation. Cependant, si cette condition est nécessaire, elle n'est pas suffisante pour que la nucléation spontanée se produise. Le dépassement de l'équilibre n'implique pas une nucléation instantanée.

On distinguera deux types de nucléation, la nucléation primaire qui correspond à l'apparition d'une phase cristalline non préexistante en solution, par opposition à la nucléation secondaire où les nouveaux germes proviennent de cristaux de la même phase, déjà présents en solution (Figure 1.8). La nucléation secondaire a le plus souvent lieu par attrition de cristaux fragiles ou cristallisants en aiguille. Ce phénomène est très important dans les cristallisoirs agités utilisés dans l'industrie. La nucléation secondaire peut également provenir de cristaux que l'on a rajoutés à la solution. On parle alors d'ensemencement (Veesler et al. 2005).

La nucléation joue en rôle décisif dans la détermination de la forme et de la distribution de taille de cristaux. Ainsi, la compréhension des principes fondamentaux de la nucléation est cruciale pour le contrôle du processus de cristallisation (Chen et al. 2011).

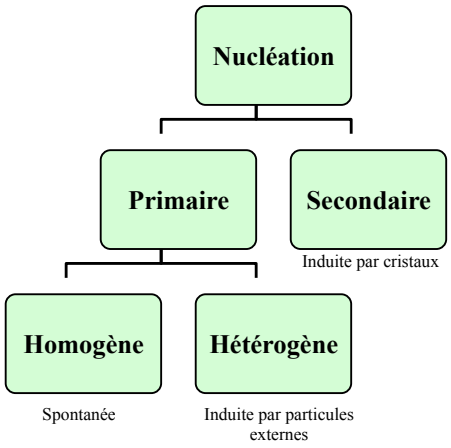


Figure 1.8. Types de nucléation.

1.4.2.1 Nucléation primaire homogène

En solution, au sens de la théorie classique de la nucléation, les molécules de soluté diffusent au hasard et finissent par se rencontrer d'autant plus facilement que la concentration et la sursaturation sont élevées. Ces molécules sont en solution à l'état de monomères, dimères, trimères, etc. Par addition successive de monomères, des oligomères ont une taille pour laquelle le qualificatif de germes cristallins peut leur être attribué. Le processus de formation de tels germes met en jeu une variation d'enthalpie libre, appelée énergie de Gibbs, ΔG. Créer un germe implique de créer un volume et une surface, ce qui met en jeu deux énergies antagonistes (ΔG_V et ΔG_S, respectivement). La solution par la sursaturation, apporte l'énergie de volume mais, dans le même temps, le germe offre une certaine résistance, tendant à diminuer son énergie de surface (Veesler et al. 2005; Chen et al. 2011). Considérant que le germe formé est une sphère de rayon *r*, la variation d'enthalpie libre de formation d'un germe supposé sphérique de rayon r est donnée en termes de volume et surface par :

$$\Delta G = \Delta G_S + \Delta G_V = 4\,\pi\, r^2 \gamma_{sl} + \frac{4\,\pi\, r^3}{3\,V_m} k_B T\ \ln(S) \qquad \text{Équation 9}$$

avec V_m le volume moléculaire du solide et γ_{sl} l'énergie interfaciale entre le solide et le liquide. Afin de trouver le rayon critique pour lequel un nucleus peut croître, la dérivée ΔG par rapport au rayon *r* du nucleus doit être nulle. On peut établir l'expression de ΔG_{crit}^{hom} de la façon suivante :

$$\Delta G_{crit}^{\text{hom}} = \frac{16\pi\gamma_{sl}^{3} V_m^{2}}{3\left(k_B T \ln(S)\right)^{2}}$$ Équation 10

La Figure 1.9 montre la compétition entre les deux termes. A l'équilibre, on obtient la taille du germe critique. Ce germe est en équilibre instable. Si l'on lui ajoute une molécule, il croît spontanément, mais si l'on lui retire une molécule, il se dissout spontanément, puisque dans les deux cas il y a diminution de l'enthalpie libre du système (Veesler et al. 2005).

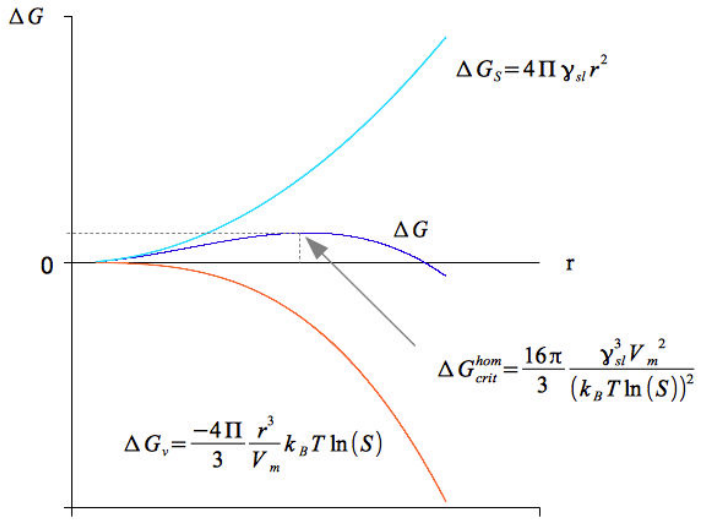


Figure 1.9. Enthalpie libre d'activation de nucléation homogène en fonction du rayon du solide.

La vitesse à laquelle apparaissent les germes, c'est-à-dire la vitesse de nucléation primaire homogène stationnaire *J*, est donnée par l'équation 11 (Lindenberg & Marco Mazzotti 2009; Thorat & Dalvi 2012; Dalvi & Dave 2010). En outre, on peut voir, d'après cette équation, que la vitesse de nucléation dépend principalement du rapport de sursaturation, de la température et de l'énergie interfaciale cristal/solution :

$$J = A_{\text{hom}} \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{crit}}}{k_B T}\right) = A_{\text{hom}} \exp\left(-\frac{16\pi\gamma^{3} V_m^{2}}{3k_B^{3} T^{3}\left(\ln(S)\right)^{2}}\right)$$ Équation 11

où A est un paramètre cinétique qui dépend du mécanisme de fixation de soluté à la surface des particules en croissance. Une expression de ce coefficient est donnée par l'équation suivante (Dalvi & Dave 2010) :

$$A_{hom} = \left(\frac{4}{3}\right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\gamma_{sl}}{k_B T}\right)^{\frac{1}{2}} D_{AB} C^{*} N_A \qquad \text{Équation 12}$$

où N_A est le nombre d'Avogadro et D_{AB} est le coefficient de diffusion du soluté supposée sphérique. Ce coefficient peut être calculé par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D_{AB} = \frac{k_B T}{6\pi r_c \mu} \qquad \text{Équation 13}$$

où μ la viscosité dynamique du fluide et r_c le rayon du germe critique.

Il est important d'examiner les implications pratiques de ces équations pour la formation d'un nucleus dans des solutions sursaturées. Le rayon critique r_c et la variation d'enthalpie libre critique ΔG_{crit}^{hom} sont inversement proportionnels au rapport de sursaturation. Par conséquent, plus le rapport de sursaturation est élevé plus ΔG_{crit}^{hom} est petit ce qui fait augmenter la vitesse de nucléation *J*.

D'autre part, la vitesse de nucléation *J* dépend fortement de la tension interfaciale cristal/solution : ΔG_{crit}^{hom} est proportionnelle à γ_{sl} au cube. Cette tension interfaciale dépend de la nature du solvant utilisé. Lorsque γ_{sl} augmente, la barrière d'énergie pour la formation du noyau augmente, ce qui diminue la vitesse de nucléation. Enfin, la vitesse de nucléation *J* augmente avec l'augmentation du coefficient de diffusion $D_{AB.}$ On s'attendrait donc à une nucléation plus rapide dans les solvants de faible viscosité (McClements 2012).

1.4.2.2 Nucléation primaire hétérogène

La nucléation primaire hétérogène implique l'intervention d'un substrat pour générer un nouveau germe. Ce substrat peut être une paroi du cristallisoir, une poussière, ou même un cristal (d'une autre phase).

La variation d'enthalpie libre pour une nucléation hétérogène $\Delta G_{crit}^{hét}$ est inférieure à celle d'un processus de nucléation homogène (Mersmann 2001). Elle est proportionnelle au ΔG_{crit}^{hom} (Veesler et al. 2005) :

$$\Delta G_{crit}^{hét} = f \Delta G_{crit}^{\text{hom}} \qquad \text{Équation 14}$$

Le facteur géométrique correctif *f* tient compte de l'angle de contact ou de mouillage entre le germe et la surface étrangère.

La nucléation primaire hétérogène se fera donc plus facilement que la nucléation primaire homogène et ce d'autant que le germe présentera plus d'affinité avec le substrat (Veesler et al. 2005).

1.4.2.3 Nucléation secondaire

La nucléation d'une solution légèrement sursaturée est plus rapide quand il y a déjà des cristaux de soluté en suspension.

Parmi les mécanismes de nucléation secondaire, on peut citer :

- la nucléation secondaire vraie : elle correspond à la formation de nuclei à partir de la solution due à une modification de l'état d'équilibre de la distribution des agrégats en solution par la présence de cristaux en solution.

- la nucléation secondaire de contact : elle se traduit par l'arrachement d'agrégats moléculaires de la surface des cristaux parents présents provoqué par contact des cristaux entre eux ou avec la surface du cristallisoir.

- la nucléation secondaire apparente : elle concerne plus particulièrement les cristallisations ensemencées. Il n'y a dans ce cas pas de réelle formation de germes. Les nuclei dits apparents sont des fragments cristallins qui proviennent de la surface des cristaux de semence qui sont séparés de ceux-ci après leur mise en suspension (à cause notamment de l'agitation).

1.4.3 *Croissance*

Lorsque le cristal a dépassé la taille critique, il se met à croître en incorporant des molécules de soluté supplémentaires à l'interface solide-liquide. Cette croissance durera tant que le milieu restera sursaturé (McClements 2012). Pendant ce processus dynamique le nombre d'unités qui s'attache au cristal est supérieur au nombre qui s'en détache (Veesler et al. 2005).

Les cristaux ont des faciès différents, et chaque face se développe habituellement à un rythme différent, selon le milieu de cristallisation mais aussi la nature des interactions qui la forme et les défauts émergeants à sa surface. Ceci explique en partie la grande variété de formes cristallines qui se forment (McClements 2012).

La vitesse de croissance cristalline globale peut se décomposer en différentes étapes :

a) le transfert de matière des molécules du liquide vers l'interface solide-liquide ;

b) le transfert de matière des espèces non-cristallisant de l'interface vers la solution

c) l'incorporation des molécules au réseau cristallin (McClements 2012).

Un modèle courant utilisé dans le domaine industriel est le modèle du film. Il repose sur l'existence d'un film de solution et d'une couche d'adsorption entourant le cristal. Le soluté traverse le film d'épaisseur par diffusion volumique, puis migre dans la couche d'adsorption d'épaisseur par diffusion surfacique à la recherche d'un site d'intégration. Au-delà du film, la concentration varie dans le film de diffusion volumique jusqu'à la concentration C_i dans la couche d'adsorption. La concentration à la surface du solide est supposée égale à la concentration à l'équilibre C* (Mersmann 2001; Veesler et al. 2005) (Figure 1.10).

Par exemple, la vitesse de croissance G (m/s) d'une particule sphérique, dans le cas d'une limitation diffusionnelle, peut être calculée par :

$$G = 2D_{AB}V_m\frac{\left(C_i - C_i^*\right)}{r} \qquad \text{Équation 15}$$

Le régime de croissance se rapproche d'un régime diffusionnel avec l'augmentation de la sursaturation, de la solubilité, de la taille de cristaux ou de la température. Tandis qu'avec

l'augmentation de la puissance spécifique dissipée par l'agitateur ou de la concentration en inhibiteur de croissance, le régime est plutôt limité par l'intégration.

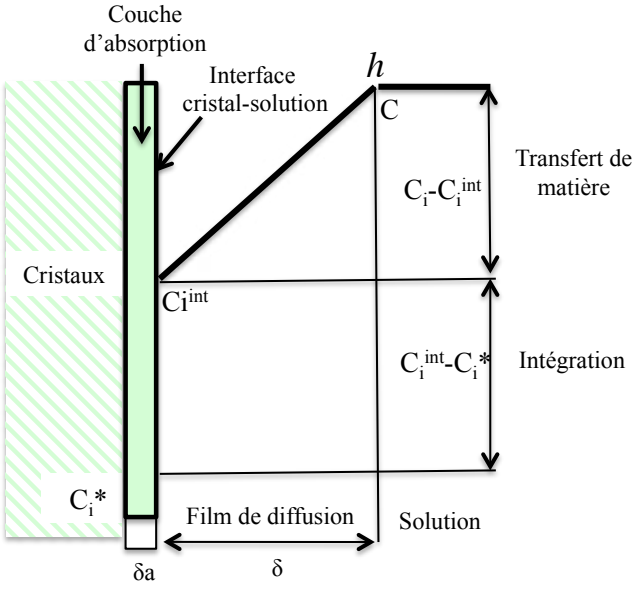


Figure 1.10. Profil de concentration autour d'un cristal dans le cas du modèle du film (Modifiée de Veesler et al. 2005).

1.4.4 *Agglomération*

Contrairement à la nucléation et la croissance, l'agglomération n'est pas un phénomène présent dans tous les processus de cristallisation. Son existence dépend du système et des conditions de cristallisation. Pour la formation d'un agglomérat, trois étapes successives sont nécessaires : la collision, l'association ou attachement (agrégation) et la consolidation entre les particules par des ponts solides (Figure 1.11) (Mersmann 2001; Veesler et al. 2005).

La collision de particules est liée au mécanisme de transport des particules : mouvement Brownien ou mouvement du fluide.

L'agrégation par diffusion Brownienne correspond à l'agrégation péricinétique. Le cisaillement dû à l'hydrodynamique du fluide porteur (laminaire ou turbulent) induit une agrégation dite orthocinétique (Elimelech et al. 1995). Ces deux mécanismes sont compétitifs et comme nous le verrons plus loin si la diffusion Brownienne l'emporte pour les petites particules, c'est l'inverse pour les grosses particules.

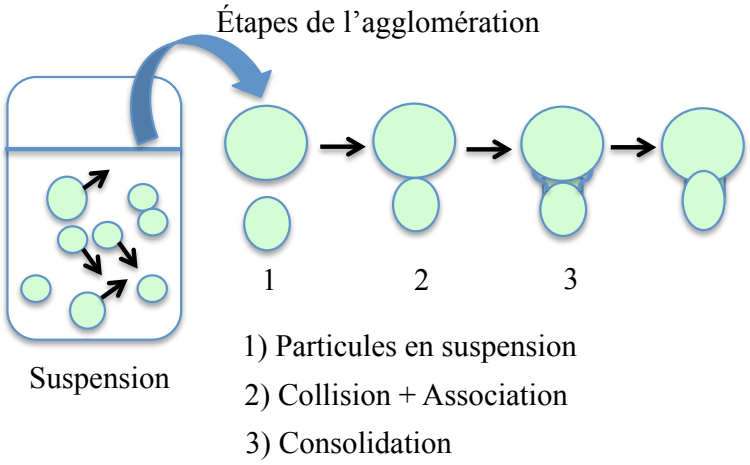


Figure 1.11. Mécanisme d'agglomération de deux particules (Modifiée de Veesler et al. 2005).

L'attachement est la conséquence d'interactions colloïdales qui sont sensibles à une distance plus petite que la taille de la particule. Les particules ont donc besoin de se rapprocher pour que l'interaction soit significative. Après collision, les interactions entre les particules doivent être telles qu'il y ait formation d'un contact permanent (interactions du type Van der Waals ou attraction hydrophobique). Il existe aussi des forces de répulsion qui empêchent la formation de l'agrégat (répulsion électrique). La nature de ces interactions dépend de la surface de la particule et de la chimie de la solution (pH, force ionique) (Mersmann 2001).

La plupart des modèles de vitesse d'agglomération sont basés sur le travail de Von Smoluchowski (1917), qui établit le mécanisme d'agglomération comme bi-particulaire. Le nombre de collisions r_{ij} de deux particules de taille L_i et L_j est donnée par l'équation suivante (Mersmann 2001) :

$$r_{ij} = k_{ij} N_i N_j \qquad \text{Équation 16}$$

où N_i et N_j sont, respectivement, les concentrations (nombre de particules par unité de volume) des particules de taille L_i et L_j. k_{ij} est la constante d'agglomération ou noyau d'agglomération qui dépend de la taille des particules et de leur mécanisme de transport (Mersmann 2001).

Plusieurs paramètres peuvent donc influencer le processus d'agglomération, comme : les conditions hydrodynamiques (mélange, turbulence locale…), la nature du solvant (viscosité), la taille des cristaux, le nombre de cristaux, le rapport de sursaturation et la vitesse de croissance et, également les forces de cohésion entre le solvant, les impuretés et les cristaux.

1.4.4.1 Mécanismes de collision

1.4.4.1.1 Collision péricinétique

Lorsque les particules sont de taille submicronique (L < 0,5 µm), le mécanisme de collision est lié au mouvement brownien des particules. Il s'agit d'un processus de type diffusionnel qui peut donc se produire en milieux stagnant ou agité. Le mouvement des particules est composé d'une série de parcours indépendants et aléatoires, conséquences de la collision entre les particules et les molécules de fluide autour de la particule (Elimelech et al. 1995; David et al. 2003).

La constante de vitesse de collision en régime péricinétique est la suivante (David et al. 2003) :

$$k_{bij} = \frac{2k_B T}{3\mu} \frac{\left(L_i + L_j\right)^2}{L_i L_j} \qquad \text{Équation 17}$$

La transition entre les régimes Brownien et laminaire est définie par une taille appelée échelle de Batchelor qui correspond à l'égalité des temps caractéristiques de la diffusion et du cisaillement laminaire. L'échelle de Batchelor (l_B) se calcule par l'équation suivante (David et al. 2003) :

$$l_B = \left(\frac{\nu D_{AB}^2}{\varepsilon}\right)^{\frac{1}{4}} \qquad \text{Équation 18}$$

où ε est la puissance moyenne dissipée et ν la viscosité cinématique de la solution (= µ/ρ où ρ est la masse volumique).

En-dessous de la distance l_B, la diffusion est le phénomène prépondérant pour le rapprochement entre deux particules, alors qu'au-dessus de l_B, c'est l'étirement laminaire.

1.4.4.1.2 Collision orthocinétique

Pour des particules plus grandes ($L > l_B$) et en milieu agité turbulent, deux autres mécanismes prendront le relais :

- Si les particules restent plus petites que la micro-échelle de turbulence (l'échelle de Kolmogoroff), les collisions se produiront entre les particules contenues dans les micro-tourbillons créés par la turbulence. À l'intérieur de ces tourbillons, le fluide subit un cisaillement laminaire uniforme. L'agglomération sera alors induite par le champ de cisaillement et concernera uniquement les particules d'un même tourbillon.

- Lorsque les particules sont plus grandes que la micro-échelle de turbulence, elles sont transportées par des tourbillons de plus grandes tailles qui s'interpénètrent et projettent ainsi les particules les unes contre les autres (Veesler et al. 2005).

L'échelle de Kolmogoroff l_k caractérise la limite entre les tourbillons turbulents et le mélange laminaire. Pour les structures de fluide de taille inférieure à l_k, les distances sont suffisamment faibles entre les points extrêmes de la structure pour que les vitesses ne fluctuent plus l'une par rapport à l'autre.

La taille de Kolmogoroff l_k est calculée par l'équation (David et al. 2003) :

$$l_k = \left(\frac{\upsilon^3}{\varepsilon}\right)^{\frac{1}{4}} \qquad \text{Équation 19}$$

La constante de vitesse de collision orthocinétique entre deux particules L_i et L_j est donnée par l'équation (David et al. 2003) :

$$k_{lij} = 0{,}16\left(L_i + L_j\right)^3\left(\frac{\varepsilon}{\upsilon}\right)^{\frac{1}{2}} \qquad \text{Équation 20}$$

1.4.4.2 Efficacité d'agglomération

Une fois les particules au contact l'une de l'autre, elles doivent rester associées au moins sur une certaine durée, pour que la collision se produise (Mersmann 2001). L'efficacité de l'association est liée aux interactions physico-chimiques entre les particules et/ou aux interactions hydrodynamiques (Arsic et al. 2003).

Au moment de la collision, en raison des forces interparticulaires et des tailles relatives de particules, toutes les collisions ne conduisent pas à la formation d'un agrégat (efficacité de collision : $\alpha \neq 1$). S'il existe une forte répulsion entre les particules, l'efficacité de collision est nulle. Quand il existe des forces d'attraction entre les particules et que les forces de répulsion ne sont pas trop intenses, l'efficacité de collision est proche de 1 (Elimelech et al. 1995). En milieu sursaturé, la croissance des cristaux permet la consolidation de l'agrégat pour former ainsi l'agglomérat.

1.5 Cristallisation par effet anti-solvant

La cristallisation par effet anti-solvant se déroule par des étapes de mélange de la solution avec l'anti-solvant, production de la sursaturation, nucléation et croissance, suivie de l'agglomération (Figure 1.12). Une information complète sur la solubilité de la substance en fonction de la concentration en anti-solvant est requise avant de procéder à la cristallisation. Il doit y avoir une différence significative entre la solubilité de la molécule dans le solvant et dans l'anti-solvant. De plus, dans ce processus, des transferts de matière, des facteurs mécaniques et des phénomènes cinétiques sont en compétition pour assurer la production de cristaux (Klein et al. 1994).

La sursaturation ainsi obtenue peut être très importante et cela d'autant plus que la solubilité du composé obtenu est plus faible. En particulier au point d'alimentation, la sursaturation peut être suffisamment forte pour qu'on se situe dans la zone de nucléation spontanée. Il se produit alors essentiellement une nucléation primaire au point d'alimentation, ce qui se traduit par des cristaux très nombreux et très petits (Klein et al. 1994). Toutefois, lorsque la solution est ajoutée dans l'anti-solvant, elle n'est pas dispersée immédiatement et des zones de fortes sursaturations locales sont produites (Dhumal et al. 2008).

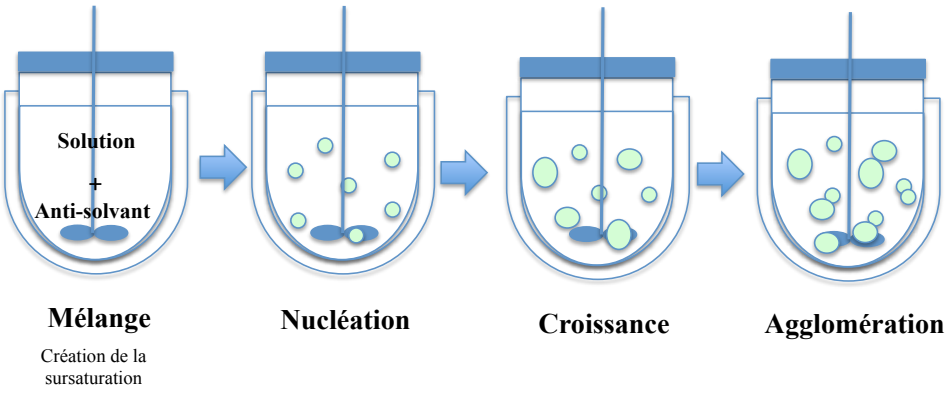


Figure 1.12. Schéma du procédé de cristallisation.

Les propriétés essentielles des cristaux tels que la taille, la morphologie et la pureté dépendent de façon significative de la vitesse, de l'amplitude et de l'uniformité de la sursaturation générée pendant le processus de cristallisation (Thorat & Dalvi 2012). Ce phénomène est très sensible à l'hydrodynamique et donc au mélange de l'échelle macroscopique (macro-mélange) à l'échelle moléculaire (micro-mélange) (Klein et al. 1994).

Lorsque la formation de particules est contrôlée par le processus de mélange, à savoir que le temps de mélange est supérieur à la durée de cristallisation, le procédé de mélange est plus lent que le processus de précipitation et la sursaturation est atteinte à une vitesse lente. Il en résulte une prédominance de la croissance des particules et la formation de gros cristaux. D'un autre côté, si le temps de mélange est plus petit que la durée de la cristallisation, la solution est mélangée de manière uniforme entraînant à la fois la sursaturation et la nucléation. Il en résulte des particules de plus petite taille. Par conséquent, il est nécessaire de diminuer le temps de mélange pour obtenir de petites particules, voire nanométriques, avec une distribution de taille étroite (Thorat et Dalvi, 2012).

Dans le procédé de cristallisation, il est donc souhaitable d'avoir un mélange rapide et homogène de façon à obtenir une distribution uniforme de la concentration dans le réacteur et, également de la nucléation et de la taille des particules. Deux approches d'utilisation sont rapportées pour favoriser le mélange : l'utilisation de dispositifs de mélange (Johnson & Prud'homme 2003; Lindenberg et al. 2008; Beck et al. 2010) et l'introduction des ultrasons pendant le processus de cristallisation (Dalvi & Dave 2009; Verma et al. 2009).

Cependant, l'effet de sursaturation sur la taille finale des particules dépend uniquement de la façon dont la sursaturation est atteinte. Le degré de sursaturation peut être changé soit en modifiant certains paramètres de la phase anti-solvant (volume, température) et / ou de la phase de solvant (volume, concentration) (Zhang et al. 2006; Zhao et al. 2007; Dong et al. 2009; Zhang et al. 2009).

1.5.1 *Mode d'addition du solvant et de l'anti-solvant*

Dans les cristallisations par effet anti-solvant, le mélange est l'un des facteurs les plus importants contrôlant le processus de cristallisation. Deux formes de mélange peuvent être effectuées pour la mise en contact de la solution avec l'anti-solvant : simple jet et double jet (Figure 1.13).

La configuration simple jet est la manière la plus simple par lequel le premier fluide est injecté dans la cuve agitée contenant le deuxième fluide. Alternativement, deux solutions peuvent être pré-mélangées avant d'entrer dans le réservoir d'un seul jet. Les deux configurations d'alimentation présentent différents profils de sursaturation temporelle et spatiale.

Pour l'obtention de cristaux très fins, le solvant et l'anti-solvant doivent être mélangés dans une région ayant la puissance d'entrée maximale (Mersmann, 1999) (Douroumis & Fahr 2007). Divers types de mélangeurs sont décrits dans la littérature pour le contrôle du processus de cristallisation, tels que les mélangeurs statiques (Douroumis & Fahr 2007; Dong et al. 2009), la précipitation à haute gravité (Zhao et al. 2007), le jet confiné (Lince et al. 2009; Lince et al. 2011), le mélangeur vortex multi jet (MIVM) (Liu et al. 2008), le mélangeur en Y (Lindenberg et al. 2008), le mélangeur vortex double jet (mélangeur Roughton) (Lindenberg et al. 2008; (Wei et al. 2012) et le mélangeur en T (Liu et al. 2010) (Ashar Sultan et al. 2012; Wei et al. 2012).

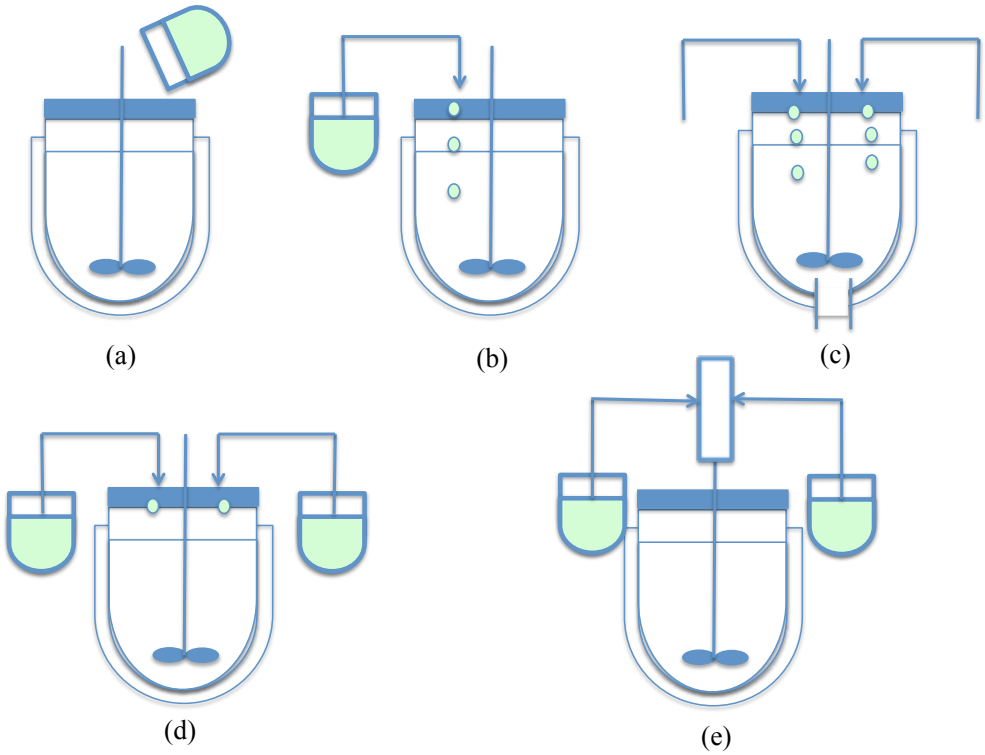


Figure 1.13. Différents types de configurations pour le mélange de la solution avec l'anti-solvant.
(a) Simple jet en mode fermé addition rapide; (b) Simple jet en mode semi-fermé; (c) Double jet en mode continu (d) Double jet en mode semi-fermé; (e) Double jet en mode semi-fermé avec pré-mélangeur (Adaptée de Mersmann 2001).

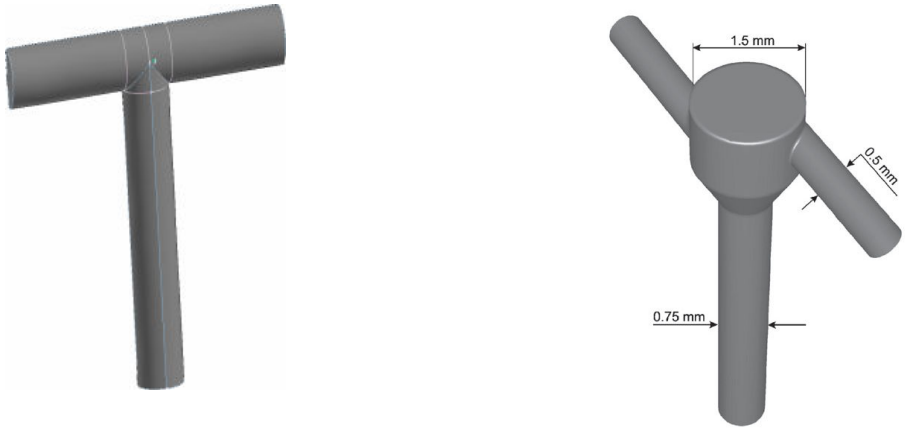
Ces types de dispositifs peuvent intensifier le mélange et la formation de nanoparticules par réduction de la longueur de diffusion entre le solvant et l'anti-solvant (Zhao et al. 2007). Le temps de mélange généralement de l'ordre de quelques millisecondes peut passer à quelques microsecondes par l'utilisation de tels dispositifs de mélange. Le mélange rapide aide à la réalisation d'une sursaturation en un court délai induisant la formation de nanoparticules (nucléation massive).

Pour la cristallisation de la molécule de notre intérêt deux types de dispositifs de mélange sont utilisés : le mélangeur Roughton et le mélangeur type T.

Le mélangeur Roughton a été proposé par Söhnel et Garside (1992) pour les processus de précipitation avec cinétiques rapides de nucléation et croissance (Figure 1.14). Basé sur ce dernier travail, une nouvelle géométrie du Roughton a été développée (Schöll et al. 2006). Les effets de micro-mélange dans ce type de mélangeur ont été étudiés avec la précipitation de la

lovastatine (Mahajan & Kirwan 1996). Dans leur configuration un temps de micro-mélange de 65 ms a été atteint. Plus tard, les rendements de réaction et les temps de mélange du Roughton ont été comparés avec celui d'un mélangeur Y (Lindenberg et al. 2008). Les auteurs ont constaté que le mélangeur Roughton présente une meilleure performance au niveau du mélange par rapport au mélangeur en Y. Des simulations ont montré que des temps de mélange inférieur à 1 ms peuvent être obtenus avec le mélangeur Roughton.

Des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) ont été obtenus en utilisant ce type de mélangeurs (Wei et al. 2012). Dans une autre étude, la cristallisation anti-solvant d'un rétroviral a été réalisée avec le mélangeur Roughton (De Paiva Lacerda 2013).



Type T Roughton

Figure 1.14. Illustration des pré-mélangeurs (Lindenberg et al. 2008).

1.5.2 *Le processus de mélange*

1.5.2.1 Hydrodynamique d'une suspension

Le mouvement des particules dans un cristallisoir dépend de la dynamique du fluide caractérisée par la vitesse moyenne dans le cristallisoir v, et la valeur moyenne de la fluctuation de vitesse v_{eff}, toutes deux étant proportionnelles à la vitesse de l'agitateur u (Mersmann 2001).

Pour un mobile d'agitation, le nombre de Reynolds est proportionnel à la vitesse de rotation de l'agitateur *u* et au diamètre D de l'agitateur divisé par la viscosité cinématique ν (Mersmann 2001) :

$$\mathrm{Re} = \frac{uD^2}{\nu}$$ Équation 21

Selon la valeur du nombre de Re, on distinguera trois régimes hydrodynamiques : laminaire (Re < 10), intermédiaire (10 < Re < 10^4) et turbulent (Re >10^4) (Roustan et al. 1999).

Le régime laminaire se traduit par l'absence de mouvement du fluide dans une direction différente de celle imposée par le mobile d'agitation. Le seul mélange qui puisse se faire entre les couches parallèles au courant est dû uniquement à la diffusion moléculaire et est indépendant de la puissance fournie qui, d'ailleurs, est dissipée sous forme de chaleur (Roustan et al. 1999).

Le régime turbulent se caractérise par de mouvements dans toutes les directions et donc par un bon mélange des filets fluides.

L'énergie cinétique d'un écoulement turbulent est transformée en énergie interne du fluide par dissipation visqueuse. Celle-ci est liée à la puissance dissipée **ε'** (W) par le mobile d'agitation donnée par l'équation (Mersmann 2001) :

$$\varepsilon' = N_p \rho u^3 D^5$$ Équation 22

où N_p est le nombre de puissance de l'agitateur.

La puissance moyenne dissipée par unité de masse de fluide ε est donné par :

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon'}{\rho V}$$ Équation 23

où V le volume de solution dans la cuve.

1.5.2.2 Macro et micro-mélange

Le processus de mélange est une façon de démarrer, accélérer et améliorer des phénomènes physico-chimiques d'un système. Il s'agit d'un processus physique dans le but de

produire le montant maximal d'une zone interfaciale entre deux courants de fluides distincts dans le minimum de temps ou en utilisant le moins d'énergie.

Dans un cristallisoir (continu ou discontinu), il existe trois niveaux de mélange : macro-mélange, le méso-mélange et micro-mélange. Le macro-mélange est responsable de l'uniformisation de la valeur locale moyenne de la concentration des espèces chimiques, composé par la dispersion de champ de vitesse (échelle de taille : cm ; échelle de temps : 1-10 s). Le méso-mélange consiste à la réduction de la taille des tourbillons (échelle de taille mm ; échelle de temps : 0,1-1 s). Le micro-mélange est caractérisé par des étirements et enroulements des tourbillons (échelle de taille : 10-100 µm ; échelle de temps : 10^{-2}-10^{-1} s ; échelle de Kolmogorov) suivi du micro-mélange par diffusion moléculaire (échelle de taille 0,5-5 µm ; échelle de temps : 10^{-3}-10^{-2} s; échelle Batchelor). La sursaturation est le résultat des étapes de micro-mélange responsables du contact moléculaire entre les réactifs (Mersmann 2001; Thorat & Dalvi 2012). Les cristallisations dont les sursaturations sont créées par addition d'un anti-solvant ou par réaction chimique seront donc très sensibles au mélange.

Le procédé de mélange débute par le macro-mélange, la taille des agrégats diminue (mais le volume total d'agrégats reste constant). L'échelle de ségrégation est ainsi réduite, mais pas l'intensité de ségrégation. En effet, il y a un peu d'échange de matière entre un agrégat et son environnement car la surface d'échange est trop faible. Le mélange continue alors : plus les agrégats sont petits plus la diffusion prend de l'importance dans le procédé de mélange. C'est à ce moment que l'intensité de ségrégation commence à diminuer. Lorsque la longueur caractéristique des agrégats devient inférieure à la micro-échelle de Kolmogoroff, la diffusion moléculaire devient le processus essentiel de mélange : c'est l'étape de micro-mélange (Mersmann 2001).

Afin d'apprécier quel va être le régime hydrodynamique prépondérant dans une cristallisation dans une cuve agitée, il convient de calculer les limites entre les différentes tailles des structures du fluide et de les comparer à la taille du solide en suspension.

1.5.2.3 Temps caractéristiques

Le processus de cristallisation est souvent décrit par deux échelles de temps : le temps de mélange ($t_{mél}$) et le temps d'induction (t_{ind}).

Le temps d'induction (t_{ind}) dans une opération de cristallisation est l'intervalle de temps existant entre la création de la sursaturation et l'apparition des premiers nuclei. Ce temps dépend des cinétiques de mélange, de réaction, de nucléation et de croissance (Mersmann 2001). Si on considère que l'effet du mélange est négligeable, le t_{ind} peut se décomposer en deux temps : le temps de nucléation (t_N) et le temps de croissance (t_G) (Thorat & Dalvi 2012).

$$t_{ind} = t_N + t_G \qquad \text{Équation 24}$$

Le t_{ind} peut être estimé par l'équation 24 à partir de la valeur du diamètre moléculaire ou ionique du soluté, d_m, de la sursaturation et du coefficient de diffusion D_{AB} du soluté dans le milieu (Mersmann 2001).

$$t_{ind} \approx \frac{80 d_m^2}{D_{AB} \ln S} \qquad \text{Équation 25}$$

Dans le procédé de cristallisation, l'échelle de temps de la nucléation primaire ($t_{nucléation}$) (réaction rapide) varie en général entre 10^{-6} et 10^{-3} s et celle de la croissance cristalline ($t_{croissance}$) entre 0,1 et plusieurs secondes. La comparaison entre les échelles de temps des étapes de formation de la sursaturation et les échelles des processus de nucléation et croissance montre que le micro-mélange influence plus ou moins la nucléation bien plus rapide que la croissance.

Dans une cuve agitée, le temps de mélange en régime turbulent est estimé avec l'équation suivante (Mersmann 2001) :

$$t_{macro,turbulent} = 7{,}3 \left(\frac{T^2}{\overline{\varepsilon}} \right)^{\frac{1}{3}} \qquad \text{Équation 26}$$

où Sc est le nombre de Schmidt ($=\nu/D_{AB}$) et $\overline{\varepsilon}$ est la puissance moyenne donnée par l'équation :

$$\bar{\varepsilon} = \frac{4}{\pi} N_p u^3 D^2 \left(\frac{D}{T_c}\right)\frac{D}{H} \qquad \text{Équation 27}$$

où D est le diamètre de l'agitateur, H la hauteur de liquide dans la cuve et T_c le diamètre de la cuve.

Le temps de mélange dans le mélangeur Roughton peut être calculé par la corrélation donnée par Lindenberg (2008) (Lindenberg 2009) :

$$t_{mél} = 1100 \frac{d_j^{0,5} \nu^{0,5}}{u_j^{1,5}} \qquad \text{Équation 28}$$

où d_j est le diamètre d'entrée dans le pré-mélangeur (1 mm), ν la viscosité cinématique après mélange complet u_j la vitesse moyenne. Pour des ratios volumiques solvant/anti-solvant différents de 1, la u_j est calculée en supposant une énergie cinétique équivalente Lindenberg (2008) (Lindenberg 2009) :

$$u_j = \left(\frac{u_{aqueuse}^3 + u_{organique}^3}{2}\right)^{1/3} \qquad \text{Équation 29}$$

où $u_{aqueuse}$ et $u_{organique}$ sont les vitesses d'entrée dans le pré-mélangeur respectivement de la phase organique et de la phase aqueuse.

1.5.3 *La cristallisation anti-solvant assistée par ultrasons*

Les ultrasons de puissance engendrent dans un liquide la naissance et l'oscillation très violente de milliards de petites bulles de gaz, phénomène appelé cavitation. Ces bulles sont créés près du transducteur. Le cycle d'une de ces bulles sur une période acoustique consiste en une phase explosive suivie d'une implosion violente. Les principales caractéristiques de la cristallisation en présence d'ultrason sont (a) l'augmentation de la nucléation primaire à sursaturation modérée (b) la réduction du temps d'induction, (c) l'initiation de la nucléation secondaire, (d) la production uniforme de cristaux de plus petite taille (Luque de Castro & Priego-Capote 2007; Thorat & Dalvi 2012; Dodds et al. 2007). Il a été également signalé que

les ultrasons modifient le mélange, la croissance des cristaux, la taille des particules, et l'agglomération.

Il est important de noter que les mécanismes d'action des ultrasons sont mal connus. Plusieurs hypothèses sur l'effet des ultrasons sur la nucléation sont proposées dans la littérature :

- Effet thermodynamique : le refroidissement important au voisinage de la bulle lors de la phase d'expansion de la bulle, avec des vitesses de refroidissement extrêmement rapides, ou la forte augmentation de la pression en fin d'implosion pourraient modifier la sursaturation dans le liquide au voisinage de la bulle (Virone et al. 2006).

-Effet cinétique : la ségrégation de molécules de soluté due aux fortes accélérations du liquide au voisinage de la bulle à la fin de l'implosion (10^{12} g) ou l'augmentation du coefficient de diffusion du soluté pourraient modifier le mécanisme d'agrégation des molécules au voisinage de la bulle, modifiant ainsi la vitesse de nucléation (Guo et al. 2005; Virone et al. 2006; Grossier et al. 2007).

Les ultrasons ont été utilisés dans divers travaux pour induire la cristallisation de molécules pharmaceutiques, telles que la nitrendipine (Xia et al. 2010), la roxithromycine (Guo et al. 2005) ; le sulfate de salbutamol (Dhumal et al. 2009), la céfuroxime axétil (Dhumal et al. 2008), la camptothécine (Zhang et al. 2011), l'itraconazole, la fénofibrate, la griséofulvine, le palmitate d'ascobyle, la sulfaméthoxazole (Beck et al. 2010), la griséofulvine (Dalvi & Dave 2009); l'itraconazole, la griséofulvine, l'ibuprofène, la sulfaméthoxazole (Dalvi & Dave 2010) et l'itraconazole, l'odanacatib (Kumar et al. 2009).

Dalvi et Dave (2009) ont montré que pendant la cristallisation de la griséofulvine le temps de mélange de 8413 ms a été obtenu en l'absence des ultrasons, alors qu'avec l'application d'ultrasons, le temps de mélange diminue à ~ 0,5 et 0,8 ms.

Beck et al. (2010) ont également rapporté une réduction significative du temps de mélange lors de l'application des ultrasons pour la cristallisation de plusieurs molécules pharmaceutiques, en utilisant un mélangeur type T. Des temps de mélange de l'ordre de ~ 0,01 ms ont été obtenus.

En outre, Dhumal et al. (2008) ont rapporté l'augmentation du taux de mélange et de transfert de matière due aux ultrasons pendant la cristallisation du céfuroxime axétil.

Le temps d'induction est considérablement réduit par la présence des ultrasons (Guo et al. 2005; Dodds et al. 2007; Beck et al. 2010; Luque de Castro & Priego-Capote 2007).

Une des hypothèses proposées est que la diminution du temps d'induction est principalement due à la diffusion accélérée des molécules de soluté (Guo et al. 2005; Beck et al. 2010). Dans le travail de Guo et al. (2005), le D_{AB} est augmenté 3,82 fois avec l'application d'ultrasons, tandis que la constante de nucléation est augmentée 4,25 fois. De plus, la zone métastable est réduite en présence d'ultrasons, ce qui suggère une induction de la nucléation homogène pour la formation de particules de roxithromycine. Dalvi et Dave (2010) ont également rapporté l'augmentation du taux de nucléation en raison de l'augmentation de D_{AB} du soluté par application d'ultrasons. De même, l'augmentation du taux de nucléation en raison d'application des ultrasons est décrit pendant la cristallisation de l'anti-solvant du sulfaméthizole (Yeo & Lee 2004).

Les ultrasons sont de plus en plus utilisé pour contrôler la taille des particules, la distribution de taille ainsi que les faciès de cristaux (Guo et al. 2005). La réduction de la taille et de la distribution de taille en raison de l'utilisation des ultrasons a été rapporté pour la cristallisation du sulfate de salbutamol (Dhumal et al. 2009), de l'acide adipique (Narducci et al. 2011) et du lactose (Patel & Murthy 2011) .

Les ultrasons augmentent le transfert de matière du soluté à la surface du cristal en croissance. Par conséquent, la taille des cristaux et la distribution des cristaux change en présence d'ultrasons. Il a été également rapporté que la croissance du cristal est contrôlée à l'aide d'ultrasons car elle augmente la vitesse de nucléation et décompose les agglomérats (Luque de Castro & Priego-Capote 2007).

Généralement, lorsque l'amplitude d'ultrasons augmente la taille moyenne diminue. Cette diminution de la taille des particules peut être attribuée à l'intensification du micro-mélange qui favorise les transferts de masse et la diffusion entre le solvant et anti-solvant, ce qui induit des taux élevés de sursaturations instantanées et donne lieu à une nucléation rapide intensifiée. Comme le nombre de noyaux primaires augmente, la quantité de soluté déposée sur chaque noyau primaire diminue, diminuant ainsi la taille du cristal final (Dhumal et al.

2009). Les ultrasons peuvent améliorer le micro-mélange à faible vitesse d'agitation dans le cas d'une phase aqueuse. A forte vitesse d'agitation, cet effet disparaît (Gatumel 1997).

L'effet de l'augmentation de la concentration en présence d'ultrasons a été également étudié par Dhumal et al. (2009). Les valeurs de taille des particules sont réduites avec l'augmentation de la concentration jusqu'à un certain niveau. A partir de ce niveau, plus la concentration est haute, plus le point de sursaturation est proche et plus la force d'entraînement pour la nucléation est forte.

Lorsque l'on atteint rapidement des conditions très sursaturées par le mélange de la solution avec l'anti-solvant, quelques zones de sursaturations excessives peuvent être générées menant à l'agglomération de noyaux, avant que les ultrasons fournissent un mélange microscopique uniforme par les vibrations et la cavitation dans tout le réacteur. Bien que la croissance et la nucléation de cristaux aient lieu de manière homogène sous l'influence des ultrasons, les cristaux cultivés sur les noyaux déjà agglomérés entraînent des valeurs de taille plus élevées (Dhumal et al. 2009).

L'utilisation des ultrasons produit aussi des changements de la forme cristalline, même à des niveaux de sursaturation faible. Cependant, ces changements sont dépendants du système (Ruecroft et al. 2005). En fait, le faciès des cristaux dépend d'un certain nombre de facteurs internes (par exemple, la structure moléculaire, la composition, les interactions) et de facteurs externes (par exemple, un profil de température-temps, vitesse d'agitation, et présence d'impuretés) (McClements 2012). De plus, les cristaux peuvent se présenter sous une grande variété de faciès selon le type de solutés, le type de solvant, et des conditions de cristallisation. Par exemple on peut trouver des parallélépipèdes, des sphéroïdes, des sphérolites et des aiguilles (McClements 2012).

En outre, l'abrasion en raison des ultrasons peut avoir un effet sur le faciès des cristaux (Luque de Castro & Priego-Capote 2007; Guo et al. 2005). Avec une intense vibration, cavitation et transmission, les ultrasons réduisent l'agglomération mais également le type de cristal de roxithromycine (Guo et al. 2005). Dans le cas de la griséofulvine, de grandes aiguilles sont formées, lors d'un mélange non uniforme, tandis qu'avec un mélange en présence d'ultrasons la cristallisation amène des particules en forme de diamant (Dalvi & Dave 2010).

1.5.4 *Choix du solvant et de l'anti-solvant*

Le solvant et l'anti-solvant pour la recristallisation d'une molécule doivent être correctement sélectionnés. La molécule doit être soluble dans le solvant et peu soluble ou insolubles dans l'anti-solvant. Le solvant et l'anti-solvant doivent être miscibles ou partiellement miscibles.

Les choix du solvant et de l'anti-solvant sont réalisés à partir d'une étude de solubilité. Leurs natures peuvent influencer le processus de cristallisation et les propriétés physiques des cristaux, telles que la cristallinité et le polymorphisme (Sinha et al. 2013). Le choix du solvant est lié également à la chimie de la molécule à cristalliser. Généralement, on commence à cristalliser dans le solvant qui a servi à la synthèse de la molécule. De plus, d'autres critères vont intervenir tels que des critères économiques et une éventuelle toxicité (Veesler et al. 2005).

Les interactions entre le solvant et les cristaux, plus exactement entre la molécule de solvant et la face cristalline peuvent entraîner une adsorption sélective du solvant. Ceci peut impliquer d'importants changements sur la morphologie et le faciès des cristaux, affectant la qualité physique du produit fini (Veesler et al. 2005). Par exemple, durant la cristallisation de l'ibuprofène, les cristaux formés ont un faciès polyédrique avec l'éthanol ou le méthanol et un faciès en aiguille avec l'hexane (Garekani et al. 2001).

De plus, les interactions soluté-solvant-eau affectent significativement le taux de nucléation et, par la suite, la croissance des particules et leur agglomération (Uusi-Penttilä & Rasmuson 2003; Ålander & Rasmuson 2007). Deux théories ont été proposées pour expliquer l'influence du solvant sur la nucléation et la croissance. Dans la première, les interactions favorables entre soluté et solvant sur les faces spécifiques peuvent conduire à une réduction de l'énergie interfaciale solide-liquide. Par conséquent, l'énergie d'activation pour la nucléation du cristal est réduite et le cristal devient plus rugueux, ce qui conduit à une augmentation de la vitesse de croissance. Dans la deuxième, il a été proposé que les interactions solvant/molécule sont fortement liées au composé à cristalliser ; l'adsorption préférentielle de molécules de solvant sur des faces spécifiques peut inhiber la croissance de ces faces (Lahav & Leiserowitz 2001).

Selon la polarité du solvant, le taux de diffusion des molécules à partir de la phase organique est modifié. Des molécules peu solubles dans l'eau ont une plus faible diffusivité en présence d'un solvant avec une faible polarité et une diffusivité plus élevée dans un solvant de forte polarité. Inversement, les molécules très solubles dans l'eau ont une diffusivité réduite dans un solvant avec une forte polarité et une forte diffusivité dans un solvant de faible polarité. Ces différences de taux de diffusion affectent la croissance des cristaux et l'action des additifs. Avec une faible diffusion des molécules, les additifs sont rapidement adsorbés sur la surface des particules, ce qui engendre une réduction de la vitesse de croissance et donc de la taille et une nucléation importante. En revanche, une diffusion rapide et la présence d'interactions hydrophobes résultent en une agrégation et une augmentation de la taille de particules (Slavtchev & Mendes 2004; Zhao et al. 2007).

L'effet du solvant sur l'agglomération de cristaux de paracétamol a été étudié (Ålander & Rasmuson 2007). Lors d'utilisation d'eau, de méthanol et d'éthanol comme solvant, le taux d'agglomération est réduit. Lors de l'utilisation d'acétone, d'acétonitrile et de méthyl éthyl cétone, le phénomène inverse est observé. Ceci est aussi lié à la polarité du solvant. Un autre travail explique comment la composition d'un mélange de solvant acétone-toluène-eau peut influencer l'agglomération des cristaux de paracétamol (Uusi-Penttilä & Rasmuson 2003). Les résultats indiquent que l'agglomération de ces cristaux est plus intense dans les systèmes avec plus de solvant organiques.

En que concerne l'anti-solvant, il a été rapporté que si l'eau est utilisée comme un anti-solvant au lieu de tout solvant organique, le produit est de nature plus cristalline (Zhang et al. 2006). En effet, dans cette étude, l'utilisation d'éther isopropylique comme anti-solvant, pour la cristallisation de la céfuroxime axétil, conduit à la production de nanoparticules amorphe, alors qu'en présence d'eau comme anti-solvant les nanoparticules sont cristallines. De plus, il a été observé que le type de solvant n'a pas affecté la forme amorphe ou cristalline des nanoparticules obtenues.

Pour des molécules pharmaceutiques très peu solubles dans l'eau, des solvants organiques sont généralement utilisés pour la cristallisation par effet anti-solvant (Tableau 1.2). Une difficulté associée à cette technologie est que la molécule doit être soluble dans au moins un solvant, ce qui crée un problème pour les molécules nouvellement synthétisées ou découvertes, car elles sont faiblement solubles dans l'eau et dans les solvants organiques.

Actuellement des solvants alternatifs sont utilisés dans les processus pharmaceutiques (Grodowska & Parczewski 2010). L'introduction de ces types de solvants ouvre de nouvelles perspectives pour l'industrie pharmaceutique, et également réduit les inconvénients des solvants organiques. Parmi les solvants alternatifs, les fluides supercritiques et les liquides ioniques sont des solvants potentiels.

Les fluides supercritiques peuvent être utiles en tant que solvants dans la production de certains médicaments particuliers, ainsi que dans les processus d'extraction et séparation de molécules actives ou pour la réduction de la taille des particules (Munto & Ventosa 2008; Du et al. 2011; Patomchaiviwat et al. 2008). Ils offrent également la possibilité de travailler sans solvant, pour la préparation de microsphères contenant des molécules pharmaceutiques (Chen et al. 2011; De Zordi et al. 2012) et des méthodes innovantes et économiques pour l'obtention de systèmes de libération de médicaments (Kompella 1999).

L'utilisation particulière des liquides ioniques comme solvants pour des molécules pharmaceutiques a été également décrite (Viçosa et al. 2012; Grodowska & Parczewski 2010; Moniruzzaman et al. 2010; Siódmiak et al. 2012).

Tableau 1.2. Types de solvants et anti-solvants utilisés lors de cristallisation anti-solvant de molécules pharmaceutiques.

Molécule	*Solvant*	*Anti-solvant*	*US*	*Références*
Ibuprofène Kétoconazole Itraconazole	Isopropanol Acétone Acétone	Eau + additifs		(Rasenack & Müller 2002)
Roxithromycine	Acétone	Eau	400 W	(Guo et al. 2005)
Danazol**	Ethanol	Eau	-	(Zhao et al. 2007)
Céfuroxime axétil	Acétate d'éthyle Chlorure méthylène Chloroforme Acétone Acétone Acide formique	Éther isopropylique Éther isopropylique Éther isopropylique Éther isopropylique Eau Eau		(Zhang et al. 2006)
Céfuroxime axétil	Acétone	Éther isopropylique	750 W	(Dhumal et al. 2008)
Spironolactone	Éthanol, Méthanol, 1-Méthyl-2-Pyrrolidone, Acétone, Isopropanol	Eau + PVA, PVPK30, HPMC, Poloxamer 407, LSS, et Tween 80		(Dong et al. 2009)
Griséofulvine	Acétone	Eau + additifs	125 W	(Dalvi & Dave 2009)
Bicalutamide	Éthanol+ DMSO	Eau		(Le et al. 2009)
Itraconazole Odanacatib	THF	Eau + polymères	US	(Kumar et al. 2009)
Atorvastatine calcique	Méthanol	Eau		(Zhang et al. 2009)
Itraconazole Griseofulvin Ibuprofen Sulfaméthoxazole	THF Acétone Acétone Acétone	Eau + HPMC	75 W	(Dalvi & Dave 2010)
Itraconazole* Fénofibrate Griséofulvine Palmitate ascorbyle Sulfaméthoxazole	DMSO, Éthanol, Acétone, THF	Eau + PEG4000	750 W	(Beck et al. 2010)
Fénofibrate	Éthanol	Eau+HPMC ou LSS		(Hu et al. 2011)
Spironolactone*	Acétone	Eau+HPMC ou LSS		(Dong et al. 2011)
Camptothécine	DMSO	Eau + additifs	Intense	(Zhang et al. 2011)
Deflazacort	Méthanol	Eau		(Paulino et al. 2013)

*Dispositif de mélange.

1.6 Etat de l'art en matière d'utilisation des liquides ioniques (LIs) dans le domaine pharmaceutique

1.6.1 *Définition*

Plusieurs nomenclatures sont utilisées dans la littérature pour désigner les liquides ioniques (LI). Ainsi on peut trouver les appellations "sels fondus", " sels liquides organiques" ou "liquides ioniques à température ambiante", entre autres. Ces différentes définitions font appel à des propriétés différentiant les LI des sels fondus classiques comme le NaCl, telles que leurs capacités à jouer un rôle de solvant à température ambiante, ou leurs fortes interactions intermoléculaires [ion-ion] inexistantes pour les autres sels fondus à hautes températures.

Dans ce mémoire, nous réservons le terme "sels fondus" aux matériaux qui sont liquides seulement à hautes températures et nous définissons les LI comme un sous-ensemble de celui des sels fondus ayant une température de fusion inférieure à 100 °C (arbitrairement fixée en référence à la température d'ébullition de l'eau) dans les conditions normales de pression.

La plupart d'entre eux sont liquides à température ambiante (Smith et al. 2011). Les LIs sont constitués d'un cation le plus souvent organique, associé à un anion organique ou inorganique et les combinaisons cations/anions possibles sont très nombreuses ($>10^6$) et en constante évolution.

Les cations rencontrés sont généralement volumineux et dissymétriques. Ils font partie le plus souvent de la famille des ammonium, imidazolium, pyridinium, pyrolidinium, alkylpyridium, dialkylpiperidinium, et phosphonium (Figure 1.15). Les plus étudiés sont les sels d'imidazolium substitués sur les atomes d'azote et de carbone. Les chaînes R_1, R_2 et R_3 sont le plus souvent des chaînes alkyles cependant il existe également des structures de liquides ioniques sur lesquelles on introduit des groupes fonctionnels particuliers. On parle de liquides ioniques à tâche spécifique ou liquide ionique fonctionnalisé. On peut trouver des groupements amines (Del Pópolo et al. 2005), alcools ou éthers (Pérez-Ramírez et al. 2003; Christov & Dohrn 2002), acides carboxyliques ou esters (Dohrn et al. 2010), thiols (Aki et al. 2004), vinyl et allyl (Kroon et al. 2005; Jaubert & Mutelet 2004), alcynes (Vitu et al. 2008) ou encore nitriles et d'hydroxyborates (Bideau et al. 2007; Göbel et al. 2009). Des cations chiraux ont également été synthétisés (Bellayer et al. 2009). Les anions mis en œuvre peuvent

être inorganiques ou organiques. Les anions tétrafluoroborate BF_4^- et hexafluorophosphate PF_6^- sont à la base de nombreux sels liquides. Pour ce qui est des anions organiques, les anions fluorés comme le trifluoroacétate $CF_3CO_2^-$ sont très intéressants notamment en catalyse organométallique. Les dérivés sulfoniques tels que l'anion trifluorométhanesulfonate $CF_3SO_3^-$ et l'anion bis(trifluorométhylsulfonyl)imide $(CF_3SO_2)_2N^-$ sont également très étudiés pour leur stabilité thermique et leur pouvoir faiblement coordonnant.

Récemment, d'autres anions avec des propriétés plus spécifiques ont été développés tels que des anions chiraux (Dong et al. 2009) ou des anions fonctionnalisés par des bases de Lewis (Ferreira & Lobo 2009). Des systèmes anioniques à base d'hétéropolyanions ou de sels métalliques sont également étudiés (Valderrama et al. 2008; Valderrama & Rojas 2009).

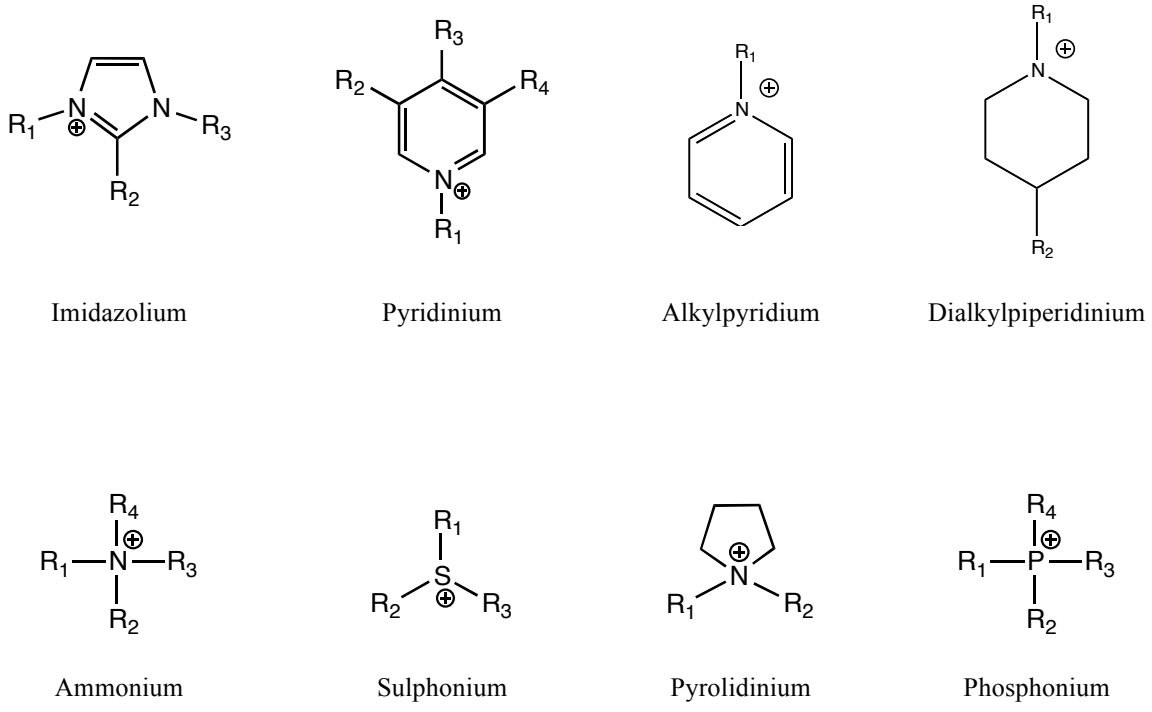


Figure 1.15. Cations organiques les plus utilisés.

1.6.2 *Historique*

Le premier liquide ionique, le nitrate d'éthylammonium, fut synthétisé par Walden et al. en 1914 durant la première guerre mondiale, en cherchant de nouveaux explosifs. A cette époque, les scientifiques ont porté peu d'intérêt à cette découverte et ce n'est que quarante ans plus tard que le premier brevet faisant apparaître les LIs fut déposé. En effet, Hurley & Wier (1951) ont mis au point la première synthèse de LIs à base d'anions chloroaluminate

permettant l'électrodépôt à basse température de l'aluminium. Les chloroaluminates constituent la première génération de LIs. Durant les années 1970 et 1980, ces LIs ont été utilisés principalement dans le domaine de l'électrochimie. Ce fut une importante avancée, cependant les liquides basés sur des chloroaluminates, qu'ils soient constitués de cations pyridinium ou de cations imidazolium, sont très sensibles à l'eau et s'hydrolysent. Une étape supplémentaire fut de préparer des LIs stables à l'air, qui soient simples à préparer et sans précautions particulières. En 1992, Wilkes & Zaworotko (1992) ont publié la préparation du 1-éthyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate, liquide ionique correspondant à ces conditions.

C'est à partir de ces derniers travaux que l'intérêt porté aux LIs a pris son essor, tant du point de vue industriel que du point de vue fondamental. Très rapidement, de nombreux LIs dérivés d'un cation dialkylimidazolium ont été synthétisés en faisant varier la forme et la nature des substituants sur le cation imidazolium et la nature du contre-ion. Il existe de ce fait un très grand nombre de LIs issus de la famille des dialkylimidazolium, pour lesquels les propriétés physico-chimiques (température de fusion, conductivité, viscosité, densité, miscibilité à l'eau, etc.) peuvent être adaptées en fonction des objectifs recherchés. Une constante toutefois : la tension de vapeur reste extrêmement faible comparée à l'ensemble des solvants organiques.

1.6.3 *Propriétés*

Des propriétés bien sélectives permettent de distinguer les LI des sels fondus ordinaires. Parmi les propriétés les plus importantes on peut citer les suivantes :

Point de fusion : Les LI sont caractérisés par des températures de fusion plutôt basses. La température de fusion est influencée par la distribution de charge sur les ions, les capacités de liaisons hydrogène, la symétrie des ions et les interactions de Van der Waals. Il existe une grande incertitude sur la valeur des nombreux points de fusion des LIs issus de la littérature, car certains LIs présentent la propriété d'être surfondus, c'est-à-dire, qu'ils possèdent une plage de température dans laquelle ils passent par une phase cristalline vitreuse. En général les LI à base de pyridium (Carrera & Aires-de-Sousa 2005) et d'imidazole (Holbrey & Seddon 1999; Ye & Shreeve 2007) deviennent liquides autour de 80 °C. L'état surfondu est

une caractéristique associée à de nombreux LIs à base de cations imidazolium (Bonhôte et al. 1996; Ngo et al. 2000). Des études indiquent une diminution notable du point de fusion des LIs lorsqu'il y a une forte asymétrie des substituants du cation imidazolium. La longueur de la chaîne alkyle greffée sur le cation a une grande influence sur leur point de fusion (Holbrey & Seddon 1999; Visser et al. 2001). En règle générale, la valeur du point de fusion diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. L'effet de l'anion sur le point de fusion est plus difficile à expliquer. Dans le cas des LIs à base de cations imidazolium combinés a des anions TfO^- ou Tf_2N^-, les faibles valeurs des points de fusion sont attribuées à une importante délocalisation de la charge sur l'anion, et à une faible interaction par liaisons hydrogène (Pringle et al. 2003).

Non inflammabilité : À l'exception de toute une famille de LIs inflammables appelée énergétique et composée d'ions de nitrate et de picrate, les LIs sont en général non-inflammables.

Stabilité thermique: La plupart des LIs utilisés comme solvants sont tellement stables que la limite supérieure de température ne constitue plus un obstacle à leur emploi. Généralement, les cations imidazolium ont des températures de décomposition supérieures à celles des cations ammonium, permettant leur utilisation à des températures supérieures à 250 °C et dans certains cas supérieures à 400 °C (Bonhôte et al. 1996). La stabilité thermique pour un liquide ionique constitué d'un cation imidazolium dépend essentiellement de la structure de l'anion. Ainsi, les anions engendrant les plus faibles interactions intermoléculaires induisent les températures de décomposition les plus élevées, avec l'ordre : $PF_6^- > NTf_2^- > BF_4^- > I^- > Br^- > Cl^-$ (Ngo et al. 2000). La présence des impuretés peut influencer considérablement la fidélité de ces mesures en agissant, par exemple, en tant que catalyseurs pour les réactions de décomposition.

Conductivité : Les LI ont aussi une conductivité remarquable, spécialement quand ils sont mélangés avec d'autres composés. Par exemple, la conductivité du mélange [LI+eau] peut atteindre 98 mS/cm, tandis que les LIs non-aqueux atteignent une conductivité maximale de 30 mS/cm. Des conductivités supérieures générales sont trouvées pour LIs basés sur l'imidazolium en comparaison avec ceux d'ammonium. De nombreux facteurs peuvent affecter leur conductivité, telles que la viscosité, la densité, la taille des ions, la délocalisation de la charge anionique, les agrégations et les mouvements ioniques (Hapiot & Lagrost 2008; Olivier-Bourbigou et al. 2010). De plus, ils ont une grande stabilité électrochimique et

peuvent fournir des tensions entre 5-6 V (Endres et al. 2003); cela a été exploité dans le domaine des piles à combustibles (Yasuda & Watanabe 2013).

Masse volumique : Les LIs présentent une masse volumique plus grande que celle de l'eau ou des solvants organiques, avec des valeurs entre 1 à 1,6 g/cm^3. Normalement, l'augmentation du numéro de carbones dans la chaîne du LI réduit la masse volumique (Jacquemin et al. 2006 ; Olivier-Bourbigou et al. 2010 ; Marsh et al. 2004). L'addition d'un troisième substituant pour le cation imidazolium entraîne une diminution de la masse volumique (Fredlake et al. 2004). Pour un cation donné, la densité augmente avec une augmentation de la masse molaire de l'anion $Cl^- < BF_4^- < CF_3CO_2^- < NTf_2^-$. La présence d'impuretés comme l'eau ou les ions halogénures entraîne une diminution de la masse volumique (Greaves & Drummond 2008).

Viscosité : Les LIs sont en général denses et visqueux. Ils ont une viscosité qui peut atteindre dix fois celle des solvants organiques ordinaires, elle peut varier de 66 jusqu'à 1110 cP à 20-25 °C. La viscosité des LIs peut également changer avec la composition moléculaire de l'anion, ainsi elle augmente quasi-linéairement avec la longueur de la chaîne alkyle du cation. De plus, les LIs avec les mêmes cations et des anions similaires peuvent présenter des propriétés différentes, ce qui est interprété par des interactions moléculaires pertinentes (Hasse et al. 2009). La viscosité élevée est le plus grand inconvénient quant à l'utilisation des LIs. Du point de vue de l'ingénierie, la viscosité de LIs peut affecter les propriétés de transports telles que la diffusion. Ainsi, la conception de LIs moins visqueux est toujours un défi pour de nombreuses applications (Fröba et al. 2008).

Solubilité/Miscibilité : Le caractère hydrophile ou hydrophobe des LIs est un paramètre important dans l'étude de leurs propriétés de solvatation. Leurs solubilités dans l'eau sont principalement gouvernées par la nature de l'anion et la longueur de la chaîne alkyle greffée par le cation (Freire et al. 2007; Mizuuchi et al. 2008). Dans cette étude, il a été également rapporté que l'hydrophobicité de l'anion augmente dans l'ordre $BF_4^- < CH_3(C_2H_4O)_2SO_4^- < C(CN)_3^- < PF_6^- < N(SO_2CF_3)_2^-$, tandis que, celle du cation augmente, sauf exceptions, avec la longueur de la chaîne. De plus, la miscibilité dans l'eau d'un certain LI peut être modifiée en ajoutant un deuxième LI plus miscible dans le mélange (Mizuuchi et al. 2008). Ces auteurs ont également signalé que la miscibilité dans l'eau est liée à la haute polarité et la basse hydrophobicité. Cette dernière est plus importante pour la miscibilité du LI dans l'eau. La possibilité d'améliorer la miscibilité avec l'ajout d'un deuxième LI ouvre de nouvelles

opportunités pour l'emploi de LIs immiscibles comme solvants dans des systèmes aqueux. Pour les solvants organiques, en règle générale, la miscibilité augmente d'autant qu'ils sont polaires. Les LIs sont donc miscibles avec les alcools à courte chaîne et les cétones, le dichlorométhane et l'acétonitrile. En revanche, par un choix judicieux de la nature du cation et/ou de l'anion, les LIs peuvent être non-miscibles avec les alcanes, le dioxane, le toluène et l'éther (Welton 1999; Bonhôte et al. 1996).

Hygroscopicité : Les LIs ont la propriété d'être hygroscopiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent absorber l'eau contenue dans l'atmosphère (Seddon et al. 2000). Cammarata et al. (2001) ont établi que les molécules d'eau absorbées dans les liquides ioniques sont à l'état « libre » en interaction par liaisons hydrogènes avec les anions pour des concentrations comprises entre 0,2 et 1.10^{-3} mol/L. La force des liaisons hydrogène entre l'anion et l'eau augmente suivant l'ordre $PF_6^- < BF_4^- < NTf_2^- < TfO^- < NO_3^-$.

Toxicité et biodégradabilité : La toxicité des LIs est pour l'instant mal connue. Des études ont été entreprises afin d'en évaluer les propriétés toxicologiques (Huddleston et al. 2001; Jastorff et al. 2003; Matzke et al. 2007; Romero et al. 2008). Thuy Pham et al. (2010) ont répertorié toutes les études toxicologiques réalisées sur les LIs. Il en ressort de ces études que la toxicité des LIs constitués du cation alkylimidazolium est plus importante lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. D'autre part, l'introduction d'une chaîne polaire réduit leur toxicité et augmente leur biodégradabilité. Les cations pyridinium semblent être plus respectueux de l'environnement que les cations imidazolium.

1.6.4 *Applications*

Cette première partie montre que les LIs possèdent des propriétés physico-chimiques intéressantes. En particulier, ils peuvent être "façonnés" pour une utilisation précise par un choix judicieux de la nature de l'anion ou du cation qui les composent.

Des publications décrivent leurs utilisations dans diverses applications, telles que la fabrication de batteries thermiques, la synthèse organique et inorganique, la catalyse, les méthodes de séparation, l'électrométallurgie, les procédés métallurgiques et la synthèse des matériaux (Welton 1999; Olivier-Bourbigou et al. 2010; Sun & Armstrong 2010; Poole & Poole 2010; Endres 2002; Abbott & Ryder 2008).

L'intérêt croissant pour l'application de cette famille de solvants dans les processus pharmaceutiques est démontré par l'augmentation du nombre de publications dans les dernières années (Figure 1.6). Ainsi ce nombre est passé de 14 par an en 1994 à 48 par an en 2012. Selon notre recherche bibliographique, en 2013, 35 travaux ont été publiés jusqu'au mois de juillet. Cette croissance est forcément due à la découverte par les industriels pharmaceutiques de l'importance des LIs dans beaucoup d'applications en raison de leurs propriétés remarquables.

Parmi les possibles applications de ces nouveaux solvants dans les processus pharmaceutiques, nous pouvons citer les effets sur la solubilité, la synthèse, la stabilité et la libération de la molécule comme répertorié dans la littérature (Moniruzzaman & Goto 2011).

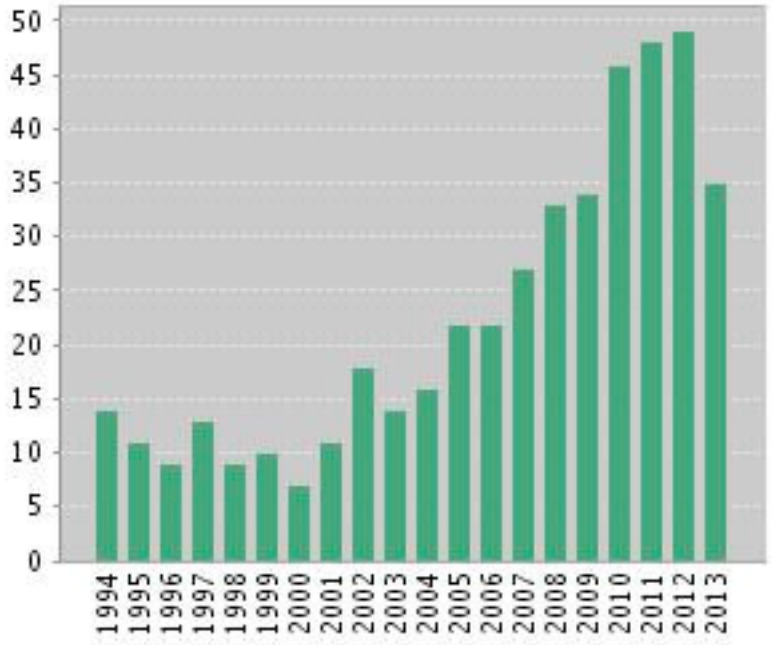


Figure 1.16. Évolution du nombre de références indexées dans la base de données Web of Science concernant l'utilisation des liquides ioniques dans le domaine pharmaceutique. Recherche effectuée sur les mots-clefs : liquide(s) ionique(s) + molécule(s) pharmaceutique(s), le 05 juillet de 2013.
Source: Web of Science, disponible dans: http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=P2G8nFAIPngAkPLMmJf&page=1&cr_pqid=1&viewType=summary. (05/07/2013).

1.6.4.1 Synthèse

Dans l'industrie pharmaceutique, des solvants organiques, plus particulièrement des solvants polaires, sont employés comme milieux de synthèse. L'intérêt en remplacer certains

de ces solvants par des solvants alternatifs tels que les liquides ioniques pour la synthèse de molécules pharmaceutiques augmente de plus en plus (Shaabani et al. 2006; Siódmiak et al. 2012). Comme exemple, nous pouvons citer le travail de Kumar et Malhotra (2008) qui démontre le succès de la synthèse de médicaments antiviraux (brivudine, stavudine, trifluridine) à l'aide des liquides ioniques, comme le 1-méthoxyéthyle, 3-méthyl-imidazolium méthanesulfonate ([moemim][Mme]), 1-méthoxy-3-méthyltrifluoroacétate ([moemim][TFA]) et le 1- butyl-3- methylilidazolium trifluoroacétate ([bmim][TFA]).

1.6.4.2 Solubilisation

La capacité de solubilisation des LIs a été décrite pour la dissolution, l'extraction et la stabilisation de la cellulose (Pinkert et al. 2010; Remsing et al. 2008), de la chitine (Qin et al. 2010), de nanomatériaux (McCrary et al. 2012) et de protéines (Fujita et al. 2005).

Le potentiel d'utilisation des LIs comme solvant pour des molécules pharmaceutiques peu solubles ou insolubles commence à être exploré, ce que démontre plusieurs travaux publiés. Uzagare et al. (2003) ont étudié la solubilité de trois ribonucléosides dans plusieurs LIs et l'ont comparé à la solubilité de ces mêmes molécules dans des solvants organiques généralement utilisés, tels que la pyridine et le diméthylformamide. La plupart des LIs testés ont montré de meilleurs résultats en termes de solubilité que les solvants organiques. Les auteurs ont suggéré que la dissolution des molécules dans de tels solvants implique la formation de liaisons hydrogènes entre les anions des LIs et les molécules.

Mizuuchi et al. (2008) ont rapporté que les solubilités de l'albendazole et du danazol dans les LIs ont été respectivement supérieures à 75 et 59 mmol/L. Les différences de solubilité des molécules dans les différents LIs étudiés sont liées aux interactions entre les molécules pharmaceutiques et ces derniers. En général, le LI avec la plus grande chaîne présente une plus grande hydrophobicité et est capable de mieux solubiliser les composés hydrophobes. De plus, la solubilité d'albendazole dans des mélanges eau/LI est supérieure à celle dans l'eau pure.

Smith et al. (2011) ont étudié la solubilité de deux molécules pharmaceutiques, une de faible solubilité dans l'eau (l'ibuprofène), et l'autre de haute solubilité (le paracétamol). Les essais ont été réalisés à différentes températures et avec deux types de LIs. Les résultats

indiquent une augmentation de la solubilité en fonction de la température et de la chaîne alkyl du LI. Des interactions significatives soluté-solvant doivent exister pour leur dissolution.

Manic et Najdanovic-Visak (2012) ont traité les équilibres de phases binaires solide-liquide et liquide-liquide de l'érythromycine dans plusieurs LIs. Les solubilités ont été mesurées par des méthodes dynamiques entre 11 et 85 °C à pression atmosphérique. Les coefficients d'activité ont été calculés et comparés avec des solutions idéales. Des équations ont été trouvées pour prédire la solubilité avec un coefficient de variation de ± 0,12%.

Des mesures de solubilités en utilisant des méthodes dynamiques ont été décrites pour d'autres molécules pharmaceutiques, tels que l'isoniazide (Forte et al. 2012; Melo et al. 2013), la pyrazine-2-carboxamide (Lourenço et al. 2012; Melo et al. 2013) et le N-acétyl-L-cistéïne, la coumarine et la 4-hydroxycoumarine (Dos Santos et al. 2013). Dans tous les travaux, des LIs sont capables de dissoudre ces molécules. Les différences de solubilité sont liées aux interactions moléculaires avec les différents LIs.

1.6.4.3 Systèmes de libération

Jaitely et al. (2008) ont exploré les propriétés des LIs dérivés d'anion hexafluorophosphaste PF_6^- et des cations butyle, hexyle et octyle-3-méthyl-imidazolium comme véhicules pour la libération de molécules. Les coefficients de partage (log P) dans un mélange LI/eau du saccharose, de la pénicilline V potassique, de la dexamétasone, de la progestérone et de la déshydroproline épiandrostérone ont été comparés avec ceux dans un mélange octanol-eau. La variation des valeurs est conforme à l'affinité de la molécule au LI. Les résultats ont montré que la libération du saccharose augmente avec la longueur de chaîne, et est en accord avec les valeurs de log P dans les LIs. La libération de la dexamétasone à partir des systèmes formés est similaire pour les trois LIs et elle peut être prolongée pour plus de 48 h. De plus, des solutions saturées de ces LIs dans l'eau montrent une faible toxicité en cellules Caco-2 pour ces solvants.

Moniruzzaman et al. (2010a) ont rapporté l'application du diméthyl-imidazolium diméthylphosphate [dmim][$(MeO)_2$]PO_2, comme solvant pour la préparation de microémulsions LI/O stabilisées par des surfactants non-ioniques (Tween 80 et Span 20), et comme alternative pour l'administration transdermique d'acyclovir. Les résultats de cette

étude montrent que la perméabilité de la molécule est augmentée quand la microémulsion en présence de LI est utilisée. Dans un travail similaire, Moniruzzaman et al. (2010b) ont démontré que ces nouveaux types de systèmes présentent une faible cytotoxicité in vitro. Des microémulsions contenant des LI sont également obtenues avec d'autres molécules telles que le méthotrexate et le 1-[5-(p-nitrophényl)furfurylidène)amino] hydantoïne de sodium (Moniruzzaman et al. 2010c)

D'autres auteurs ont également décrit l'application des LIs pour l'obtention de microémulsions (Eastoe et al. 2005; Gao et al. 2004; Gao et al. 2007; Gao et al. 2006; Metha & Khushwinder 2010; Rojas et al. 2013; Liu et al. 2009).

Plus récemment, Azevedo et al. (2013) ont étudié l'influence des LIs dérivés du cation imidazolium sur le comportement de la libération in vivo de la nimésulide. Cette libération de la nimésulide est évaluée en sérum humain albumine en milieu avec des LIs. En parallèle, l'évaluation des interactions molécule-IL, avec des micelles de hexadécylphosphocholine (HDPC), a permis de calculer les coefficients de partage (Kp). Les résultats ont démontré que les systèmes étudiés présentaient des propriétés qui sont favorables à l'interaction du médicament avec les membranes biologiques, avec des valeurs Kp 2.5 à 3.5 plus hautes qu'en milieu aqueux.

1.6.4.4 LIs dans les processus de cristallisation

1.6.4.4.1 Additifs pour la cristallisation de protéines

L'utilisation des LIs dans le processus de cristallisation de protéines a été décrit comme une façon d'induire la cristallisation (Pusey et al. 2007; Coelho et al. 2010), d'augmenter la taille de cristaux et de réduire l'agglomération (Hekmat et al. 2007; Judge et al. 2009).

Dans le travail de Coelho et al. (2010) des cristaux non mensurables de la nitrate de réductase (une protéine de difficile à cristalliser) ont été formés en l'absence de LI. L'induction de la cristallisation en présence de différents LIs (1-butyl-3-méthylimidazolium 2(2-methoxyethoxy) éthyl sulfate [C_4mim][MDEGSO_4] et 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure [C_4mimCl]) a été étudié. Les résultats ont démontré que le type d'anion et la concentration du LI est cruciale pour la formation des cristaux. Le succès de la formation de

cristaux a été obtenu avec l'utilisation du LI dérivé de chlore avec une concentration de 0,4 M. Cela indique que les LIs peuvent être utilisés avec succès comme un additif pour la cristallisation de molécules difficiles à cristalliser.

1.6.4.4.2 Solvants pour la cristallisation de molécules pharmaceutiques

L'emploi de LIs comme solvant dans des processus de cristallisation de molécules pharmaceutiques est encore peu exploré, ce qui se traduit par un faible nombre de travaux dans la littérature. En effet, à notre connaissance, il n'existe que des travaux, sur la cristallisation du méthyl-(Z)-α-acétamido cinnamate (MAAC), du paracétamol, de l'adéfovir dipivoxil et de la rifampicine.

Kroon et al. (2005) ont réalisé la cristallisation par effet anti-solvant du méthyl-(Z)-α-acétamido cinnamate (MAAC) en présence du 1-butyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluroborate [bmim]BF_4^-, en utilisant du fluide supercritique comme anti-solvant.

Smith et al. (2010) ont évalué l'effet du 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate [bmim]PF_6^- et du 1-hexyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate [hmim]PF_6^- comme solvant pour la cristallisation par refroidissement du paracétamol. Des cristaux de paracétamol en forme angulaire sont obtenus en présence du [hmim]PF_6^-. Ces auteurs ont rapporté aussi que dû à la faible tension de vapeur des LIs des changements significatifs du processus de cristallisation doivent être effectués, en particulier pour la séparation de solide-liquide.

An et al. (2010) ont étudié le potentiel d'utilisation du LI comme solvant pour la recristallisation d'adéfovir dipivoxil et la formation de nouvelles formes polymorphes. Ce dernier est un inhibiteur de l'enzyme du virus du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Il est trouvé dans six formes polymorphes. Elles sont toutes synthétisés avec l'utilisation de solvants organiques. Dans ce travail, le 1-allyl-3-éthylimidazolium tétrafluoroborate [AEImim]BF_4^- a été utilisé comme solvant et l'eau comme anti-solvant. La cristallisation se produit par effet de la température en considérant différents mélanges eau-LI. Avec un mélange donné eau-LI, la production de cristaux, à des températures inférieures à 70 °C, a générée des formes identiques à celles utilisant des solvants organiques. Toutefois, deux nouvelles formes polymorphes sont formées à des températures de 80 et 90 °C. Selon ces

auteurs, les LIs peuvent induire différents types d'interactions moléculaires qui permettent à l'obtention de ces nouvelles formes polymorphes. De plus, la présence de LI dans le mélange eau-LI permet de stabiliser les molécules d'adéfovir dipivoxil et d'éviter sa décomposition à hautes températures.

Viçosa et al. (2012) ont étudié l'emploi d'un LI comme solvant de la rifampicine, une molécule hydrophobe, en vue de sa recristallisation afin d'améliorer sa solubilité et sa cinétique de dissolution. Pour la cristallisation de cette molécule, le 1-éthyl-3-méthyl-imidazolium méthyl-phosphonate [emim][$CH_3O(H)PO_2$] est utilisé comme solvant et une solution tampon phosphate avec ou sans HPMC comme anti-solvant Les résultats ont démontré la formation de particules de tailles nanométriques (280-360 nm) avec et sans l'additif. De plus, les nanoparticules obtenues sous forme amorphe ont une solubilité et une cinétique de dissolution supérieure à celle de la rifampicine initiale.

1.6.4.4.3 LIs comme molécules actives

Dans le contexte d'utilisation des LIs, il est également intéressant de noter la synthèse des molécules pharmaceutiques biologiquement actives avec des propriétés d'un sel organique tel qu'un LI (Hough & Rogers 2007; Hough et al. 2007; Dean et al. 2009; Saadeh et al. 2009). La combinaison de différents cations et/ou anions biologiquement actifs entraîne la formation de molécules avec des propriétés spécifiques.

Parmi les propriétés de ces nouveaux types de composés, ils peuvent favoriser la solubilité d'une molécule, la biodisponibilité, la stabilité et le screening du polymorphisme. De plus, ils peuvent être synthétisés pour améliorer les caractéristiques de libération in vivo des molécules pharmaceutiques traditionnellement existantes ou introduire de nouveaux traitements (Hough & Rogers 2007).

Hough et al. (2007) ont décrit la synthèse du lidocaïne docusate, un liquide ionique hydrophobe à température ambiante, formé par combinaison de la lidocaïne hydrochloride (cation) et du sodium docusate (anion). Il a été observé, dans ce travail, que le lidocaine docusate présent une plus faible solubilité, une plus grande stabilité thermique et une efficacité d'analgésie topique plus importante grâce à un temps de résidence plus élevé dans la peau.

La synthèse du ranitidine docusate, un autre LI, a été facilement obtenue à partir de la compléxation de la ranitidine hydrochlorure (cation) avec le docusate de sodium (anion). Selon les auteurs, le composé obtenu peut éviter les problèmes associés au polymorphisme de cette molécule (Dean et al. 2009).

Par ailleurs, le LI formé par tétrabutylammonium (TBA) comme cation a montré des propriétés chimiques et biologiques très intéressantes. Il présente une bonne solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques et un effet contre certains types de bactéries tant sur les gram-négative que les gram-positif (Saadeh et al. 2009).

Hough-Trotman et al. (2009) ont décrit la synthèse d'un LI généré par deux ions actifs biologiquement. Ce LI a été formé par la compléxation d'un cation d'ammonium quaternaire avec un anion dérivé d'un sucre. Il en résulte le didécyldiméthylammonium saccharinate. Ce nouveau composé conserve non seulement les propriétés antimicrobiennes anciennes, mais aussi produit une diminution de la solubilité dans l'eau, l'augmentation de la stabilité thermique et l'efficacité contre les insectes. En outre, l'introduction d'un dérivé de sucre dans la composition peut certainement être certainement un facteur pour leur application oral, comme par exemple dans les bains de bouche.

1.7 LASSBio-294 : le problème posé

La physiopathologie de l'insuffisance cardiaque est caractérisée par l'infarctus du myocarde en présence d'œdème et de congestion périphérique. Le traitement employé comprend l'utilisation de médicaments qui peuvent augmenter la contractilité du myocarde avec des effets positifs inotropes, tels que, les glycosides cardiaques combinés avec les diurétiques. Malheureusement, l'utilisation des glycosides cardiaques est limitée à cause de leur faible gamme thérapeutique. Des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, des antagonistes calciques et des antagonistes adrénergiques sont utilisés pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. De plus, des inhibiteurs de la phosphodiestérase (PDE) spécifique pour l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), comme les dérivés pyridazinoniques, sont également employés comme cardiotoniques (Barreiro, 2002).

Cette étude concerne la molécule 2-thiénylidène 3,4-méthylènedioxybenzoylhydrazide ou 3,4-méthylènedioxybenzoyl-2-thiénylhydrazone ou N-(1E)-1-aza-2-(2-thiényl)vinyl)-2H-

benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-ylcarboxamide, $C_{13}H_{10}N_2O_3S$, dénommée LASSBio-294 (Figure 1.17) (Sudo et al. 2006).

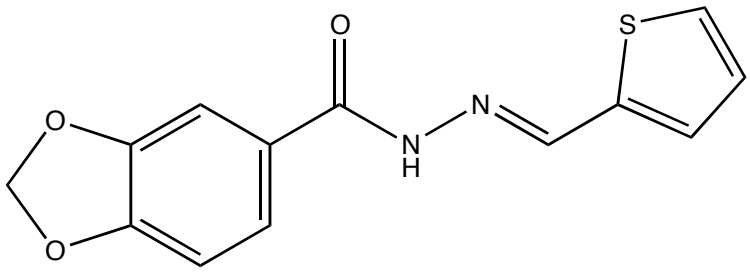


Figure 1.17. Structure moléculaire de la molécule LASSBio-294.

Il s'agit d'un nouveau principe bioactif pharmaceutique de la classe des N-acylhydrazone développé et synthétisé au Brésil grâce à une stratégie de simplification moléculaire (Barreiro 2002; Sudo et al. 2006). Lors de ce développement, la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques pour le traitement de maladies cardio-vasculaires a été envisagée : molécules plus efficaces et avec moins d'effets secondaires.

La stratégie de simplification moléculaire pour l'obtention du LASSBio-294 est basée initialement sur la structure d'une pyridazinone (1) (Figure 1.18). Celle-ci est capable de promouvoir des effets combinés de vasodilatation et inotropes positifs. Puis, la rupture par simplification moléculaire de la liaison en "a" et l'élimination du centre stéréogénique en "b" ont permis d'identifier la similarité structurelle entre les dérivés N-acylhydrazone (NAH) (2) et les composés cardiotoniques. L'inclusion de l'anneau 1,3-benzodioxolyle ou safrole (3) attaché au groupe acyle du NAH et le remplacement du noyau phényle attaché à l'imine par l'anneau de 2-thiényl (bioisostère) a abouti à la conception du LASSBio-294. Le safrole est le principal composant chimique de l'huile de Sassafras (*Ocotea pretiosa and Piper hispidinervum*), un type d'huile très abondant au Brésil et qui est utilisé comme matière première pour la synthèse de molécules bioactives (Barreiro, 2002).

Des essais in vitro sur un cœur isolé de rat Wistar ont suggéré un nouveau mécanisme pour l'effet cardiotonique positif du LASSBio-294. Ceci serait lié à l'absorption de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS) sans changement de la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{+2} (effet maximale à 25 μM) (Sudo et al. 2001). L'étude sur les fibres musculaires

squelettiques de grenouilles *Rana pipiens* a démontré la capacité du LASSBio-294 à augmenter l'inotropisme et à réduire la fatigue musculaire. Ces effets ont été expliqués par la stimulation de la pompe de Ca^{+2} du RS et par l'augmentation des niveaux cellulaires de AMPc due à l'inhibition de la PDE (Gonzalez-Serratos et al. 2001). Sur l'aorte isolée de rat Wistar cette molécule a induit la vasodilatation (IC_{50} 74 μM) en augmentant les taux de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) intracellulaire par inhibition de la PDE 5 (Silva et al. 2002). Ces résultats suggèrent que cette molécule est utile pour le traitement de l'insuffisance cardiaque congestive et de la fatigue musculaire.

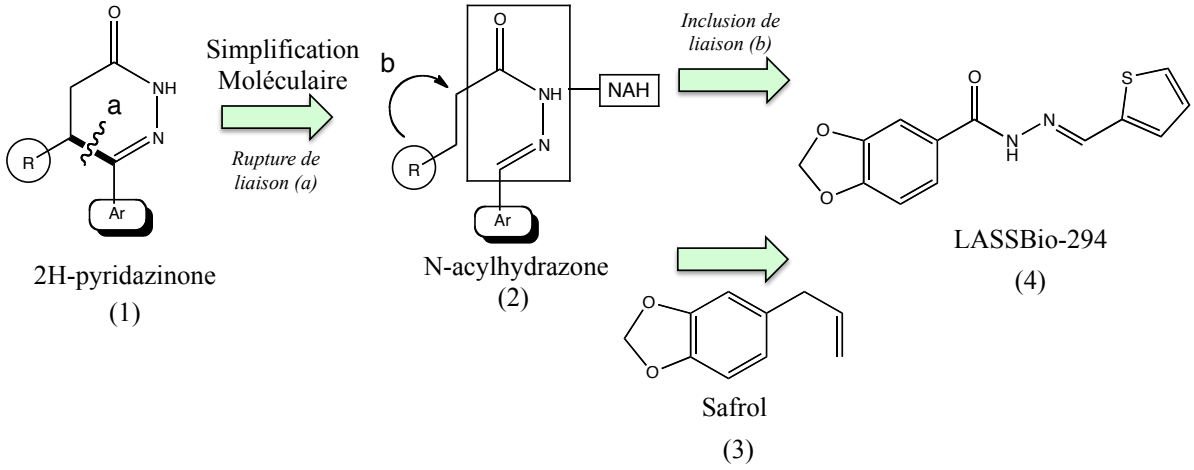


Figure 1.18. Illustration du processus de simplification moléculaire pour la formation du LASSBio-294 (Modifiée de Kümmerle et al. 2009).

D'autres essais ont démontré également la capacité analgésique (ID_{50} 8,1 μmol/kg sur contractions abdominales induites par acide acétique) et antiplaquettaire du LASSBio-294 (IC_{50} 15,3 μM par l'induction de l'agrégation plaquettaire via l'acide arachidonique et l'inhibition de la production de thromboxanes B_2) (Miranda et al. 2002). Plus récemment, le LASSBio-294 a été décrit pour la prévention du l'infarctus du myocarde car il améliore la régulation de la concentration de Ca^{+2} intracellulaire (Costa et al. 2010).

L'étude sur des paramètres pharmacocinétiques a permis d'identifier trois types de métabolites du LASSBio-294. Deux métabolites liés à la transformation dans l'anneau thiophène : un formé par sulfoxydation et l'autre par hydroxylation (Carneiro et al. 2010; Braga et al. 2011). Le troisième lié à la biotransformation de l'unité méthylène de l'anneau 1,3-benzodioxole par une enzyme cytochrome monooxygénase CYP1A2 (Fraga et al. 2011).

Ces effets thérapeutiques prometteurs indiquent que LASSBio-294 est un nouveau candidat intéressant. Toutefois, comme tout médicament faiblement hydrosoluble, il présente une faible solubilité et une mauvaise vitesse de dissolution dans le tractus gastro-intestinal, ce qui peut limiter son absorption et sa biodisponibilité après l'administration orale (Sudo et al. 2001). De plus, chez les chiens des effets toxiques très faibles avec une DL_{50} de 1,5 g/kg sont décrits (Sudo et al. 2006).

Les étapes du processus de développement du LASSBio-294 sont résumées dans la Figure 1.19 (Barreiro, 2002). L'application de nouvelles stratégies de simplification moléculaire permet donc des modifications pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisme et élimination) ou pharmacodynamiques du pré-candidat. Dans le cas du LASSBio-294, de nouveaux composés ont été développés à partir de l'optimisation de sa structure par simplification moléculaire (Silva et al. 2005; Kümmerle et al. 2009).

Dans cette thèse, la modification des propriétés du LASSBio-294 telle que la taille des cristaux est proposée en vue d'améliorer sa vitesse de dissolution et le contrôle de la phase biopharmaceutique lors du développement d'un médicament pour une administration orale.

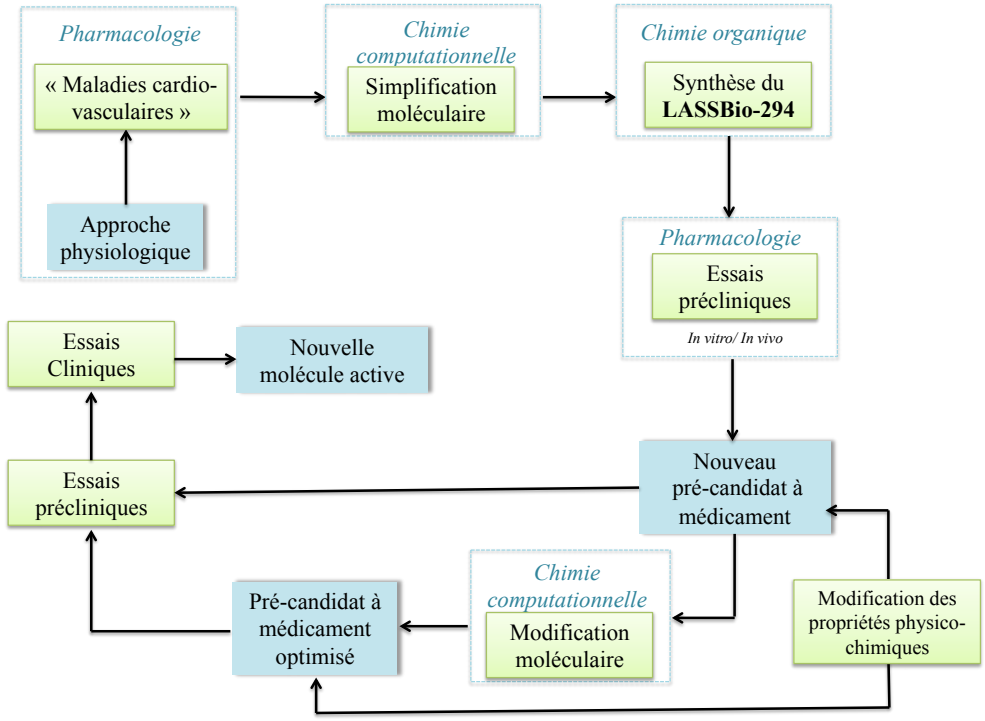


Figure 1.19. Étapes du processus de développement du LASSBio-294 basé sur l'approche physiologique.

1.8 Conclusions

Ce travail de thèse, étant inscrit en grand partie dans une logique thérapeutique, nous avons choisi de donner dans l'introduction de la synthèse bibliographique des éléments concernant la complexité du processus de développement d'un médicament et la problématique d'une proportion croissante des nouveaux médicaments en développement constituée par des molécules ayant une faible biodisponibilité. De nombreux facteurs peuvent expliquer une faible biodisponibilité telle qu'une mauvaise vitesse de dissolution, une faible solubilité ou une faible perméabilité.

Afin de répondre à cette problématique, plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour augmenter la biodisponibilité de ces types de molécules comme nous le montrons encore dans la première partie de ce chapitre. Parmi les techniques proposées la cristallisation aurait l'avantage de garder la forme cristalline de la molécule, plus stable. Ces éléments permettront de justifier l'approche choisie pour améliorer la cinétique de dissolution de la molécule de notre intérêt à travers le procédé de cristallisation par effet anti-solvant.

Dans une deuxième partie, nous avons vu la nécessité de bien maîtriser le choix du solvant et de l'anti-solvant et de contrôler les conditions opératoires pour une opération de cristallisation par effet anti-solvant, comme le type de mélange (micro et macro), le rapport solvant/anti-solvant et la concentration initiale de la molécule en solution. Ce sont des paramètres qui peuvent influencer les étapes de nucléation, croissance et agglomération des cristaux.

Nous avons vu également que la nucléation joue un rôle décisif dans la détermination de la forme et de la distribution de taille de cristaux. Ainsi, la compréhension des principes fondamentaux de la nucléation est cruciale pour le contrôle du processus de cristallisation. Contrairement à la nucléation et la croissance, l'agglomération n'est pas un phénomène présent dans tous les processus de cristallisation. Son existence dépend du système et des conditions de cristallisation et plusieurs paramètres peuvent donc influencer le processus d'agglomération, comme les conditions hydrodynamiques (mélange, turbulence locale…), la nature du solvant (viscosité), la taille des cristaux, le nombre de cristaux, le rapport de sursaturation et la vitesse de croissance, en plus des forces de cohésion entre le solvant, les impuretés et les cristaux.

Les propriétés essentielles des cristaux tels que la taille, la morphologie et la pureté dépendent de façon significative de la vitesse, de l'amplitude et de l'uniformité de la sursaturation générée pendant le processus de cristallisation. Ce phénomène est très sensible à l'hydrodynamique et donc au mélange de l'échelle macroscopique (macro-mélange) à l'échelle moléculaire (micro-mélange). Dans le procédé de cristallisation, il est donc souhaitable d'avoir un mélange rapide et homogène de façon à obtenir une distribution uniforme de la concentration dans le réacteur et, également de la nucléation et de la taille des particules.

Dans ce type de procédé la formation de cristaux peut être réalisée à partir d'un mélange de la solution avec un anti-solvant. Toutefois, pour un PA comme celui de notre intérêt (LASSBio-294), le défi majeur d'une recristallisation par effet anti-solvant est dû à la faible solubilité de la molécule dans les solvants organiques généralement utilisés pour ce procédé tel que l'éthanol. Modifier les propriétés d'un PA comme sa solubilité ou sa cinétique de dissolution dans les milieux biologiques n'est pas le seul challenge pour ce type de procédé. Il est aussi indispensable de protéger l'environnement en favorisant l'utilisation de procédés propres et respectueux de l'environnement ainsi qu'en réduisant l'utilisation de solvants potentiellement dangereux et polluants. Enfin, les normes de plus en plus strictes en matière de résidus de solvants autorisés dans les médicaments et le coût croissant associé au recyclage des solvants organiques ont poussé la recherche pharmaceutique à développer des procédés utilisant des solvants alternatifs tels que les liquides ioniques dans les applications recourant aux solvants traditionnels comme le procédé de cristallisation par effet anti-solvant. La troisième partie de ce chapitre est ainsi consacrée à l'état de l'art concernant l'utilisation des liquides ioniques (LIs) dans le domaine pharmaceutique. Elle montre que les LIs possèdent des propriétés physico-chimiques intéressantes. En particulier, ils peuvent être "façonnés" pour une utilisation précise par un choix judicieux de la nature de l'anion ou du cation qui les composent. Des publications décrivent leurs utilisations dans des applications très variées (par ex. les méthodes de séparation, l'électrométallurgie, la synthèse des matériaux..). L'emploi de LIs comme solvant dans des processus de cristallisation de molécules pharmaceutiques est encore peu exploré, ce qui se traduit par un faible nombre de travaux dans la littérature. En effet, à notre connaissance, il n'existe que des travaux, sur la cristallisation du méthyl-(Z)-α-acétamide cinnamate (MAAC), du paracétamol, de l'adéfovir dipivoxil et de la rifampicine.

Enfin, cette synthèse bibliographique nous a permis de mettre un accent sur le défis de développer un procédé de cristallisation pour une nouvelle molécule d'intérêt pharmaceutique

(LASSBio-294) par effet anti-solvant en utilisant des liquides ioniques comme solvants et anticiper les étapes critiques éventuelles : choix du liquide ionique, détermination de la solubilité de la molécule dans les mélanges LI/anti-solvant, définition des bonnes conditions du mélange, contrôle de la nucléation et de l'agglomération, amélioration de la cinétique de dissolution…

Chapitre 2 : Techniques de caractérisation

2.1 Introduction

Dans ce chapitre, les différentes techniques d'analyse mises en œuvre pour caractériser, d'une part, la molécule sous forme originale et, d'autre part, le solide synthétisé par cristallisation par effet anti-solvant sont présentées. La caractérisation du LASSBio-294 initial permet de connaître ses propriétés physiques-chimiques tels que, la solubilité, le pKa, le point de fusion, la taille moyenne de particules, l'état cristallin, la mouillabilité, et la stabilité qui sont des caractéristiques directement liées à son efficacité thérapeutique. Sachant que dans un processus de cristallisation les paramètres physico-chimiques (solvants, additifs, pH…) et les paramètres du procédé (température, concentration…) peuvent orienter la formation de cristaux, la caractérisation est importante pour suivre la qualité des cristaux formés et/ou identifier des changements polymorphiques.

2.2 Produits

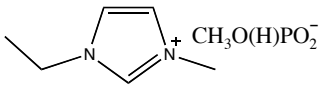
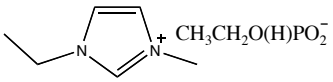
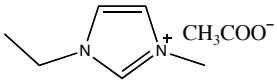
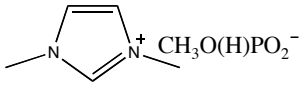
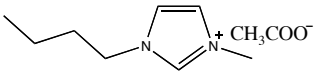
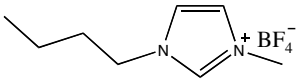
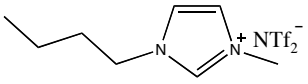
La molécule pharmaceutique LASSBio-294 étudiée est fournie par la société Cristália Ltda (Itapira, São Paulo, Brésil), avec une pureté de 99,96 %. Elle se présente sous la forme d'un solide légèrement jaune avec une masse molaire de 274,3 $g.mol^{-1}$. Elle est soluble dans l'acétonitrile (ACN), le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde, très peu soluble dans l'éthanol et insoluble dans l'eau.

Les liquides ioniques sont synthétisés par Solvionic S.A (Toulouse, France). Leur structure chimique, leurs puretés, leurs noms et abréviations, sont donnés dans le Tableau 2.1.

L'acétonitrile (grade HPLC) provient de chez Scharlau SL (Espagne). L'eau est distillée et purifiée grâce à un système de purification d'eau Milli-Q (Purelab classique DI MK2, Elga, Royaume-Uni).

Tous les sels utilisés pour préparer des solutions tampon (phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4), phosphate de potassium (KH_2PO_4), carbonate de sodium (Na_2CO_3), phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4), et chlorure de potassium (KCl)) sont de qualité analytique.

Tableau 2.1. LIs utilisés dans cette étude.

Nom	Abréviations [cation][anion]	Structure chimique	Pureté (%)
1-éthyl-3- méthylimidazolium méthyl phosphonate (lot L09012001)	[emim][$CH_3O(H)PO_2$]		>98
1-éthyl-3-méthylimidazolium éthyl phosphonate (lot L11032201)	[emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$]		>98
1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate (lot L11120102)	[emim][CH_3OO]		98
1,3-diméthylimidazolium méthyl phosphonate (lot L09011902)	[dmim][$CH_3O(H)PO_2$]		>98
1-butyl-3-méthylimidazolium acétate (lot L08102002)	[bmim][CH_3OO]		>98
1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate (lot L09092901)	[bmim][BF_4]		99
1-butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhanesulfonyl) imide (lot L06100201)	[bmim][NTf_2]		>98

2.3 Méthodes de caractérisation

2.3.1 *Analyses en phase solide*

2.3.1.1 Granulométrie laser

La distribution de taille du solide est déterminée par diffraction laser. Les distributions granulométriques des particules sont calculées à partir des variations angulaires de l'intensité de la lumière diffusée. Lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées, les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles de diffraction à forte intensité. A l'inverse, les petites particules diffusent la lumière à de grands angles de diffraction à faible intensité. Les données relatives à l'intensité diffusée en fonction de l'angle

sont analysées pour calculer la distribution de taille des particules grâce à la théorie de Mie ou l'approximation de Fraunhofer.

Dans ce travail, cette méthode est utilisée par l'analyse de la distribution de taille de la molécule sous forme originale, des cristaux en suspension et des cristaux filtrés avant et après séchage. Les mesures sont effectuées en utilisant un granulomètre laser MasterSizer 3000 (Malvern Instruments, Royaume-Uni), pour des tailles comprises entre 0,01 et 3500 µm. Les échantillons sont dispersés dans de l'eau et ajoutés dans la cuve du granulomètre qui contient de l'eau jusqu'à l'obtention d'une obscuration entre 5 et 15%. Pour les cristaux encore en suspension, quelques gouttes de l'échantillon sont ajoutées directement dans la cuve. L'indice de réfraction de l'eau est de 1,33 et celui des particules 1,52 (par défaut). L'échantillon placé dans le granulomètre circule dans un circuit fermé par pompage. La pompe, ainsi que l'agitateur, tournent à une vitesse de 2200 tours.min^{-1}. Chaque échantillon est analysé dix fois avec un intervalle de temps de 5 secondes et un temps d'analyse de 30 secondes. De plus, les analyses sont réalisées sous ultrasons pour casser les agglomérats.

Les résultats sont analysés à partir de la distribution granulométrique en volume ou à partir de diamètres moyens $D_{4,3}$ et $D_{3,2}$. Ces derniers représentent le diamètre moyen en volume (ou en masse) et le diamètre moyen en surface-volume (ou diamètre de Sauter).

La distribution de taille en volume (%) du LASSBio-294 sous forme originale est représentée dans la Figure 2.1. Les valeurs de $D_{4,3}$ et $D_{3,2}$ sont respectivement de 57,9 µm et 29,5 µm, respectivement.

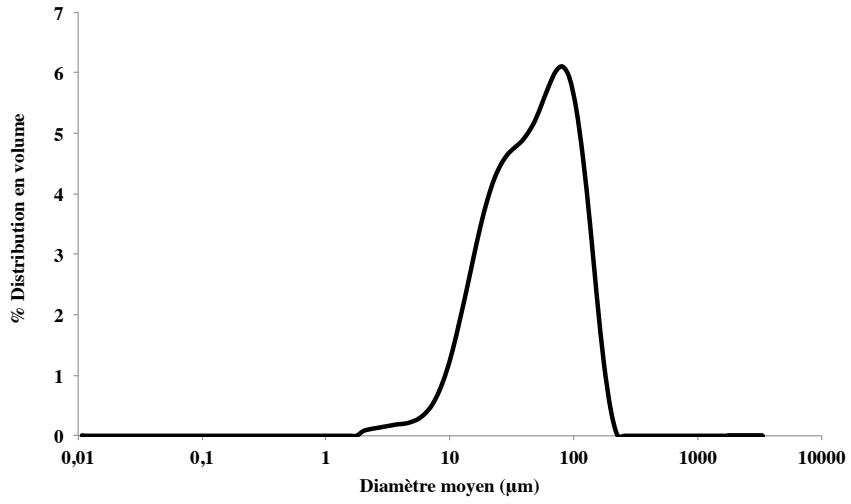


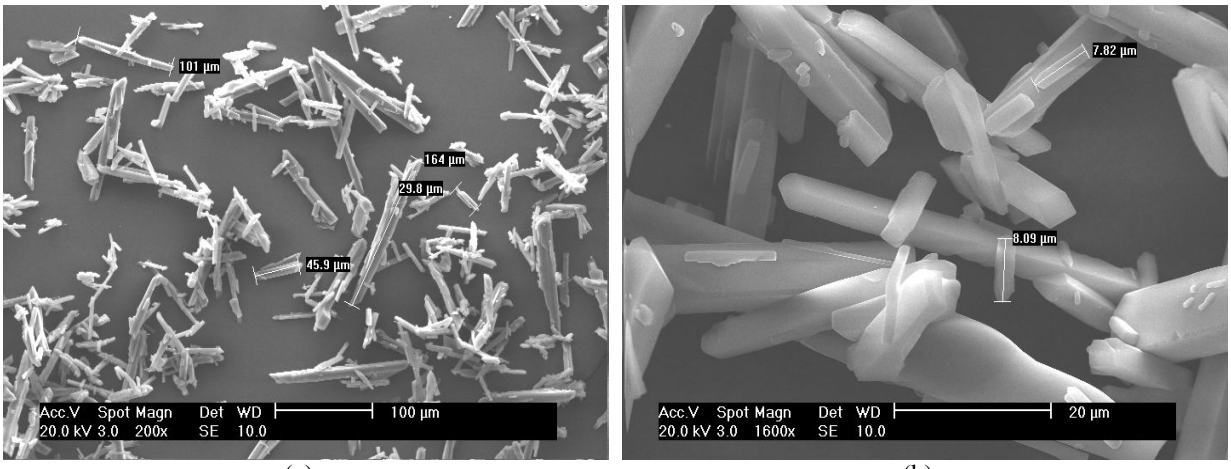
Figure 2.1. Distribution de taille en volume (%) de la poudre initiale.

2.3.1.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB sont prises avec un microscope électronique à balayage Philips XL30 FEG (Philips, USA). La poudre est fixée sur un support à l'aide d'un adhésif double face et recouverte de platine en utilisant un Polaron SC7640 haute résolution SEM pulvérisation coucheuse (Quorom Technologies, Angleterre). Les images sont prises à une tension d'accélération de 20 kV.

Ce type de microscopie est basé sur le principe des interactions électrons-matière : un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent la reconstruction d'une image de la surface.

La large distribution de taille présentée par la poudre d'origine (Figure 2.1) est confirmée par les images MEB (Figure 2.2). En outre, les images montrent que les cristaux du LASSBio-294 présentent une forme allongée de plusieurs microns.



(a) (b)

Figure 2.2. Images MEB de la poudre originale du LASSBio-294.

2.3.1.3 Pycnométrie à hélium

La masse volumique du LASSBio-294 est déterminée en utilisant un pycnomètre à hélium (AccuPyc 1330, Micromeritics™, Royaume-Uni). De l'hélium est injecté à une pression connue dans une cellule contenant le solide à analyser. Le gaz est ensuite détendu dans une cellule d'expansion. La pression du gaz dans cette cellule est mesurée. Le volume d'échantillon est calculé par la différence entre le volume de la cellule d'échantillon et de la

cellule d'expansion sur la variation de pression. Les volumes des deux cellules sont déterminés lors de l'étalonnage effectué à l'aide de sphères inoxydables de masse et volume connus. La masse de l'échantillon est pesée avant la mesure et elle est saisie dans le logiciel du pycnomètre qui calcule ainsi la masse volumique de l'échantillon. Les valeurs et écarts sont déterminés à partir de 25 mesures successives. L'analyse de la poudre originale donne une masse volumique de 1,4486 ± 0,0015 $g.cm^{-3}$, similaire à celle décrite par (Costa et al. 2013).

2.3.1.4 Goutte posée

Les angles de contact (θ) sont mesurés par la méthode de la goutte posée en utilisant un instrument de mesure d'angles de contact DSA30E (Instruments KRUSS, France). Cette méthode utilise des optiques pour mesurer l'angle de la goutte posée sur la surface. La forme de la goutte est enregistrée par une caméra, les images sont ensuite traitées par un ordinateur et stockées. L'appareil détermine une ligne de base, forme une ligne autour de la goutte et calcule l'angle de contact. La poudre est placée sur un porte-échantillon. Une goutte d'eau de 5 µL est placée sur la surface de l'échantillon et l'image est capturée par une caméra vidéo numérique CCD. Toutes les mesures sont effectuées dans les conditions ambiantes. La valeur d'angle de contact obtenue pour le LASSBio-294 sous forme originale est de 132,08 ± 0,79, ce qui confirme l'hydrophobicité de cette molécule.

2.3.1.5 Diffractométrie de rayons X

La diffraction de rayons X (DRX) permet la détermination des paramètres de maille de la structure cristalline du solide. Le solide est balayé par un faisceau de rayons X. Ces rayons sont générés par un tube à rayons cathodiques, filtrés à produire un rayonnement monochromatique. L'interaction des rayons incidents avec l'échantillon produit une interférence constructive (et un rayon diffracté) lorsque les conditions satisfont la loi de Bragg donnée par l'équation :

$$n\lambda = 2d\sin\left(\theta\right) \qquad \text{Équation 30}$$

n : Ordre du réseau de diffraction

λ : Longueur d'onde du faisceau incident

d : Distance entre les plans cristallins

θ : Angle du faisceau de diffraction.

Ces rayons X diffractés sont alors détectés et traités. La conversion des pics diffractés permet d'obtenir un spectre de diffraction. L'analyse DRX est effectuée afin de détecter des changements d'état physique et phases cristallines après la recristallisation. Les mesures sont faites avec un rayonnement CuKα à une vitesse de balayage de 0,018517°.s^{-1} de 8 à 40° en appliquant 45 kV et 40 mA (X'Pert Philips).

Le diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale est représenté dans la Figure 2.3. Les pics à [10,60, 14,33, 17,33, 19,71, 21,23, 23,37, 24,59, 25,19 et 26,54° en 2θ], indiquent qu'il s'agit d'un produit cristallin.

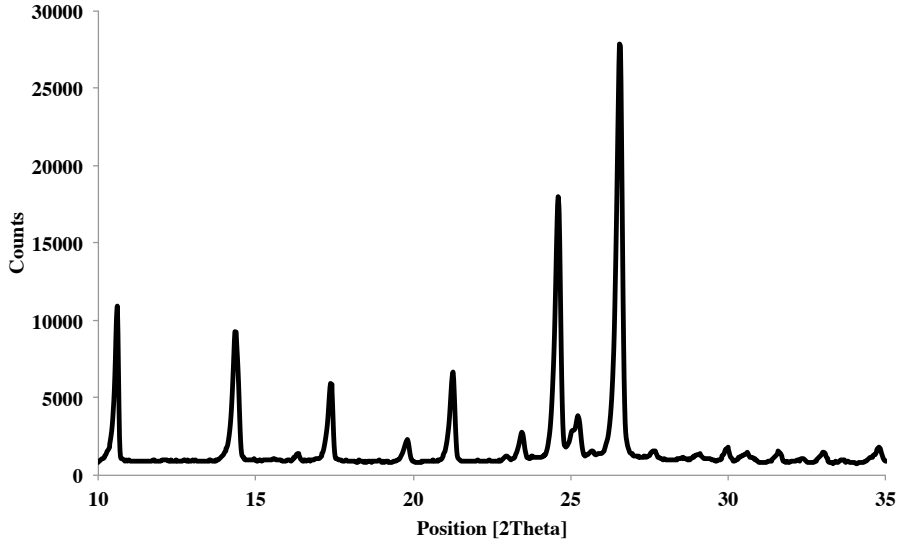


Figure 2.3. Diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale.

Ce diffractogramme, présenté dans la Figure 2.3, est similaire à celui obtenu par Costa et al. (2013) à partir de la diffraction de la poudre et celui déterminé préalablement par Kümmerle et al. (2009) à partir de la diffraction d'un monocristal. Selon Costa et al. (2013), il s'agit d'un système cristallin monoclinique. La structure cristalline est composée pour quatre

unités de formules par cellule unitaire (Z=4), qui recevoir une molécule dans l'unité asymétrique (Z'=1) (Figure 2.4). Dans la cellule, les quatre molécules sont liées par des liaisons hydrogène entre les atomes N(3)–H(8)···O(4) (D–H = 0,871(6) Å, H···A = 2,072(7) Å, D···A = 2,860(7) Å et D–H···A = 150,2(6)º; où "D" et "A" sont respectivement, l'atome donneur et accepteur des liaisons hydrogène), ce qui forme un réseau d'agrégats sur l'axe c (Figure 2.5a). Des interactions du type "π-stacking" entre la fonction N-acylhydrazone avec l'anneau thiophényl (C(13) – C(21) = 3,534 Å) et également entre la fonction N-acylhydrazone avec l'anneau 1,3-benzodioxoly (C(13) – O(17) = 3,386 Å) sont représentées sur la Figure 2.5b.

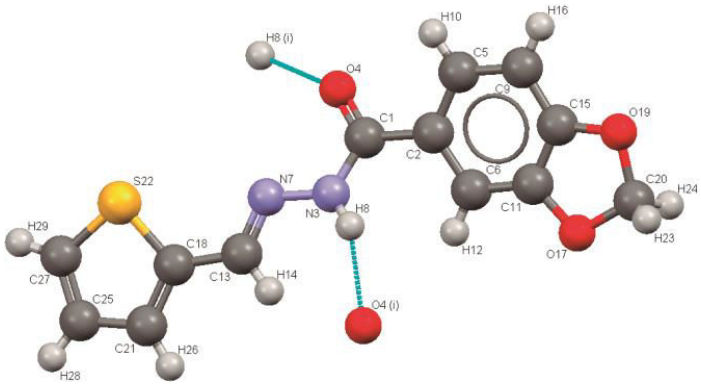
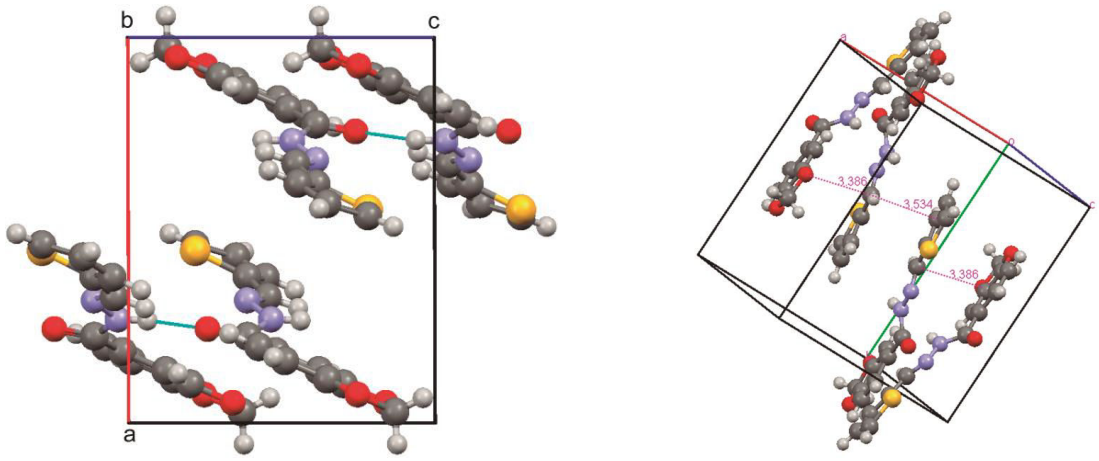


Figure 2.4. Structure cristalline du LASSBio-294 avec les liaisons hydrogène (en bleu) (Costa et al. 2013).



(a) (b)

Figure 2.5. (a) Représentation de la cellule unitaire du LASSBio-294 sur l'axe b e avec les liaison hydrogène, résultant à la formation d'un réseau d'agrégats moléculaires du LASSBio-294 sur l'axe c. (b) Possibles interactions du type "π-stacking" (en rose) entre les atomes de C(13)-C(21) et C(13)-O(17) (Costa et al. 2013).

2.3.1.6 Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (en anglais, *Differential Scanning Calorimetry* ou DSC) est une technique d'analyse thermique basée sur le fait que lors d'une transformation physique, telle qu'une transition de phase, une certaine quantité de chaleur est échangée avec l'échantillon pour qu'il soit maintenu à la même température que la référence. Le sens de cet échange de chaleur entre l'échantillon et l'équipement dépend de la nature endothermique ou exothermique du processus de transition.

L'enthalpie de fusion (ΔH_f) et la température correspondante (T_f) de la molécule sont déterminées en utilisant un analyseur thermique DSC Q200 (TA Instruments, France). Les échantillons (≈ 2 mg) sont analysés à une vitesse de chauffe de 10 °C.min^{-1} sous atmosphère d'azote (50 mL.min^{-1}) dans une plage de températures de 10 à 220 °C.

Le thermogramme du LASSBio-294 sous forme originale est donné dans la Figure 2.6. Le pic endothermique observé à 205,91 °C durant la phase de chauffe correspond à la fusion du produit avec une ΔH_f de 122,9 J/g. Ceci est en accord avec les résultats de caractérisation publiés par (Silva et al. 2005) et (Kümmerle et al. 2009). Dans la phase de refroidissement, une forme amorphe apparaît avec une transition vitreuse T_g visible à 64,94°C (ΔC_p=-0,2207 J/g/K).

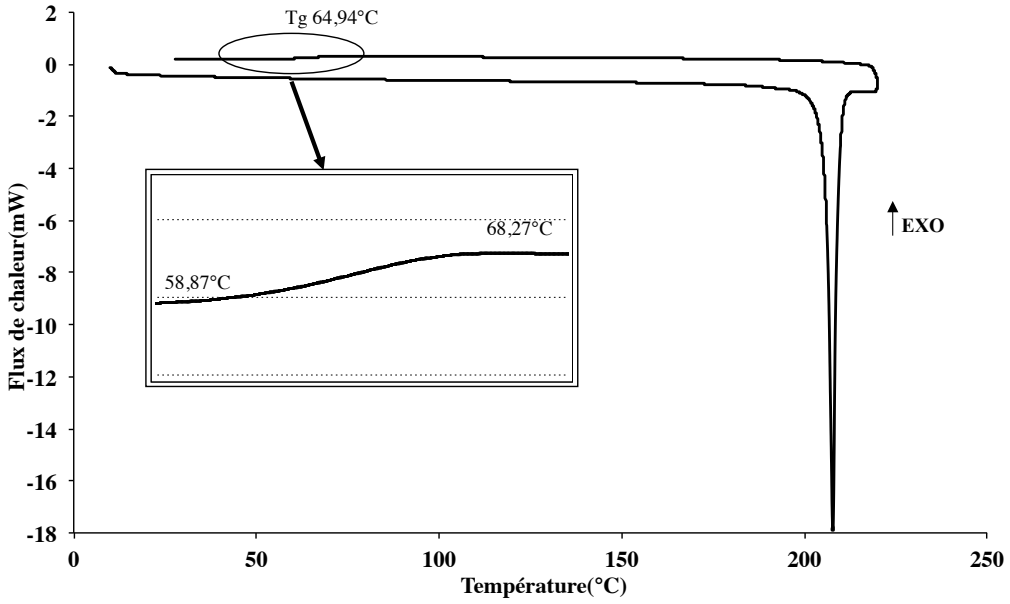


Figure 2.6. Thermogramme DSC du LASSBio-294 sous forme originale obtenu sous atmosphère d'azote (50 mL.min^{-1}) avec une programmation en température de 10 à 220 °C à 10 °C.min^{-1}.

2.3.2 *Analyses en phase liquide*

2.3.2.1 Quantification de la molécule en solution

La chromatographie liquide de haute performance (en anglais, High Performance Liquid Chromatography, HPLC) est utilisée comme technique de quantification de la molécule en solution. Cette technique permet la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Le système chromatographique est composé d'un réservoir de solvant (phase mobile), d'un système de pompage, d'une colonne (phase stationnaire), d'un injecteur, d'un détecteur et d'une station d'acquisition de donnés (Figure 2.7).

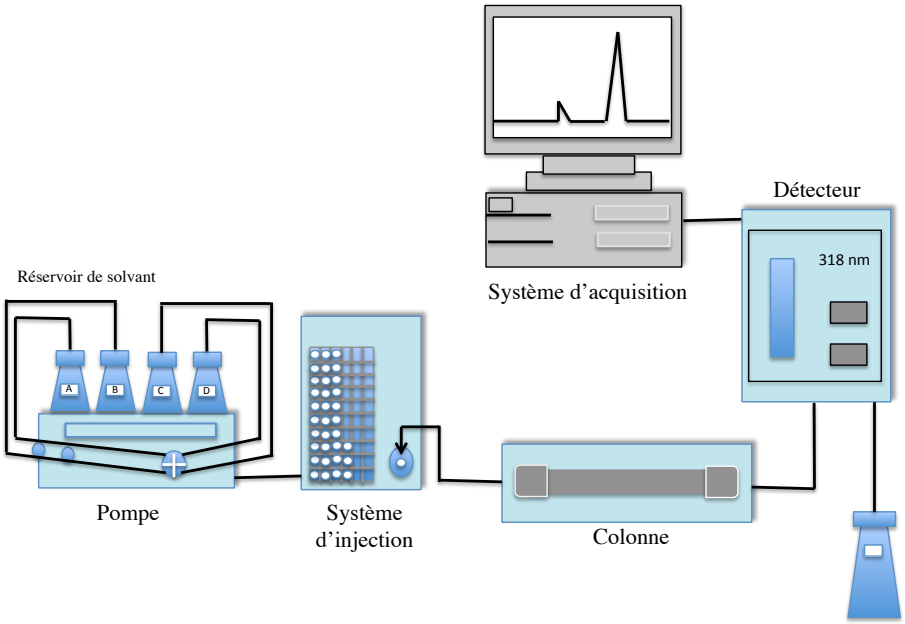


Figure 2.7. Schéma du système chromatographique.

Le principe de séparation est basé sur l'interaction des solutés entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire et la phase mobile. La phase mobile parcourt la phase stationnaire. Le mélange à analyser est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui, poussée par une pompe sous haute pression, le transporte au travers du système chromatographique. Les constituants du mélange se répartissent alors suivant leur affinité et, en sortie de colonne, sont caractérisés grâce au détecteur. Le système d'HPLC utilisé dans ce travail est constitué d'un Chromatographe Agilent (Modèle série 1100) équipé d'un détecteur UV-Vis. Les conditions chromatographiques utilisées sont basées sur les

conditions expérimentales fournies par Cristália (Ltda). La séparation est effectuée en utilisant une colonne XTerra $^{TM}RP_{18}$ 5 µm (3,9 mm x 150 mm). La longueur d'onde est de 318 nm et le volume d'injection de 20 µL.

2.3.2.1.1 Quantification à partir de solutions aqueuses

Les échantillons contenant le LASSBio-294 préparés avec des solutions aqueuses ou de l'eau pure sont analysés avec une phase mobile constituée d'un mélange de 20 % d'acétonitrile et 80 % de tampon phosphate (NaH_2PO_4) 0,02 M pH 4,5 avec une solution d'acide phosphorique 1 % (H_3PO_4), considérant un débit de 1,0 $mL.min^{-1}$.

Afin d'évaluer la confiance des résultats obtenus, quatre paramètres de validation sont étudiés : la linéarité, la spécificité, la répétabilité et l'exactitude.

La linéarité d'une méthode est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la concentration en analyte à doser dans l'échantillon.

La spécificité est la propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte.

La répétabilité exprime la fidélité, ou en d'autres termes le degré de dispersion des résultats, évaluée dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps.

L'exactitude est défini par l'étroitesse entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée ou théorique. C'est une mesure de l'exactitude de la réponse donnée (FDA 1997).

Linéarité

Pour effectuer cette analyse, six solutions de LASSBio-294 sont préparées par dissolution de la poudre dans 60% d'acétonitrile et 40% de tampon NaH_2PO_4 : 1,5, 3, 5, 10, 15 et 20 µg/g de solution.

La courbe d'étalonnage obtenue montre une bonne corrélation pour la gamme de concentration de 1,5 à 20 µg/g ((Aire (mAU*s) = 58,855 C (µg/g solution) - 10,3), avec un coefficient de corrélation R^2 = 0,99972, supérieur au minimum recommandé par les agences de régulation ICH (1996) et (FDA 1997) (Figure 2.8).

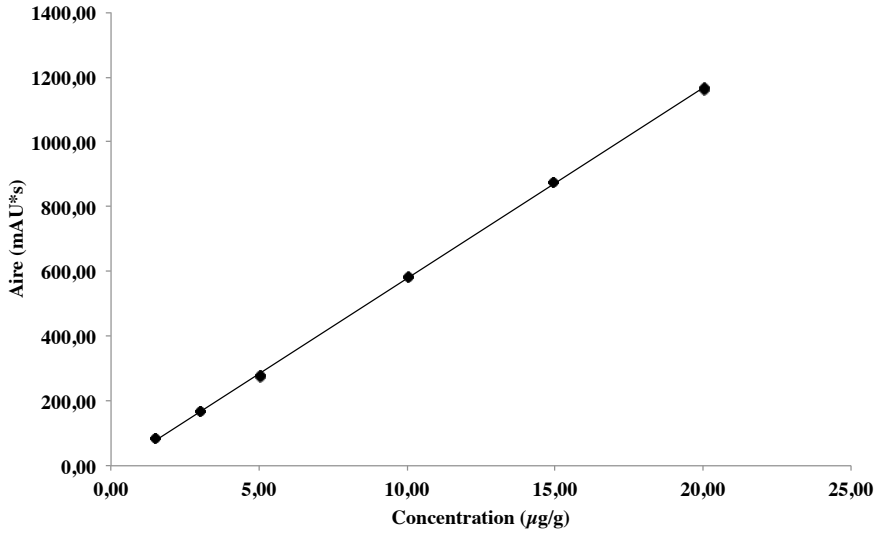


Figure 2.8. Courbe d'étalonnage pour la quantification du LASSBio-294 en solutions aqueuses.

Spécificité

La spécificité est déterminée par analyse des milieux aqueux purs. Les milieux évalués sont : eau, solution aqueuse de HCl 0,1 N, solution tampon pH 4,5, pH 5,8, pH 6,8, pH 7,4, pH 8,0, pH 10, pH 11, pH 12, pH 13, solution aqueuse contenant du lauryl sulfate de sodium (LSS) 0,5 %, tampon phosphate pH 6,8 et pH 7,4 contenant LSS 0,5 %, et aussi la phase mobile.

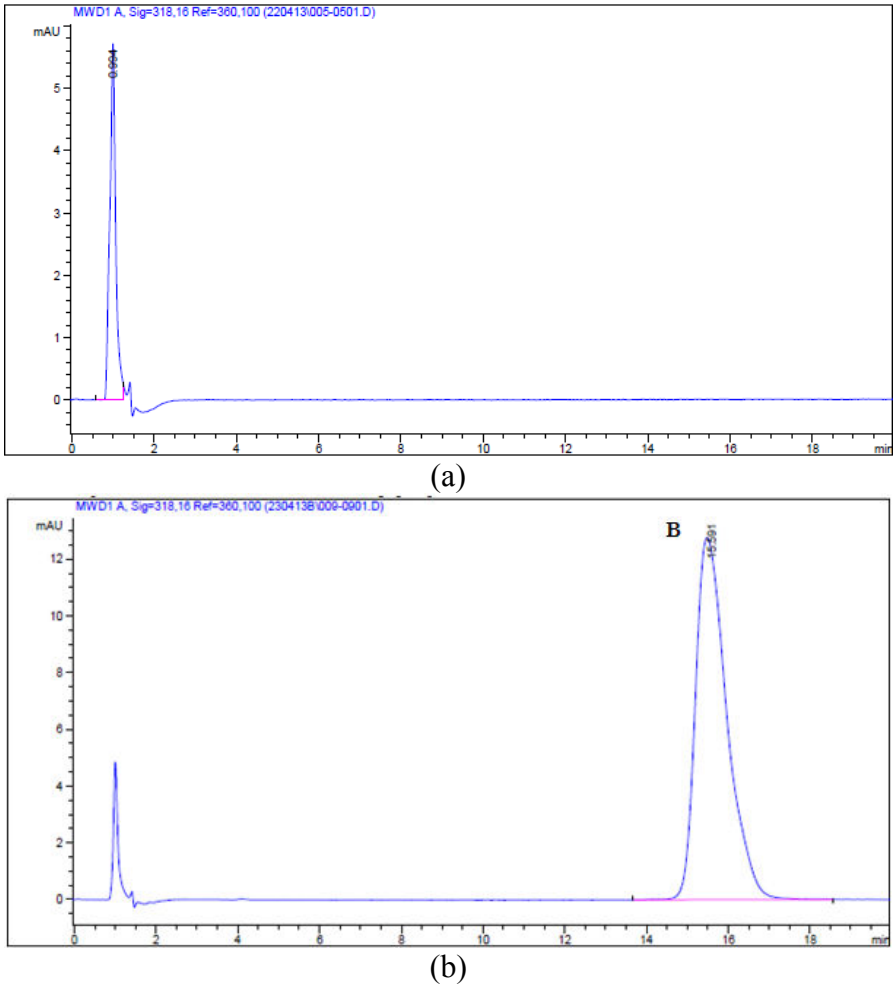
Lors de la comparaison des chromatogrammes obtenus en absence de la molécule avec ceux contenant la molécule étudiée, nous avons identifié que les milieux aqueux n'interfèrent pas sur la quantification de la molécule en solution. La Figure 2.9 montre un exemple de chromatogramme obtenue sans et avec le LASSBio-294.

Répétabilité

La répétabilité est évaluée par l'analyse de trois solutions, préparées le même jour, contenant des concentrations basses, moyennes et hautes ou par l'analyse de six solutions considérant la gamme de concentration de la courbe. Les résultats s'expriment par le coefficient de variation (CV%) déterminé par :

$$CV\% = ecartype / moyenne * 100 \qquad \text{Équation 31}$$

Les valeurs de CV% montrés dans le Tableau 2.2 indiquent que la méthode présente une bonne répétabilité avec un CV (%) inférieur à 5 %, sauf à faible concentration du à la sensibilité d'équipement.



(a)

(b)

Figure 2.9. Spécificité de la méthode. Chromatogramme du tampon phosphate pH 7,4 en absence de la molécule (a) et chromatogramme de la molécule dissous dans le tampon phosphate pH 7,4 et ACN (b).

Tableau 2.2. Répétabilité intra-jour de la méthode de quantification.

Concentration* ($\mu g/g_{solution}$)	Répétabilité (CV %)
1,52	6,96
5,06	1,94
14,97	2,07

*Moyenne de trois échantillons préparés le même jour et analysés trois fois chacun.

Exactitude

L'exactitude est évaluée de façon similaire à la répétabilité. Des solutions de concentrations basses, moyennes et hautes de la gamme de concentration de la courbe sont préparées et analysées le même jour. L'exactitude s'exprime par le rapport de concentration mesurée en fonction de la concentration théorique, donné par :

$$Exactitude(\%) = C_{mesurée} / C_{théorique} * 100 \qquad \text{Équation 32}$$

$C_{mesurée}$: concentration calculée à partir de l'aire obtenue par analyse HPLC (µg/g solution).

$C_{théorique}$: concentration déterminée par la pesée (µg/g solution).

Les résultats exprimés dans le Tableau 2.3, indiquent une bonne exactitude avec des valeurs comprises entre 95,0 et 105,0 %.

Tableau 2.3. Exactitude intra-jour de la méthode de quantification.

Concentration théorique ($\mu g/g_{solution}$)	Concentration mesurée* ($\mu g/g_{solution}$)	Exactitude (%)
1,52	1,53 ± 0,11	101,02
5,06	4,81± 0,09	95,03
14,97	14,70 ± 0,30	98,26

*Moyenne de trois échantillons préparés le même jour et analysés trois fois chacun.

2.3.2.1.2 Quantification à partir de solutions contenant des LIs

Pour la quantification de la molécule à partir de solutions contenant des LIs la phase mobile est constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau, avec un débit de 0,8 $mL.min^{-1}$.

Dans ce cas, la linéarité est évaluée à partir de sept solutions préparées par dissolution de la poudre dans 60% d'acétonitrile et 40% d'eau. Une nouvelle courbe d'étalonnage est obtenue dans l'intervalle de concentration de 0,05 µg/g à 302 µg/g solution. La courbe d'étalonnage obtenue (Aire (mAU*s) = 72,039 C (µg/g solution) montre une bonne corrélation pour cette gamme de concentration avec un coefficient de corrélation de R^2 = 0,9973. En comparant les chromatogrammes obtenus en absence de la molécule (eau, acétonitrile et liquides ioniques) avec ceux contenant la molécule étudiée, nous avons constaté que les solvants n'interfèrent pas sur à la quantification de la molécule en solution. Pour la répétabilité, six échantillons contenant la même concentration sont analysés. Les résultats montrés dans le Tableau 2.4 indiquent que la méthode présente une bonne répétabilité avec un coefficient de variance inférieur à 5%.

Tableau 2.4. Répétabilité de la méthode de quantification.

Aire (mAU)	Concentration mesurée (µg/g)
4875,00	67,65
4843,70	67,24
4919,60	68,29
4927,31	68,40
4901,95	68,05
4883,92	67,80
Moyenne	67,90
CV%	0,64

*Échantillons préparés le même jour et analysés deux fois chacun.

2.4 Mesures de solubilité du LASSBio-294

En général, la solubilité du LASSBio-294 dans différents milieux aqueux, dans l'eau, dans des LIs et dans des mélanges eau/LIs est déterminée selon le mode opératoire suivant : des suspensions contenant le solide en excès sont maintenues agitées dans un bain à une température contrôlée et à pression atmosphérique (Figure 2.10). Après un intervalle de temps déterminé, des prélèvements sont effectués, les suspensions sont filtrées (GHP Acrodisc, taille

des pores 0,2 µm, Millipore, Bedford, MA, États-Unis) et les solutions sont analysées par HPLC pour évaluer la quantité de soluté dissous.

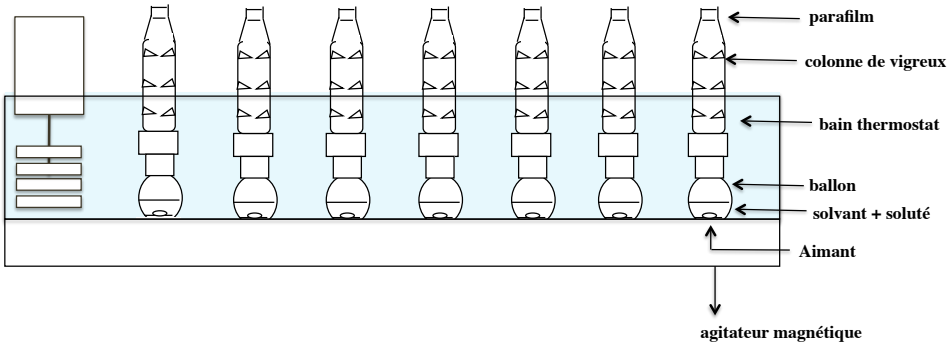


Figure 2.10. Montage expérimental pour les essais de solubilité.

2.4.1 *Solubilité dans des milieux aqueux*

Ce procédé a été réalisé en deux étapes. Dans un premier temps, la solubilité a été déterminée dans des milieux aqueux sans additifs de pH 1,2 à 13 afin de déterminer le pKa de la molécule, et plus spécifiquement de pH 1,2 à 8,0 (pH physiologiques) pour le choix du milieu de dissolution. Dans un second temps, la solubilité est mesurée dans des milieux aqueux avec additif (lauryl sulfate de sodium, LSS). L'ensemble de touts ces milieux est résumé dans le Tableau 2.5. Les solutions tampon contenant LSS 0,5 % sont préparées avec les sels de sodium monobasique et dibasique et non avec le potassium, normalement utilisé, dû à l'incompatibilité physique entre les ions de potassium et le LSS (Wade & Weller 1994).

Dans ce cas, les suspensions préparées avec 0,02 g de soluté et 50 g solvant sont maintenues agitées dans le bain à une température de 37 °C ± 0,5 °C et pression atmosphérique. Après 3, 24 et 48 h, des prélèvements sont effectués, les solutions sont filtrées et analysées par HPLC.

Tableau 2.5. Milieux utilisés pour détermination de la solubilité.

Milieux sans additifs	pH
Eau	6,0 – 7,0
HCl 0,1 N	1,2
Tampon phosphate de sodium monobasique*	4,5
Tampon phosphate de potassium**	5,8 ; 6,8 ; 7,4 et 8,0
Tampon carbonate de sodium#	10
Tampon phosphate de sodium dibasique#	11
Tampon chlorure de potassium#	12, 13
Milieux avec additifs	**pH**
Solution aqueuse contenant LSS 0,5 %#*	6,0 - 7,0
Tampon phosphate de sodium contenant LSS 0,5 %#*	6,8 et 7,4

*Solution tampon utilisé pour la phase mobile.
** United States Pharmacopeia, 2005.
#http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html.
#*Gomes et coll., 2012.

2.4.2 *Solubilité dans des LIs et dans des milieux contenant des LIs*

Lors de l'utilisation de liquides ioniques, les essais ont été réalisés à 15, 25 et 35 °C. De plus, dans ce cas, les échantillons sont centrifugés après 72 h pendant 15 minutes à 4000 tours/min. Le surnageant prélevé est dilué avec un mélange de 60 % d'acétonitrile et 40 % d'eau (m/m) et les solutions sont filtrées et analysés par HPLC. La solubilité dans l'eau pure a été aussi déterminée dans cette gamme de température.

Les résultats de solubilité sont rapportés dans le Chapitre 3.

2.5 Stabilité du LASSBio-294 dans des milieux aqueux

D'après les résultats de solubilité du LASSBio-294 dans les milieux aqueux, une étude de stabilité est consacrée à la vérification d'une possible dégradation de la molécule. Cette étude de stabilité est réalisée par deux méthodes. La première consiste à re-diluer une solution mère avec nos divers milieux de dissolution. Pour la deuxième, les suspensions pour les mesures de solubilité sont préparées avec un excès de solide plus important, afin de vérifier si la dégradation de la molécule en solution dépend de la quantité de solide en suspension et d'analyser le solide en fin de mesure.

2.5.1 *Influence du pH sur la stabilité de la molécule en solution*

Une solution mère est préparée, à une concentration de 100 µg/g solution, avec 60 % d'acétonitrile et 40 % de tampon phosphate de sodium monobasique 0,02 M (NaH_2PO_4). Cette solution est diluée avec nos divers milieux de dissolution (≈ 15 µg/g solution). Les solutions obtenues sont analysées par HPLC et spectrophotométrie UV (Hewlett Packard 8452A Diode Array). Les analyses par spectrophotométrie UV sont faites dans la zone d'absorption de 200 à 400 nm afin de vérifier si le spectre d'absorption est modifiée au cours du temps.

2.5.2 *Influence de la teneur en solide sur la dégradation de la molécule*

Les échantillons sont préparés de façon similaire au protocole de solubilité décrit dans la Partie 2.4. Dans ce cas, pour avoir un excès plus importante, 1 g de la poudre est placée dans un ballon de 100 mL contenant 50 g du milieu aqueux utilisé (eau, pH 1,2, pH 6,8, pH 7,4 et solution aqueuse contenant du LSS 0,5 %). Pour l'eau, des échantillons avec 0,1, 0,5 et 2 g de la poudre sont aussi préparés. Après l'intervalle de temps déterminé, les solutions sont filtrées (filtres de taille des pores 0,2 µm) et la poudre récupérée est séchée dans une étuve à 200 mbar à 50°C. Après séchage, les solides sont caractérisés par MEB et DRX.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le Chapitre 3.

2.6 Détermination de la pureté du solide

En accord avec (ICH, International Conference on Harmonisation, Guideline Q3A (R2) 2006), les impuretés sont définies comme tous les composants de la nouvelle substance médicamenteuse qui ne sont pas une entité chimique définie comme la substance médicamenteuse. La nature et la quantité des ces impuretés est régies par un certain nombre de facteurs, y compris la route de synthèse pour la substance, les conditions de réaction, la qualité des matières premières, les réactifs, les solvants, les étapes de purification, le processus et le stockage (Basak et al. 2007). Ces impuretés sont classées comme organiques, inorganiques ou des solvants résiduels.

Les impuretés organiques (liées au procédé ou à la molécule) peuvent apparaître durant le processus de fabrication et/ou de stockage du produit. Ils peuvent être identifiés ou non identifiés, volatiles ou non (exemple, les produits de dégradation). Les impuretés inorganiques peuvent provenir du processus de fabrication. Ils sont normalement connus et identifiés (exemple : les sels inorganiques, tels que les tampons phosphate). Les solvants sont des liquides inorganiques ou organiques utilisés en tant que véhicules pour la préparation de solutions ou de suspensions dans la synthèse d'une nouvelle substance médicamenteuse. Dans la plupart de cas, ces impuretés doivent être éliminées ou au moins minimisées, car leurs présences en grande quantité peuvent influencer l'efficacité et la sécurité du produit fini (Basak et al. 2007; Hulse et al. 2008). Ainsi, l'identification, la quantification et le contrôle de ces impuretés sont importants pendant le processus de développement d'un nouveau produit.

2.6.1 *Quantification des impuretés organiques*

Afin de déterminer la pureté organique des cristaux de LASSBio-294 formés à travers le processus de cristallisation par effet anti-solvant, 0,5 g de la poudre est dissoute avec 60% d'acétonitrile et 40% de solution tampon phosphate pour avoir une concentration de 10 µg/g de solution. Ces solutions sont mises sous ultrasons pendant 15 minutes pour assurer que 100 % de la molécule soit dissoute. Ensuite, ces échantillons sont analysés par HPLC selon la méthode décrite dans la partie 2.3.2.1. La pureté organique est calculée à partir du rapport entre la concentration mesurée pour la poudre synthétisée et la poudre initiale (Équation 33). Les résultats de cette caractérisation seront présentés dans le Chapitre 4.

$$Pureté = \frac{Aire_{Échantillon}}{Aire_{LASSBio-294}} x Pureté_{LASSBio-294}(\%) \qquad \text{Équation 33}$$

$Aire_{Échantillon}$: aire d'échantillon contenant la poudre synthétisée (100 % dissous) (mAU*s) ;

$Aire_{LASSBio-294}$: aire d'échantillon contenant la molécule originale (100 % dissous) (mAU*s) ;

2.6.2 *Quantification du solvant résiduel*

Dans le cas des impuretés de solvants résiduels, les limites acceptables dans les produits pharmaceutiques pour la plupart des solvants sont présentés par (ICH International Conference on Harmonisation, Guideline Topic Q3C (R4) 2009)(ICH, International Conference on Harmonisation, Guideline Q3A (R2) 2006). Cette directive recommande l'utilisation de solvants moins toxiques et décrite les niveaux considérés comme acceptables sur le plan toxicologique pour certains solvants résiduels. Pour des solvants où l'utilisation doit être éviter (Classe 1), comme le benzène la concentration limite est de 2 ppm. Pour des solvants d'utilisation limité (Classe 2), comme l'acétonitrile et le méthanol, les concentrations limites sont respectivement de 410 ppm et 3000 ppm. Enfin, pour des solvants de faible potentiel toxique (Classe 3), comme l'acétone une concentration limite de 5000 ppm est acceptable.

En ce qui concerne l'utilisation de LIs comme solvants, aucune directive décrivant les limites acceptables pour ce type de solvant n'a été publiée. Considérant leur faible toxicité, nous pouvons envisager de limiter la concentration résiduelle des LIs à 5000 ppm.

Des méthodes qui reportent la détermination des LIs commençant à recevoir très attention (Molíková et al. 2009 ; Gao et al. 2010 ; Huang et al. 2012). La détermination des anions du LI est principalement effectuée par chromatographie ionique (Villagrán et al. 2004 ; Hao et al. 2008). D'autre part, la quantification des cations peut être réalisée par chromatographie liquide de phase reverse (Stepnowski & Mrozik 2005), par chromatographie ionique (Gao et al. 2010) et par électrophorèses capillaire (Qin et al. 2002; Markuszewski et al. 2004).

Dans ce travail, nous développerons une méthode de quantification du cation 1-éthyl-3-méthylimidazolium [emim] du LI par chromatographie ionique. Cette technique est un type de chromatographie liquide : la phase stationnaire est un solide et la phase mobile est un liquide. Comme tout système de chromatographie, une chromatographie ionique comprend : un système d'injection ; une pompe de circulation ; une colonne de séparation spécifique aux éléments à analyser ; un éluant qui assure le transport des espèces et un système de détection (Figure 2.11).

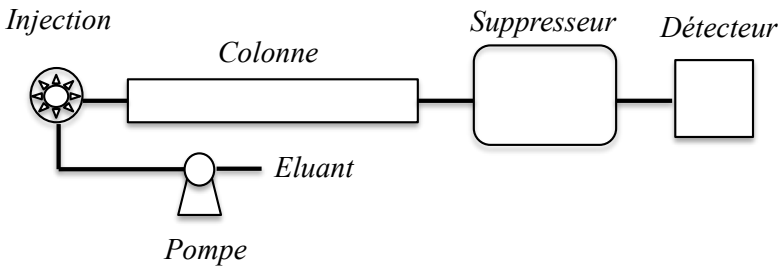


Figure 2.11. Schéma du système de chromatographie ionique.

La colonne de séparation est constituée par une résine échangeuse d'ions. Le mécanisme qui régit ce processus est l'interaction électrostatique entre les ions présents dans l'échantillon et ceux présents dans les résines d'échanges constituées de groupements ionisés. Les groupements dérivés d'acide sulfonique et d'acide carboxylique sont utilisés pour l'échange de cations, pendant que les sels d'ammonium quaternaire et les amines pour l'échange des anions (Figure 2.12). L'échantillon à analyser est injecté en tête de colonne. La migration des espèces se fait selon leur affinité pour la résine. La migration est assurée par l'éluant, (acide pour le dosage de cations, basique pour le dosage des anions) injecté par la pompe.

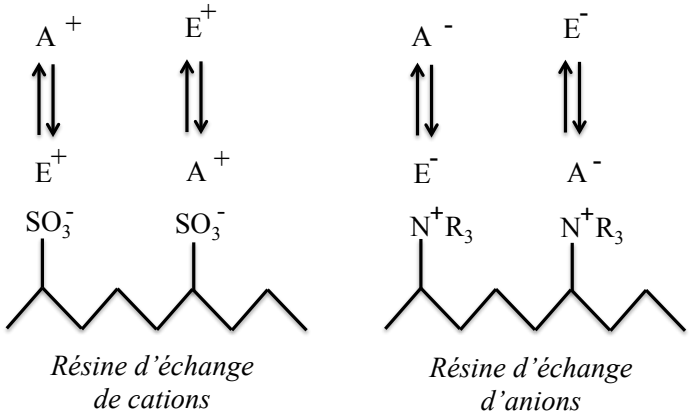


Figure 2.12. Représentation schématique du processus de séparation par chromatographie ionique. Les ions d'échantillons sont présentés par A (analyte) et les ions de l'éluant par E.

En sortie de colonne chaque élément ainsi séparé est caractérisé par le détecteur. Le détecteur classique est une cellule de conductivité. L'amplitude du signal dépend de la conductivité équivalente de l'ion, de sa charge et de sa concentration.

Un système avec un surpresseur est utilisé pour augmenter la sensibilité de la méthode. Son rôle est de supprimer la conductivité de l'éluant, afin que le pic de l'élément à analyser soit le plus net possible. Dans le cas de cations, l'éluant acide est neutralisé par des ions OH^- qui suppriment son signal de conductivité. Pour l'analyse des anions, son éluant basique est neutralisé par des ions H^+ qui suppriment son signal de conductivité. Celui-là est placé entre la colonne et le détecteur.

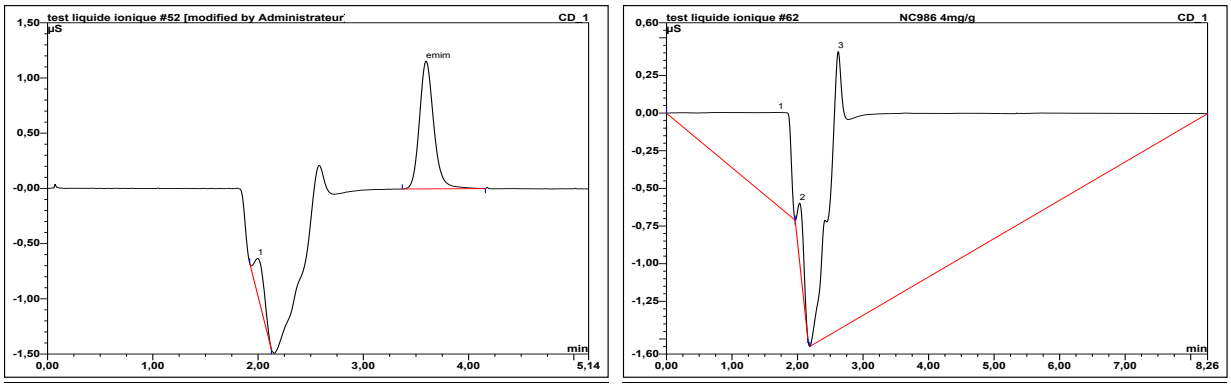
Le système utilisé dans ce travail pour la quantification du cation (emim) est constitué d'un Chromatographe Ionique Dionex ICS-3000 (Modèle série 1100) équipé d'un détecteur de conductimétrie et un suppresseur LERS 500 (Ultra 4 mm). La séparation est effectuée en utilisant une colonne IonPac CS17 (4 mm x 250 mm) et une pré-colonne IonPac CG17 (4 mm x 50 mm). Les échantillons sont analysés avec un débit de 1,0 $mL.min^{-1}$ et volume d'injection de 25 µL à 35 °C. L'éluant est constitué d'un mélange de 80 % d'une solution d'acide méthane-sulfonique (MSA) à 20 mM et 20 % d'acétonitrile. Pour la mise au point de la méthode la linéarité et la spécificité sont déterminées.

Pour la linéarité, sept solutions étalons sont préparées par dilution du LI ([emim][$CH_3O(H)PO_2$]) dans 100 % ACN : 0,6, 1,4, 6, 14, 29, 57 et 144 µg/g de solution. La droite de régression est calculée en traçant l'aire du pic par la concentration de la solution.

La courbe d'étalonnage obtenue (Aire (µS*min) = 0,0165 C (µg/g solution) - 0,0495) montre une bonne corrélation pour la gamme de concentration étudiée avec un coefficient de corrélation R^2 = 0,99543, supérieur au minimum recommandé par les agences de régulation (ICH- International Conference on Harmonisation 1996) (FDA 1997).

L'analyse des solutions en absence du LI a démontrée que la méthode est spécifique pour la quantification de ce type de solvant (Figure 2.13).

Ces résultats indiquent que cette méthode est adaptée pour l'analyse de résidu du LI dans le solide (résultats présentés dans le Chapitre 4).



(a) (b)

Figure 2.13. Chromatogramme d'une solution contenant le [emim][$CH_3O(H)PO_2$] à 14 µg/g de solution (a) et chromatogramme d'une solution en absence du [emim][$CH_3O(H)PO_2$] et contentant le LASSBio-294 à 4000 µg/g de solution (b).

2.7 Détermination de la viscosité des solutions LI/LASSBio-294 et des mélanges Eau/LI

La rhéologie est la science qui traite de l'écoulement des fluides et de leurs déformations sous l'action de contraintes. Un fluide soumis à un ensemble de force est susceptible de se déformer. Les mouvements des différents points du fluide dépendent de la répartition, de l'orientation et l'intensité des forces appliquées. Certaines de ces forces peuvent engendrer un mouvement dit laminaire de cisaillement.

L'écoulement de cisaillement laminaire est celui où la déformation du fluide s'effectue par glissement des différentes couches de fluide les unes sur les autres sans transfert de matière de l'une à l'autre. C'est un mouvement laminaire, parfaitement ordonné et stratifié, sans brassage ni variation de volume.

De ce fait, la viscosité peut être définie comme résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière. La viscosité de cisaillement (µ) (ou viscosité dynamique) équivaut à la contrainte de cisaillement (τ) nécessaire pour produire un gradient de vitesse d'écoulement ($\dot{\gamma}$) d'une unité dans la matière (Aulton 2002). Elle est calculée par :

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$ Équation 34

L'unité de la contrainte de cisaillement est le pascal (Pa) et celle de la vitesse de cisaillement est l'inverse de la seconde (s^{-1}). La viscosité de cisaillement est donc le pascal-seconde (Pa.s).

La relation entre les déformations du fluide et les contraintes appliquées sont traduites par le comportement rhéologique d'un fluide. Il existe une grande variété de comportements rhéologiques, les plus courants sont les newtonien, rhéo-fluidifiant, rhéo-épaississant et Bingham (Figure 2.14) (Aulton 2002).

Dans le cas du fluide newtonien, la contrainte de cisaillement évolue linéairement avec la vitesse de cisaillement et la viscosité reste constante, quelle que soit la vitesse de cisaillement (exemple, l'eau et glycérine). Lorsque la contrainte de cisaillement n'évolue pas de façon linéaire avec la vitesse de cisaillement et présente une concavité tournée vers le bas, la viscosité du fluide diminue avec la vitesse de cisaillement, il s'agit de fluide rhéo-fluidifiant (les colles, les ciments et les polymères). D'autre part, si la concavité du rhéogramme est dirigée vers le haut, le fluide augment avec la vitesse de cisaillement. Ce type de fluide est appelé rhéo-épaississant (dispersions concentrées). Les fluides du type Bingham sont un type de fluide que ne s'écoule qu'à partir d'une contrainte minimum, les plus connu est la peinture à l'huile.

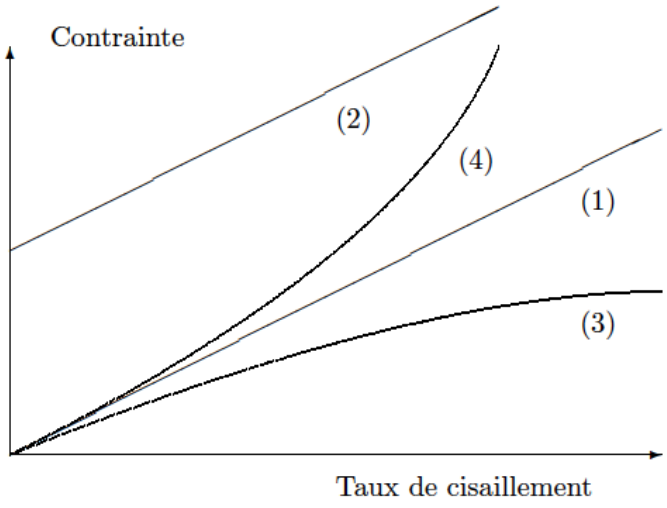


Figure 2.14. Rhéogrammes caractéristiques des différents comportements (1) Newtonien (2) Bingham (3) Rhéo-fluidifiant et (4) Rhéo-épaississant.
Source : http://tpe-maizena.blogspot.fr/p/classification-des-fluides.html

Dans ce travail, un rhéomètre du type Rheostress 600 (RS600, Thermo Electron) est utilisé pour la mesure de la viscosité de solutions LI/LASSBio-294. Ce rhéomètre fonctionne

grâce à un palier fluide afin de diminuer les frottements au sein du moteur (pression d'air de l'ordre de 2 bars). La gamme de couple disponible est de 0,1 µN.m à 200 mN.m. Il est accompagné de différentes géométries de mesures, d'un système de contrôle de température (système Peltier), d'un système informatique possédant le logiciel Rheowin 3 permettant l'acquisition des donnés. Les analyses sont réalisées en cisaillement simple, en utilisant une géométrie du type plan-plan (PP35 HT). Des solutions de différentes concentrations sont préparées par dilution du LASSBio-294 dans le LI choisi : 60 mg/g, 100 mg/g, 125 mg/g, 150 mg/g, 200 mg/g et 250 mg/g de solvant. Les échantillons sont soumis à une montée puis une descente en contrainte de 20 à 200 Pa en 1,5 minutes. L'effet de la température sur la viscosité de ces solutions est étudié considérant une programmation de température de 25 à 50°C.

Pour la mesure de la viscosité des mélanges eau/LI un viscosimètre Brookfield est utilisé. Des mélanges avec différentes proportions eau/LI sont préparés : 3; 5; 7; 14 et 20. Les mesures sont réalisées à 25 °C.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le Chapitre 3.

2.8 Conclusions

Nous avons présenté dans ce chapitre les diverses méthodes mises au point pour la caractérisation des propriétés physico-chimiques du LASSBio-294 initial et recristallisé est présenté dans ce chapitre. La caractérisation du LASSBio-294 initial par granulométrie laser et microscopie électronique à balayage a montré que les cristaux sont de tailles micrométrique et qu'ils ont une forme allongée. Son diffractogramme au RX permet de dire qu'il s'agit d'un produit cristallin. L'analyse thermique par DSC montre un point de fusion à 205,91 °C avec une enthalpie de fusion ΔH_f de 122,9 J/g.

Deux méthodes de quantification de la molécule en solution par HPLC sont développées. Ces méthodes ont présenté une bonne linéarité, une bonne spécificité, une bonne précision (limitée pour les faibles concentrations) et une bonne exactitude dans la gamme de concentrations utilisées. La première méthode permet la détermination de la solubilité de la molécule dans des milieux aqueux avec différentes valeurs de pH. Celle-ci s'est avérée indispensable pour l'estimation du pKa et l'évaluation de la stabilité de la molécule afin de choisir un milieu approprié pour étudier sa dissolution. La deuxième méthode s'applique pour

la mesure de la solubilité de la molécule dans des LIs et/ou dans des milieux contenant des LIs, qui sont des paramètres essentiels pour le choix des conditions opératoires de cristallisation (type de solvant, rapport solvant/anti-solvant…).

Une technique de quantification du cation du LI par chromatographie ionique est également développée avec une bonne linéarité et une bonne spécificité. Elle est utilisée pour la quantification du solvant résiduel dans les cristaux obtenus.

Des méthodologies pour la détermination de la viscosité des solutions LI/LASSBio-294 et des mélanges Eau/LI sont données. Ce type d'analyse est important lors de la détermination des conditions hydrodynamiques du processus de cristallisation et pour l'estimation des temps caractéristiques de mélange.

Chapitre 3 : Solubilité du LASSBio-294

3.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de la solubilité du LASSBio-294.

Dans une première partie l'étude de la solubilité de cette molécule dans des milieux aqueux est présentée en détail : effet du pH et de la présence d'additifs.

Dans une deuxième partie, la solubilité de notre molécule dans des liquides ioniques et dans des mélanges LI-eau est présentée : effet du type de LI sur la solubilité et compréhension du mécanisme de solubilisation.

L'étude de la solubilité du LASSBio-294 permet d'une part de définir le comportement de la molécule dans les milieux aqueux afin de sélectionner le milieu le plus approprié pour évaluer la cinétique de dissolution, et ainsi, déterminer la valeur de pKa. D'autre part, elle permet de choisir le "meilleur" solvant pour la cristallisation.

3.2 Étude de solubilité dans des milieux aqueux

3.2.1 *Solubilité dans des milieux aqueux sans additifs*

Les résultats de l'étude de solubilité à 37 ± 0,5 °C du LASSBio-294 dans les milieux aqueux sans additifs sont donnés dans le Tableau 3.1. Les concentrations sont calculées à partir des aires obtenues par l'analyse en HPLC en considérant la courbe d'étalonnage fournie au Chapitre 2 (Aire (mAU*s) = 58,855*C(μg/g solution)-10,3). Les solutions à pH 12 et 13 sont diluées afin se situer dans la zone linéaire de la courbe d'étalonnage (5-20 μg/g solution).

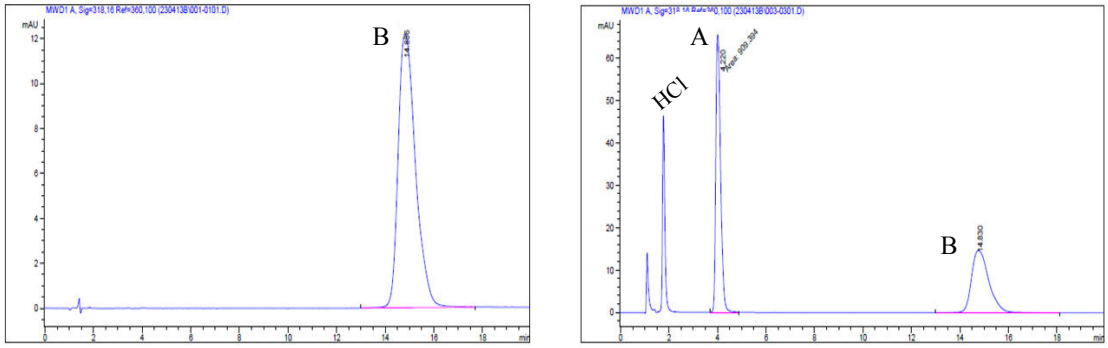
L'équilibre liquide-solide à température et pression constantes est normalement atteint lorsque la concentration en solution n'évolue plus au cours du temps. A partir des résultats présentés dans le Tableau 3.1, il est difficile dans certains milieux de déterminer si l'équilibre est atteint. En effet, la concentration de la molécule en solution oscille au cours du temps. Pour les molécules peu solubles, le temps d'équilibre peut être excessivement long dû à une faible cinétique de dissolution qui est de plus en plus faible à mesure que l'équilibre avance et que la concentration en solution s'approche de la saturation. Cependant, dans notre cas, ce comportement semble être plutôt lié à la formation d'un "produit de dégradation". En effet, au cours des analyses HPLC, un nouveau pic est détecté sur le chromatogramme. Celui-ci sort à

4 minutes et n'est pas représentatif du LASSBio-294. La Figure 3.1 montre un exemple de chromatogramme avec et sans le "produit de dégradation".

Tableau 3.1. Concentrations du LASSBio-294 en solution obtenues dans différents milieux aqueux sans additifs au cours du temps à 37 ± 0,5 °C.

	Temps (h)	Moyenne de la concentration* (µg/g solution)
Eau	3	11,00 ± 0,73
	24	10,60 ± 1,09
	48	10,18 ± 0,21
pH 1,2	3	12,36 ± 1,45
	24	18,43 ± 0,82
	48	20,52 ± 0,28
pH 4,5	3	12,11 ± 1,17
	24	11,09 ± 0,80
	48	8,80 ± 0,39
pH 5,8	3	11,09 ± 0,38
	24	10,17 ± 0,53
	48	11,89 ± 0,43
pH 6,8	3	11,89 ± 0,02
	24	7,70 ± 1,07
	48	9,31 ± 2,38
pH 7,4	3	11,39 ± 0,45
	24	7,83 ± 0,09
	48	7,75 ± 0,32
pH 8,0	3	11,02 ± 0,14
	24	9,04 ± 1,38
	48	10,27 ± 1,48
pH 10	3	12,73 ± 0,01
	24	12,81 ± 0,40
	48	13,32 ± 0,21
pH 11	3	17,34 ± 0,15
	24	12,81 ± 0,84
	48	10,99 ± 0,13
pH 12	3	80,09 ± 0,46
	24	67,31 ± 0,86
	48	72,40 ± 1,06
pH 13	3	542,74 ± 0,39
	24	564,65 ± 1,06
	48	575,33 ± 1,43

*Moyenne de deux échantillons, analysés trois fois.



(a) (b)

Figure 3.1. Chromatogramme du LASSBio-294 solubilisée dans (a) eau (b) HCl 0,1 N. Pic B : LASSBio-294 (T_R 14 minutes) et Pic A : "produit de dégradation" (T_R 4 minutes).

Dans le Tableau 3.2., nous avons reporté la moyenne des aires obtenues pour ces deux composés. À partir de ces données, nous pouvons déduire que la dégradation semble être importante, notamment dans le milieu HCl à pH de 1,2. Effectivement, l'aire du "pic de dégradation" dans ce milieu est quasi équivalente à celle de la molécule. Les autres milieux présentent moins de dégradation. En résumé, si nous examinons l'ensemble des milieux où notre molécule semble être dégradée, nous pouvons voir qu'il s'agit de milieux acides (pH 1,2 à 5,8) et très basiques (pH 10 à 13). La dégradation dans les milieux de pH intermédiaires est faible. En conséquence de cette dégradation, la saturation de la molécule dans le milieu de pH 1,2 n'a pas pu être déterminée. Pour les autres milieux, nous supposerons ici que l'équilibre est atteint dès 3h. Ce sont ces valeurs de concentrations qui sont prises pour le profil de solubilité-pH afin de déterminer le pKa de la molécule.

Estimation du pKa

Le profil de solubilité-pH [log(Cs)=f(pH)] (Figure 3.2) démontre que la molécule se comporte comme un acide (Avdeef 2007). La solubilité paraît constante pour des valeurs de pH < 10 puis augmente pour des pH > 10. Pour des pH compris entre 4 et 10 la solubilité moyenne est de 11,70 ± 0,60 µg/g solution (= C_0). Le pKa peut donc être déterminé par l'équation (Avdeef 2007) :

$$\log(C) \approx (\log(C_o) - pKa) + pH \qquad \text{Équation 35}$$

Le pKa est égal au pH trouvé à l'intersection de la droite horizontale (Log C_0 = cte) et de la droite passant par les points de pH 12 et 13 et de pente 1 (Figure 3.2).

Tableau 3.2. Moyennes des aires du pic du LASSBio-294 et du "produit de dégradation" obtenues par analyse HPLC après l'étude de solubilité dans les différents milieux sans additifs (3, 24 et 48h) à 37 ± 0,5 °C.

Milieu	Temps (h)	Aire (mAU*s)		$aire_{pic\ dégradation}/(aire_{pic\ dégradation}+aire_{pic\ molécule})$ (%)
		LASSBio-294 (T_R =14min)	"Produit de dégradation" (T_R = 4min)	
Eau	3	637,44	-	-
	24	613,57	-	-
	48	588,92	-	-
pH 1,2	3	777,76	925,71	54,34
	24	1074,54	1104,52	50,68
	48	1197,32	1183,11	49,70
pH 4,5	3	702,63	11,80	1,65
	24	642,00	37,40	5,50
	48	507,64	42,11	7,66
pH 5,8	3	642,30	1,92	0,29
	24	587,99	9,69	1,62
	48	689,62	18,32	2,58
pH 6,8	3	689,49		
	24	442,79	2,42	0,54
	48	537,41	4,23	0,78
pH 7,4	3	660,02		
	24	450,85	1,28	0,28
	48	446,03	3,05	0,68
pH 8,0	3	638,42	-	-
	24	522,01	-	-
	48	594,14	-	-
pH 10	3	738,68	-	-
	24	743,59	-	-
	48	773,74	8,64	1,10
pH 11	3	1010,65	3,28	0,32
	24	743,98	25,30	3,29
	48	636,96	47,13	6,89
pH 12*	3	556,26	5,11	0,91
	24	464,05	14,54	3,06
	48	511,03	18,05	3,36
pH 13*	3	809,05	6,33	0,78
	24	744,23	16,22	2,29
	48	873,53	22,81	2,54

- Dégradation inexistante. * Échantillons dilués.

Un pKa entre 11,2 et 11,3 est trouvé pour le LASSBio-294 (Tableau 3.3). De ce fait, le LASSBio-294 est sous forme non-ionisée pour des pH inférieurs à son pKa et sous forme ionisée pour des pH supérieurs. Ce paramètre est très important, d'une part, pour prévoir

l'absorption de la molécule lors de l'administration par la voie orale, car les membranes cellulaires sont plus perméables aux formes non ionisé que aux espèces ionisées. D'autre part, il permet de sélectionner un milieu pour les essais de dissolution in vitro afin de meilleur simuler les conditions in vivo. Une valeur de pKa similaire (pKa 11,86) au notre a été trouvé par Fraga (2010) en utilisant un logiciel de simulation (Advanced Chemistry Development).

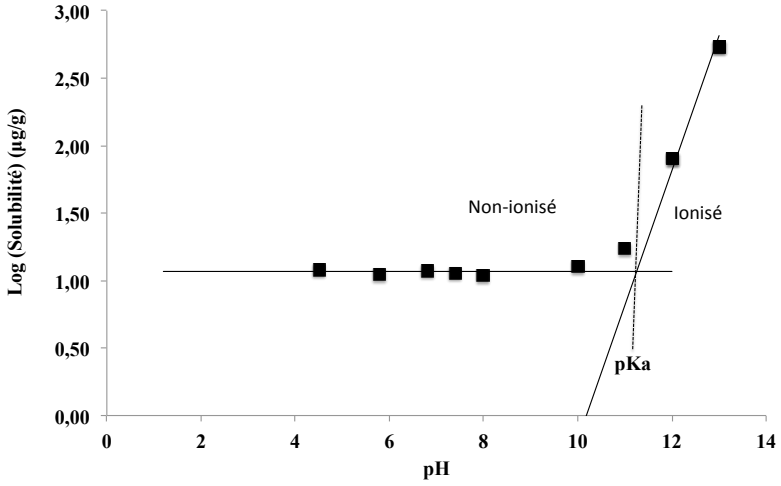


Figure 3.2. Profil solubilité-pH pour le LASSBio-294 considérant l'équilibre à 3h.

Tableau 3.3. Résultats de la détermination du pKa.

pH	C (µg/g)	C_0 (µg/g)	pKa
12	80,09 ± 0,46	11,70 ± 0,60	11,2
13	542,74 ± 0,39		11,3

3.2.2 *Solubilité dans des milieux aqueux avec additifs*

Pour l'étude de dissolution in vitro du LASSBio-294, des milieux aqueux sans additifs sont préférés, mais des milieux avec additifs peuvent être utilisés pour augmenter la solubilité des molécules faiblement solubles ou insolubles dans l'eau (Brown et al. 2004). Pour la molécule étudiée, la solubilité dans des milieux aqueux sans additifs tourne autour de 11 µg/g solution (37 °C), comme montré dans la partie précédente. De plus, la solubilité n'est pas influencée par le pH du milieu pour des valeurs compris entre pH 4,5 à 8,0 (pH physiologiques).

Afin d'assurer les conditions "sink" tout au long de la dissolution, pour les milieux aqueux sans additifs une solubilité de 11 µg/g de solution représente une concentration à utiliser de 3 µg/g solution (C_{cuve} = 0,3*11 µg/g de solution). Cependant, cette valeur est très faible, d'une part pour la quantification par HPLC, et d'autre part, pour la détermination de la cinétique de dissolution puisque dans les premiers temps, la quantité de poudre dissoute serait trop faible. Ainsi, le LSS est utilisé comme tensioactif pour les études de solubilité.

Les résultats de solubilité à 37 °C présentés dans le Tableau 3.4 indiquent que l'ajout du LSS augmente la solubilité, et qu'en conditions "sink" une concentration aux environs de 17 µg/g de solution est obtenue. Néanmoins, coté stabilité, une faible dégradation est aussi constatée dans les milieux avec tensioactifs après 24h. En considérant que pour des molécules faiblement solubles, l'évaluation du profil de dissolution pendant 60 minutes est recommandé, dans le cas où 85% de dissolution est assurée, la possible dégradation de la molécule dans LSS n'est pas un point limitant pour l'étude de dissolution (FDA, 1997).

Tableau 3.4. Résultats de solubilité du LASSBio-294 dans les milieux avec additifs et dans l'eau, à 37 ± 0,5 °C.

Milieux	Temps	Concentration ($\mu g/g_{solution}$)	$Aire_{pic\ dégradation}/(aire_{pic\ dégradation}+aire_{pic\ molécule})$ (%)
Eau	3h	11,00 ± 0,73	-
	24h	10,60 ± 1,09	-
	48h	10,18 ± 0,21	-
LSS* 0,5 %	3h	58,85 ± 0,32	-
	24h	57,10 ± 0,71	0,56
	48h	56,84 ± 0,29	1,12
Tampon pH 6,8 LSS* 0,5 %	3h	46,28 ± 0,40	-
	24h	46,96 ± 1,10	0,33
	48h	22,89 ± 3,07	0,91
Tampon pH 7,4 LSS* 0,5 %	3h	48,23 ± 0,65	-
	24h	46,47 ± 0,16	0,11
	48h	25,10 ± 3,05	0,37

- Dégradation inexistante. *LSS = Lauryl Sulfate de Sodium.

Le LSS est un tensioactif anionique, qui, en accord avec la classification HLB (balance hydrophile/lipophile), est décrit comme un tensioactif hydrophile avec une valeur estimée de HLB de 40 et une concentration micellaire critique (CMC) de 0,1% dans l'eau (Silva & Volpato 2002). Il peut agir de deux façons : par augmentation de la mouillabilité ou par la formation de micelles. Le processus de mouillabilité consiste à réduire l'angle de contact solide-liquide et les tensions superficielles du milieu aqueux. D'autre part, la formation des micelles se produit quand le tensioactif est ajouté à une concentration supérieure à la CMC. Au moment de la formation de micelles, la molécule faiblement soluble dans l'eau peut être dissoute dans les micelles pour former un milieu aqueux homogène (Silva & Volpato 2002). Considérant que la concentration utilisée du tensioactif est supérieure à sa CMC, le principal mécanisme d'action pour l'augmentation de la solubilité est la formation de micelles. D'ailleurs, des essais préliminaires de solubilité avec une concentration plus faible de LSS n'ont pas montré de changements significatifs de la solubilité.

3.3 Étude de stabilité chimique

3.3.1 *Influence du pH sur la stabilité de la molécule en solution*

D'après les résultats présentés dans le Tableau 3.5, nous avons constaté la présence d'un pic du possible produit de dégradation pour les solutions diluées avec HCl à 0,1 N (pH de 1,2), tampon de pH 4,5 et 13. L'aire du "produit de dégradation" observé pour les solutions à pH 4,5 et 13 est très faible par rapport à celui de la molécule, ce qui n'est pas le cas dans le milieu HCl 0,1 N dont l'aire est neuf fois plus grande (≈ 75 mAU*s) que celle du LASSBio-294 (≈ 8 mAU*s). Pour cet échantillon, la somme des aires est très différente de l'aire d'étalon, soit la solution préparée avec ACN-Tampon (Étalon 1). Pour les autres milieux l'aire à 14 minutes est similaire à celle des étalons E1 (pour les solutions pH 6,8 et 7,4) et E2 (pour les solutions à pH 11, 12 et 13).

L'analyse par spectrophotométrie UV (Figure 3.3) nous permet d'identifier que la solution préparée avec HCl 0,1 N ne présente pas le même spectre d'absorption que celle diluée avec ACN-Tampon. Ceci justifie pourquoi à 318 nm la somme des aires n'est pas la même que l'aire de l'étalon. À pH 12 et 13, les spectres d'absorption sont déplacés mais la

région d'absorption maximale reste toujours cela entre 300 et 350 nm. Ceci pourrait être justifié par l'ionisation de la molécule dans des milieux de pH supérieur à son pKa.

Dans les milieux acides, ces données confirment la dégradation du produit. De plus, elles démontrent que cette dégradation ne se fait pas seulement à partir de la molécule sous forme solide, mais également en solution.

Tableau 3.5. Moyenne des aires** des pics du LASSBio-294 et du "produit de dégradation" obtenues par analyse HPLC après dilution d'une solution mère avec différents milieux.

Milieu	Concentration théorique (µg/g solution)	Aire (mAU*s)	
		LASSBio-294 (T_R = 14 min)	"Produit de dégradation" (T_R = 4 min)
ACN-Tampon (E1)*	15,08	870,75 ± 5,60	-
Eau	14,45	885,45 ± 0,01	-
pH 1,2	14,96	8,33 ± 0,09	75,68 ± 0,80
pH 4,5	15,00	884,02 ± 2,88	7,97 ± 0,59
pH 6,8	14,96	967,56 ± 0,02	-
pH 7,4	14,95	909,21 ± 1,26	-
ACN-Tampon (E2)*	16,28	975,91 ± 0,17	-
pH 11	15,01	922,57 ± 0,78	-
pH 12	16,23	971,12 ± 1,25	-
pH 13	16,80	1042,05 ± 5,91	4,79 ± 0,09

*Solutions étalons préparées en jours différents. **Moyenne d'un échantillon, analysés trois fois.

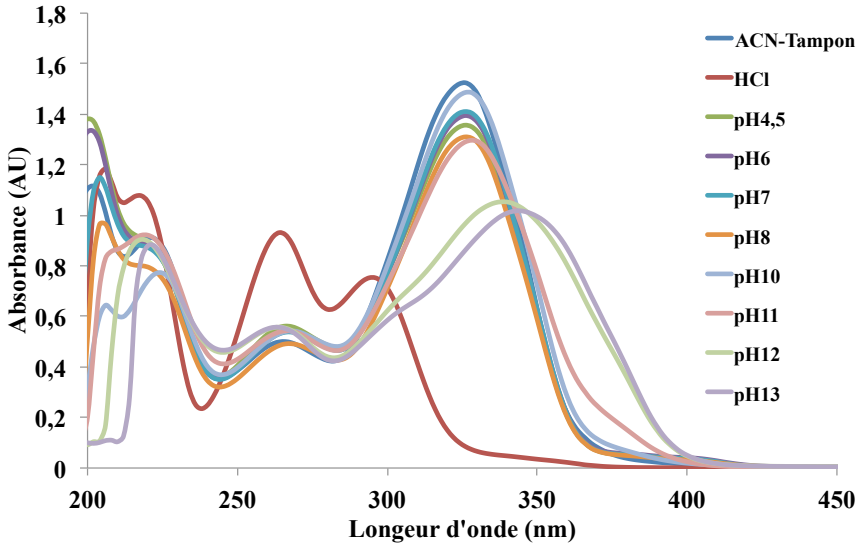


Figure 3.3. Spectre d'absorption pour le LASSBio-294 à partir de solutions diluées dans des milieux aqueux avec différents pH.

3.3.2 *Influence de la teneur en solide sur la dégradation de la molécule*

Les résultats présentés dans le Tableau 3.6 indiquent que la dégradation de la molécule est influencée par la quantité de poudre ajoutée, dans le cas des milieux aqueux pur, tampon pH 6,8 et pH 7,4. Dans l'eau, avec une masse de poudre de 0,02 g, comme montré précédemment, le pic du produit de dégradation n'existe pas. Quand la masse est augmenté à 1 g, le produit de dégradation apparaît après 3 h, soit autour de 3% de l'aire total à 48 h. Pour le milieu pH 1,2, les pourcentages de l'aire du pic de dégradation avec 0,02 g et 1 g sont comparables avec des valeurs entre 40 et 54%. Pour les milieux avec des pH 6,8 et 7,4, l'aire du produit de dégradation après 24h augmente avec l'augmentation de la teneur en solide.

Tableau 3.6. Résultats de solubilité du LASSBio-294 à 37 ± 0,5 °C dans l'eau et dans les milieux pH 1,2, pH 6,8 et pH 7,4 avec 0,02 et 1 g de poudre.

Milieu	Temps (h)	Concentration (µg/g solution)		$Aire_{pic\ dégradation}$ / ($aire_{pic\ dégradation}$+$aire_{pic\ molécule}$) (%)	
		0,02 g	1 g	0,02 g	1 g
Eau	3	11,00 ± 0,73	9,91 ± 0,01	-	0,37
	24	10,60 ± 1,09	11,37 ± 0,01	-	1,29
	48	10,18 ± 0,21	8,47 ± 0,02	-	2,72
pH 1,2	3	12,36 ± 1,45	20,55 ± 0,72	54,34	48,75
	24	18,43 ± 0,82	17,88 ± 1,75	50,68	49,90
	48	20,52 ± 0,28	15,08 ± 1,84	49,70	44,33
	72		13,84 ± 0,05		39,00
pH 6,8	3	11,89 ± 0,02	10,74 ± 0,01		
	24	7,70 ± 1,07	7,04 ± 0,01	0,54	2,27
	48	9,31 ± 2,38	7,38 ± 0,02	0,78	4,37
pH 7,4	3	11,39 ± 0,45	9,73 ± 0,01		
	24	7,83 ± 0,09	6,50 ± 0,02	0,28	2,17
	48	7,75 ± 0,32	6,53 ± 0,01	0,68	12,63

- Dégradation inexistante.

Les analyses par DRX des solides récupérés (Figure 3.4) nous permettent d'identifier que le solide récupéré après l'étude dans l'eau, présente la même structure cristalline que le LASSBio-294 sous forme originale. De plus, les images MEB (Tableau 3.7) montrent des cristaux avec les même faciès.

Néanmoins, les diffractogrammes obtenus avec les solides récupérés à partir de solutions pH 1,2 ; pH 6,8 et pH 7,4 après 48 h ne sont pas identiques à celui de la molécule originale (Figure 3.4). Pour celui à pH 6,8, il y a juste un changement des intensités des pics.

Pour les échantillons à pH 7,4 et pH 1,2, les intensités des pics sont modifiées. De plus, de nouveaux pics apparaissent, comme ceux à 15,22 ; 20,17 et 22,15 en 2θ. Le pic en 14,16 de la molécule initiale est vu dans les diffractogrammes des solides en pH 7,4 et pH 1,2 comme deux pics ou même trois (Figure 3.4). Dans ces trois derniers cas, il est possible d'identifier dans les images MEB la présence de cristaux plus fins et avec différents faciès par rapport aux cristaux de la molécule initiale (Tableau 3.7). Ceci pourrait peut être justifier les changements sur les diffractogrammes et la diminution de la concentration observé après 24h (Figure 3.4).

De plus, les résultats DRX du solide récupéré du milieu acide aux différents temps de prélèvements, soit 3, 24, 48 et 72 h, nous permet de voir que le changement sur le diffractogramme se produit à partir de 24 h, et cela malgré que la dégradation en solution soit forte à 3h (Figure 3.5). Pour les échantillons à 24 h et 72 h, les intensités de pics sont modifiées, et de nouveaux pics apparaissent, comme ceux à 15,22 ; 20,17 et 22,15 en 2θ, observés pour l'échantillon à 48 h. Cependant, différemment de ce dernier, les échantillons à 24 h et 72 h présentent une intensité très faible pour le pic à 24,59 en 2θ. Effectivement, c'est comme s'il y avait un changement de la forme solide au cours du temps. Les images MEB montrées dans le Tableau 3.8 confirment ces résultats.

Pour expliquer ces phénomènes, nous supposons l'existence d'un équilibre de deux formes solides, le LASSBio-294 et son produit de dégradation (Figure 3.6). Au début, le LASSBio-294 est dissous dans le solvant pour former le LASSBio-294 en solution. Cette molécule en solution est dégradée et transformée en son produit de dégradation. Ce dernier, recristallisera sous la forme que nous avons identifiée sur les diffractogrammes et observée avec les images MEB (Figure 3.4 et Tableau 3.7)

Concernant l'étude de solubilité dans l'eau avec différents excès de poudre, nous remarquons que la dégradation est vraiment influencée par la quantité de poudre ajoutée (Tableau 3.9). Avec une masse de poudre de 0,02 g, comme montré précédemment, le pic du produit de dégradation n'existe pas. Quand la masse est augmentée à 0,1, 0,5 et 2 g, le pourcentage de l'aire du pic augmente jusqu'à 27 % de l'aire totale à 48 h pour une masse de 2 g de poudre. Avec 1 g de poudre le pourcentage de dégradation est inférieur à celui avec 0,5 g. Ainsi, cette valeur n'a pas été prise en compte pour déterminer une loi de la cinétique de dégradation dans l'eau. De ce fait, nous avons utilisé les valeurs à 48 h pour 0,1, 0,5 et 2 g de poudre afin de définir une loi de la cinétique de dégradation en fonction de la surface

spécifique, calculé par l'équation suivante, d'où nous obtenons (Aire (mAU*s) = 362,15 $S_{spé}$ (m^2) +9,3757), (R^2 = 0,99212).

$$S_{spé} = \frac{m.6}{d_{3,2}.\rho}$$ Équation 36

$S_{spé}$: surface spécifique (m^2)

m : masse de poudre ajouté (kg)

$d_{3,2}$: diamètre moyen en surface (m)

ρ : masse volumique ($kg.m^3$)

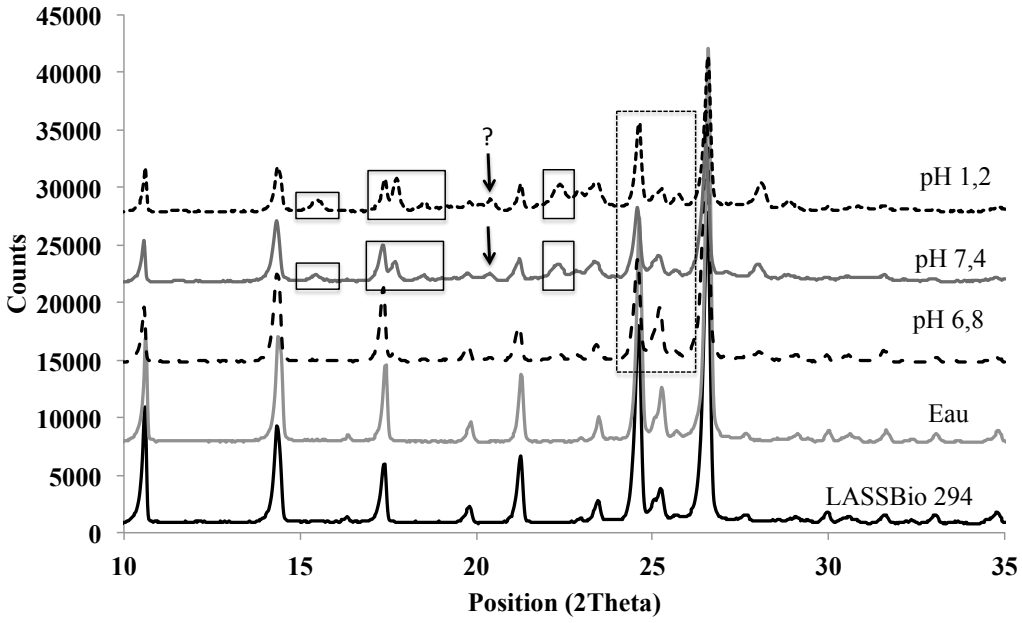


Figure 3.4. Diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale et des solides récupérés d'étude de solubilité pour les milieux pH 1,2 (HCl 0,1 N), tampon pH 6,8 et pH 7,4 et l'eau après 48h.

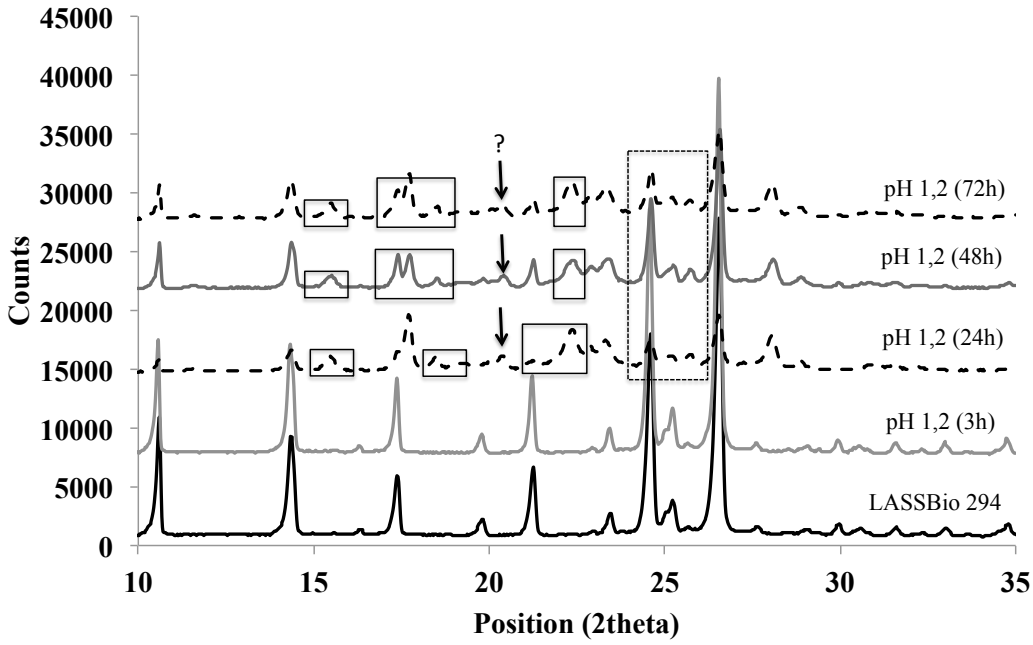


Figure 3.5. Diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale et des solides récupérés d'étude de solubilité pour les milieux pH 1,2 (HCl 0,1 N) pour plusieurs temps.

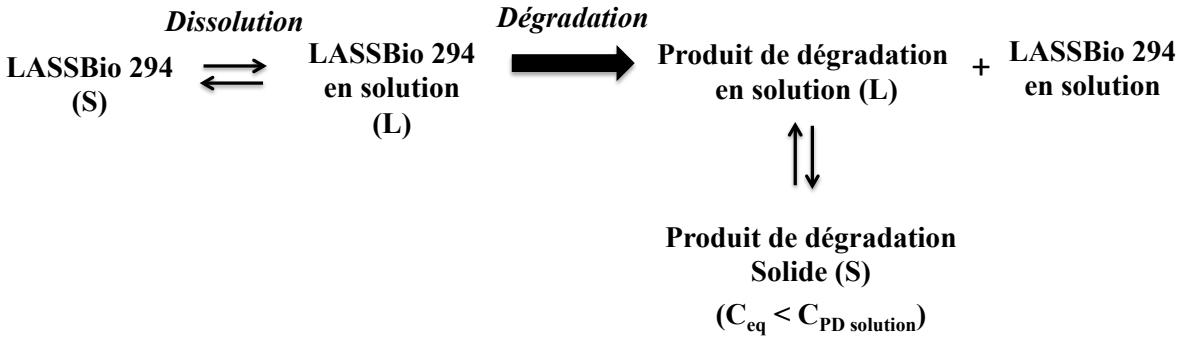


Figure 3.6. Schéma du processus de dissolution du LASSBio-294 et formation du produit de dégradation.

Tableau 3.7. Images MEB de la molécule originale et des solides récupérés après l'étude de solubilité sur 48 h.

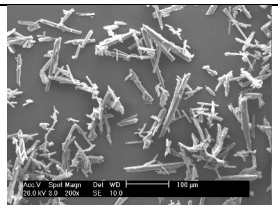
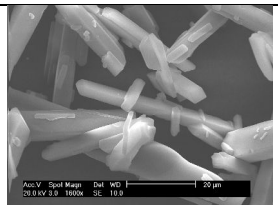
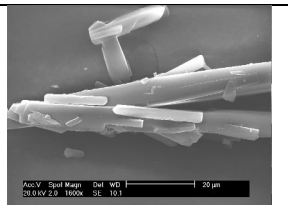
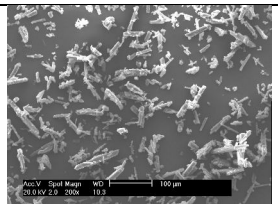
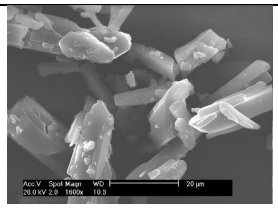
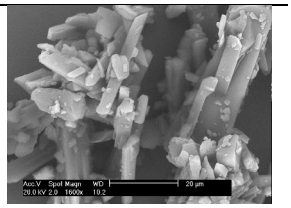
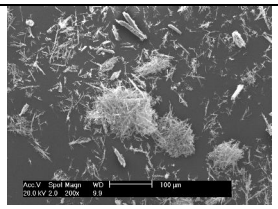
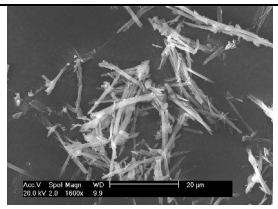
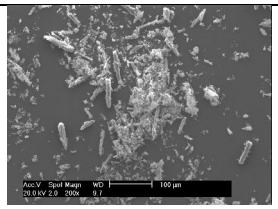
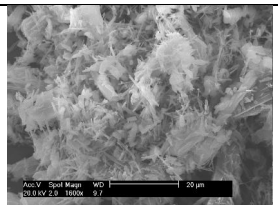
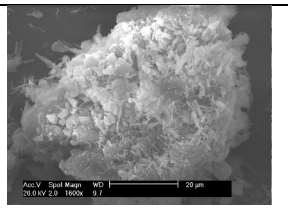
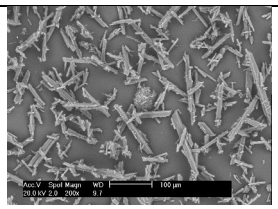
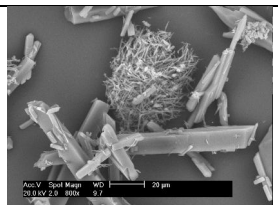
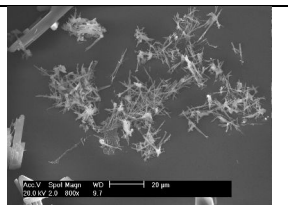
	Images (200x) 100 μm	Images (1600x) 20 μm	
LASSBio-294 (Initiale)			
Eau			
pH 1,2			
pH 6,8			
pH 7,4			

Tableau 3.8. Images MEB de la molécule originale et des solides récupérés après l'étude de solubilité dans HCl 0,1 N (pH 1,2) pour 48 et 72h.

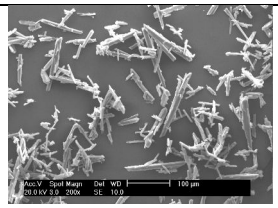
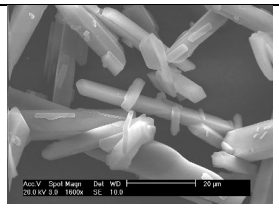
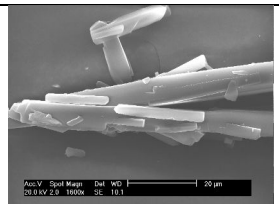
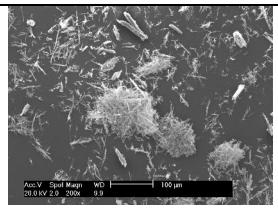
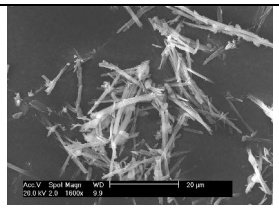
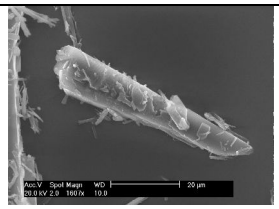
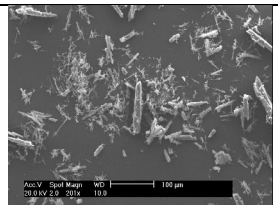
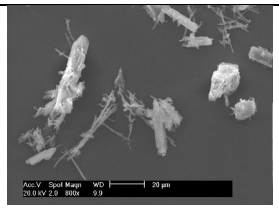
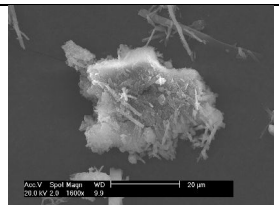
	Images (200x) 100 µm	Images (1600x) 20 µm	
LASSBio-294 (Initiale)			
pH 1,2 48 h			
pH1,2 72 h			

Tableau 3.9. Résultats de solubilité à 37 ± 0,5 °C du LASSBio-294 dans l'eau avec 0,02, 0,5, 1 et 2 g de poudre.

Masse (g)	Temps (h)	Concentration (µg/g solution)	$Aire_{pic\ dégradation}$ / ($aire_{pic\ dégradation}$+$aire_{pic\ molécule}$) (%)
0,02	3	11,00 ± 0,73	-
	24	10,60 ± 1,09	-
	48	10,18 ± 0,21	-
0,1	3	10,25 ± 0,34	
	24	8,22 ± 0,03	0,50
	48	4,70 ± 0,09	3,79
0,5	3	10,24 ± 0,21	
	24	9,72 ± 1,33	1,42
	48	4,49 ± 0,05	13,40
1	3	9,91 ± 0,01	0,37
	24	11,37 ± 0,01	1,29
	48	8,47 ± 0,02	2,72
2	3	10,64 ± 0,27	0,47
	24	9,94 ± 0,07	3,82
	48	5,15 ± 0,09	27,00

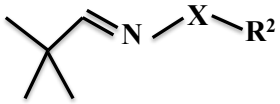
- Dégradation inexistante.

3.3.3 *Mécanisme de dégradation*

Le LASSBio-294 est une molécule dérivée de N-acylhydrazone (chapitre 1). Or les hydrazones, les alkylhydrazones, les oximes et les acylhydrazones sont bien étudiées dans le domaine de la chimie et la biologie (Rollas & Küçükgüzel 2007).

Ce types de molécules, contenant la structure C=N-X sont connus pour leur sensibilité à être hydrolysé (Kalia & Raines 2008). Ces auteurs ont publié la première étude détaillée de l'hydrolyse iso-structurelle des alkylhydrazones, acylhydrazones et oximes (Tableau 3.10). La demi-vie ($t_{1/2}$) pour l'hydrolyse de ces composés en fonction du pH a été mesurée par spectroscopie de RMN H^1 dans des tampons avec différents pH. En outre, des expériences de titration surveillées par spectroscopie de RMN H^1 ont été réalisées pour déterminer leurs pKa.

Tableau 3.10. Structures des molécules étudiées par Kalia et Raines (2008).

Structure modèle		
	(X)	(R^2)
Méthylhydrazone (1)	NH	CH_3
Diméthylhydrazone (2)	NCH_3	CH_3
Oxime (3)	O	CH_3
Acétylhydrazone (4)	NH	$C(O)CH_3$
Semicarbazone (5)	NH	$C(O)NH_2$
Trifluoroacétylhydrazone (6)	NH	$C(O)CF_3$
Trialkylhydrazonium (7)	$N^+(CH_3)_3$	-

Leur étude cinétique a montré que le composé trifluoroacétylhydrazone est le plus stable à l'hydrolyse. Un ordre de stabilité a été proposé : trifluoroacétylhydrazone >> oximes >> akylhydrazones (1 et 2) et acylhydrazones.

À pH 7,0, la constante cinétique pour l'hydrolyse d'oxime était 300 fois inférieure à celle pour l'acétylhydrazone, et 160 fois pour la semicarbazone. Dans des milieux acides cette hydrolyse est catalysée, comme le montrent les valeurs de la $t_{1/2}$ pour l'hydrolyse (Tableau 3.11).

Tableau 3.11. Valeurs de la $t_{1/2}$ pour l'hydrolyse publiées pour les acylhydrazones et l'oxime (Kalia & Raines 2008).

	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
Oxime	15,7 ± 0,4 h	4,4 ± 0,3 j	25 j	*	*
Acétylhydrazone	2,4 ± 0,4 min	21,4 ± 0,8 min	2,0 ± 0,2 h	10,17 ± 0,02 h	4,2 ± 0,8 j
Semicarbazone	8,5 ± 0,4 min	36 ± 2 min	3,8 ± 0,5 h	12,3 ± 0,8 h	2,9 ± 0,1 j
Trifluoroacétylhydrazone	7,5 ± 0,9 min	12,4 ± 0,8 min	14 ± 1 min	23 ± 1 min	1,0 ± 0,1 h

*Non mesuré.

Ces résultats publiés par Kalia et Raines (2008), nous ont permis de comprendre la dégradation du LASSBio-294. En effet, comme démontrés pour les acylhydrazones, le LASSBio-294 peut être hydrolysé dans des milieux aqueux à différents pH. Ainsi, la dégradation discutée précédemment est une hydrolyse. De plus, selon leurs donnés, la stabilité pour l'hydrolyse dépend de la capacité à protoner l'azote. La plus grande stabilité d'oxime par rapport aux acylhydrazones est liée à sa résistance à la protonation due à une haute électronégativité d'oxygène.

Les essais de titration, présentés par Kalia et Raines (2008), ont révélé que certains des composés étudiés présentent un changement important de l'état de protonation entre pH 0,7 et 13,4. Les valeurs δ du C^1 H pour le trifluoroacétyl hydrazone exhibent une dépendance-pH en forme d'une sigmoïde avec un pKa de 7,9. Néanmoins, pour l'acétylhydrazone et la semicarbazone leurs valeurs δ du C^1 H ne changent pas de façon significative en fonction du pH. Ceci indique que pour ces deux molécules une fraction très petite est sous forme protonée entre pH 0,7 et 13,4 et explique leurs plus grandes stabilités par rapport à la trifluoroacétyl hydrazone.

Sur cette base, nous proposons deux mécanismes pour l'hydrolyse du LASSBio-294 à partir de sa sub-unité N-acylhydrazone. Le premier s'agit de l'hydrolyse de la fonction amide qui implique la formation d'une hydrazone et d'un acide carboxylique (Figure 3.7). Le deuxième concerne à l'hydrolyse de la fonction imine qui entraîne la formation d'une hydrazide et d'un aldéhyde (Figure 3.8). Ces possibles métabolites ont été décrits par Fraga (2010). Dans son travail, une étude similaire au notre a été réalisée pour évaluer la stabilité chimique du LASSBio-294. Des solutions de LASSBio-294 dans l'acétronitrile ont été préparées et re-diluées avec des solutions tampon de pH 1,0; 3,0 et 7,0. Des prélèvements ont été effectués au cours du temps pour déterminer la quantité de molécule en solution. Les résultats ont démontrés que dans des milieux avec des valeurs de pH inférieur à 3,0, le

LASSBio-294 est extrêmement instable et peut être hydrolysé rapidement. En effet, pour le milieu de pH 1,0, il a trouvé une $t_{1/2}$ pour l'hydrolyse de 1,5 minutes et pour le pour pH 3,0 une $t_{1/2}$ 62 minutes. En revanche, en pH 7,0, le LASSBio-294 est plus stable avec une $t_{1/2}$ pour l'hydrolyse 19 h. Cette étude confirme nos hypothèses pour la dégradation du LASSBio-294. Ainsi, un de ces produits de dégradation pourraient être le composé en solution identifiée par l'analyse HPLC et la forme solide identifié par DRX et MEB.

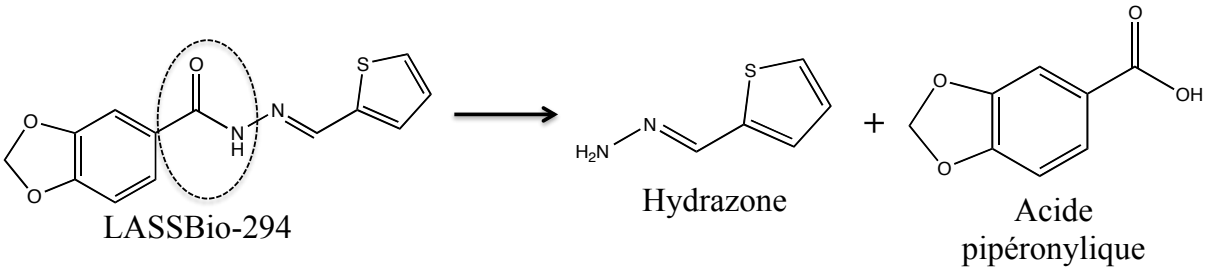


Figure 3.7. Illustration des possibles métabolites formés par l'hydrolyse de la fonction amide du LASSBio-294.

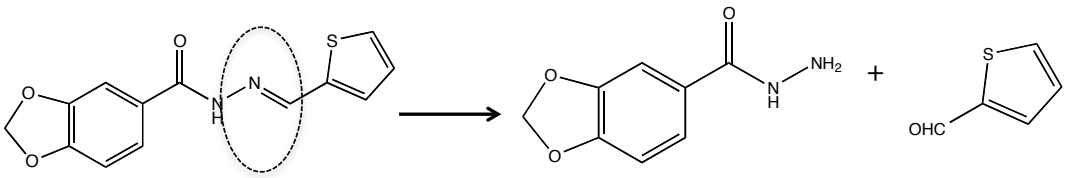


Figure 3.8. Illustration des possibles métabolites formés par l'hydrolyse de la fonction imide du LASSBio-294.

3.4 Étude de solubilité dans les milieux contenant des LIs

3.4.1 *Solubilité dans les LIs purs*

La solubilité du LASSBio-294 à 25 ± 0,5 °C dans les LIs choisis est présentée dans le Tableau 3.12. Chaque résultat représente la moyenne de la concentration déterminée par HPLC pour au moins deux essais identiques. Les résultats indiquent que le LASSBio-294 présente différentes solubilités dans les LIs dérivés du cation imidazolium à 25 °C. On obtient des solubilités très différentes en fonction des combinaisons cations-anions.

Tableau 3.12 Solubilité du LASSBio-294 dans différents LIs à 25 ± 0,5°C et pression atmosphérique.

Liquides ioniques	Concentration ($mg/g_{solution}$)
[emim][$CH_3O(H)PO_2$]	254 ± 2
[emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$]	474 ± 3
[emim][CH_3OO]	457 ± 5
[dmim][$CH_3O(H)PO_2$]	367 ± 2
[bmim][CH_3OO]	473 ± 6
[bmim][NTf_2]	Insoluble
[bmim][BF_4]	Insoluble

Le succès de la dissolution dépend de la capacité des LIs à interagir avec les molécules pour former des liaisons plus stables que les liaisons soluté-soluté et solvant-solvant. Les propriétés du LI sont liées à la combinaison anion-cation. Malgré l'utilisation courante des ce type de solvants, leur nature microscopique n'est pas bien comprise. Ils peuvent agir soit comme accepteur des liaisons hydrogène (anion), soit comme donneur de cette liaison (cation) :

- La structure du cation imidazolium contient une configuration délocalisée des électrons sur le centre 3-4 du groupement N_1-C_2-N_3, une double liaison entre C_4 et C_5 sur le côté opposé de l'anneau, et une délocalisation faible dans la région centrale (Figure 3.9) (Gonfa et al. 2011).
- Les atomes d'hydrogène C_2-H, C_4-H et C_5-H portent pratiquement la même charge, mais carbone C_2 est chargé positivement du fait du déficit d'électrons dans la liaison C = N, tandis que C_4 et C_5 sont pratiquement neutre (Figure 3.9) (Gonfa et al. 2011).
- La structure aromatique du cation imidazolium, domaine hydrophile, offre des possibilités de formation d'interaction électrostatique et π-stacking avec le LASSBio-294.
- L'atome d'hydrogène de C_2 peut servir de site pour la formation de liaisons hydrogène. Le domaine hydrophobe, chaîne alkyle, permet la formation d'interactions de van der Waals. En outre, l'anion peut délocaliser leur charge et agir comme un accepteur de liaison hydrogène et/ou base de Lewis (Figure 3.9) (Olivier-Bourbigou et al. 2010; Gonfa et al. 2011).

Les niveaux de solubilité observés du LASSBio-294 dans le [emim][$CH_3O(H)PO_2$], [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$], [emim][CH_3OO] et [dmim][$CH_3O(H)PO_2$] indiquent des interactions soluté-solvant appréciables. Des interactions comme les liaisons hydrogène, les forces de van der Waals et les interactions π-π entre les groupes imidazolium du LI et les molécules hydrophobes sont décrites par différents auteurs (Hardacre et al. 2007; Holbrey et al. 2003; Mizuuchi et al. 2008; Smith et al. 2011; Lourenço et al. 2012; Melo et al. 2013). L'analyse de la structure du LASSBio-294 (Figure 3.9), montre que des interactions identiques peuvent exister entre le LASSBio-294 et les LIs testés dans cette étude. Cependant, comment expliquer les différences de solubilité du LASSBio-294 dans les différents LIs? Pourquoi ne s'est-il pas dissous dans certains LIs? Pour répondre à cette question, une étude plus détaillée de chaque structure du LI est réalisée, afin d'avoir une idée qualitative des interactions favorables ou défavorables entre la molécule et les cations et anions du LI permettant d'expliquer la solubilité de la molécule.

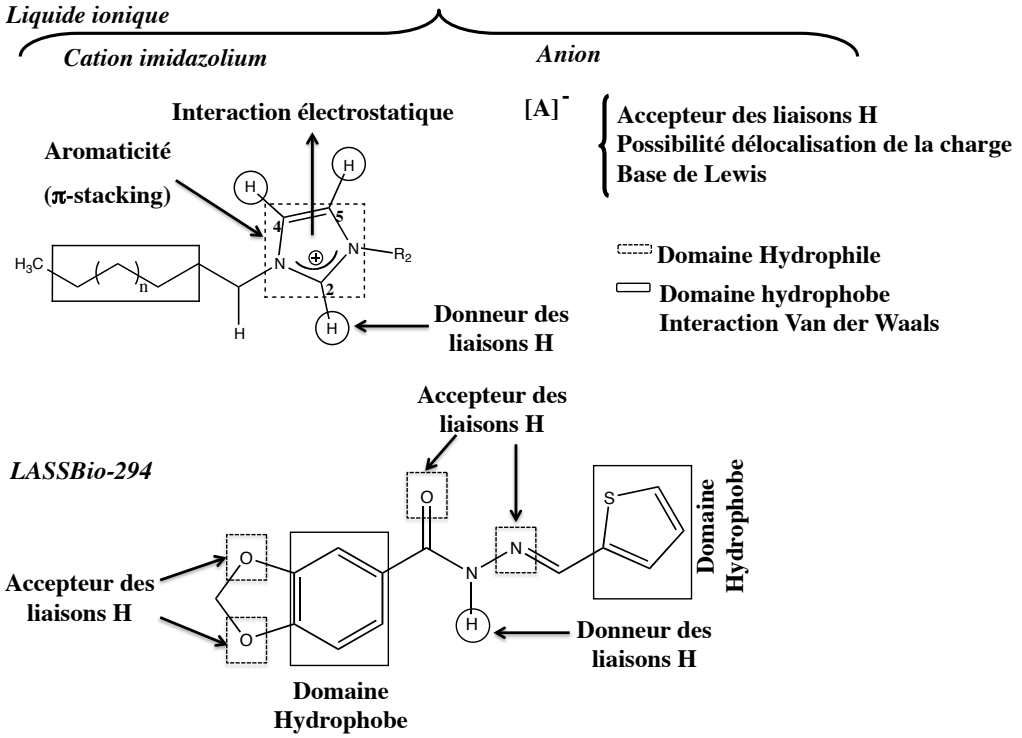


Figure 3.9. Représentation schématique des possibles types interactions entre les liquides ioniques à base du cation imidazolium et le LASSBio-294 (Adaptée de Olivier-Bourbigou et collaborateurs, 2010).

3.4.1.1 L'influence du type d'anion

La contribution de l'anion pour la solubilisation du LASSBio-294 est démontrée en comparant les résultats obtenus avec les LIs dérivés des cations [bmim] et [emim]. Le cation [bmim] est capable de solubiliser le LASSBio-294 lorsqu'il est complexé avec l'anion CH_3OO^- (457 ± 5 mg/g solution), en revanche il ne l'est pas quand il est complexé avec les anions BF_4^- et NTf_2^- (insoluble) (Figure 3.10).

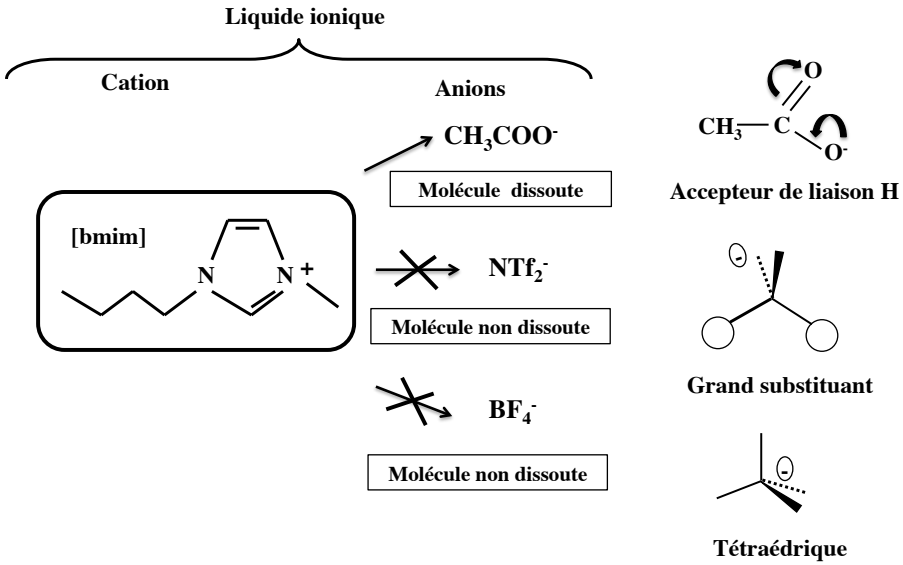


Figure 3.10. Relation entre les anions (CH_3OO^-, NTf_2^- and BF_4^-) combinés avec le 1-butyl-3-méthylimidazolium [bmim] et le pouvoir solvant des LIs envers le LASSBio-294.

La solubilité du LASSBio-294 dans les LIs dérivés d'anion CH_3OO^- est associée à la capacité de l'anion à former des liaisons hydrogènes et à délocaliser les charges des atomes d'oxygène. Bien que la formation des liaisons hydrogènes entre l'anion NTf_2^- (groupement NH) et la molécule ait été décrite comme mécanisme responsable de la capacité de cet anion à dissoudre l'isoniazide et la pyrazinecarboxamide (Forte et al. 2012; Lourenço et al. 2012; Melo et al. 2013), la présence du groupement thiényl dans le LASSBio-294 peut empêcher la solubilisation. En outre, la complexité structurelle du LASSBio-294 par rapport à l'isoniazide et la pyrazinecarboxamide ainsi que le volume important des substituants de l'anion NTf_2^- empêchent probablement les interactions (Pinkert et al. 2010). Finalement, la faible capacité de l'anion BF_4^- à dissoudre le LASSBio-294 peut être liée à sa forme tétraèdrique qui pourrait entraver la formation d'interactions avec la molécule (Pinkert et al. 2010).

Cette discussion relative à l'effet de l'anion peut être étendu à un autre type de cation, le 1-éthyl-3-méthylimidazolium [emim], associé avec différents anions : $CH_3O(H)PO_2^-$, $CH_3CH_2O(H)PO_2^-$ et CH_3OO^-. Quand le cation [emim] est complexé avec les anions $CH_3O(H)PO_2^-$ et $CH_3CH_2O(H)PO_2^-$, la solubilité peut être liée à la longueur de la chaîne alkyle (Figure 3.11). Une longueur de chaîne plus longue (l'hydrophobicité élevée) induit une plus grande solubilité du LASSBio-294 dans le LI. La comparaison des données de solubilité obtenues avec les LIs dérivés d'anions $CH_3O(H)PO_2^-$, $CH_3CH_2O(H)PO_2^-$ et CH_3OO^- montre que les différences de solubilité peuvent être liées à la capacité de former des liaisons hydrogène et également à la possibilité de délocaliser les charges entre les atomes d'oxygène (Figure 3.11) (Pinkert et al. 2010).

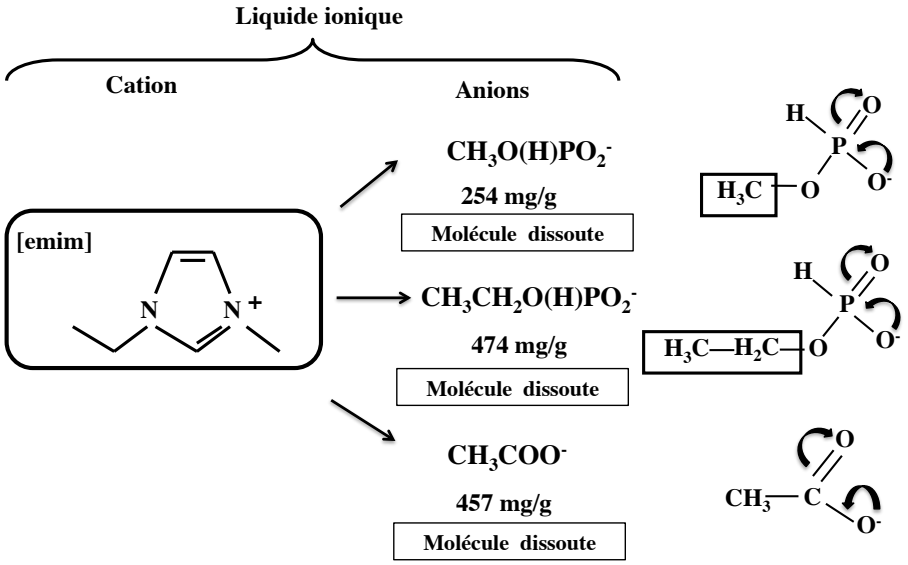


Figure 3.11. Relation entre les anions combinés avec le 1-éthyl-3-méthylimidazolium [emim] et le pouvoir solvant des LIs envers le LASSBio-294.

3.4.1.2 L'influence du type de cation

La participation du cation est observée en comparant les résultats obtenus avec les LIs dérivés des cations [emim] et [bmim] complexés avec l'anion CH_3OO^- (premier cas) et les cations [emim] et [dmim] complexés avec l'anion $CH_3O(H)PO_2^-$ (deuxième cas).

Dans le premier cas, la plus grande hydrophobicité du cation [bmim] collabore aux interactions avec la molécule hydrophobe et donc à une augmentation de la solubilité comme le décrit (Mizuuchi et al. 2008) (Figure 3.12).

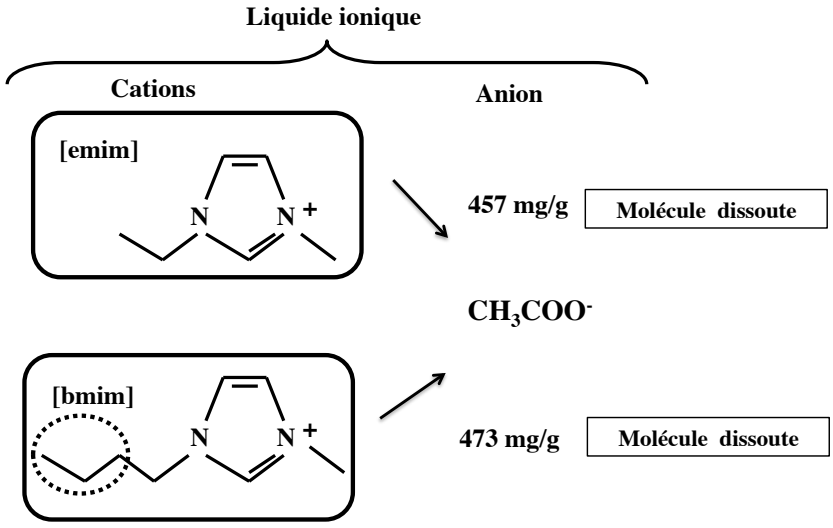


Figure 3.12. Relation entre le type de cation combiné avec l'anion CH_3OO^- et le pouvoir solvant des LIs vers le LASSBio-294.

Dans le deuxième cas, l'influence de l'hydrophobicité n'est pas observée. La solubilité du LASSBio-294 est plus élevée avec le cation [dmim]. Ce résultat suggère que la capacité de solubilisation dépend non seulement de la contribution de chaque ion séparément, mais qu'il peut y avoir un effet combiné (Figure 3.13). La contribution des ions (cations et anions) dans le processus de dissolution de la cellulose sont décrits dans les travaux de Zhang et al. 2005; Feng & Chen 2008, Kosan et al. 2010, et Zhang et al. 2010. D'autres recherches ont attribué la capacité de dissolution de la cellulose au type d'anion (Zhu et al. 2006; Remsing et al. 2006; Remsing et al. 2008; Brandt et al. 2010).

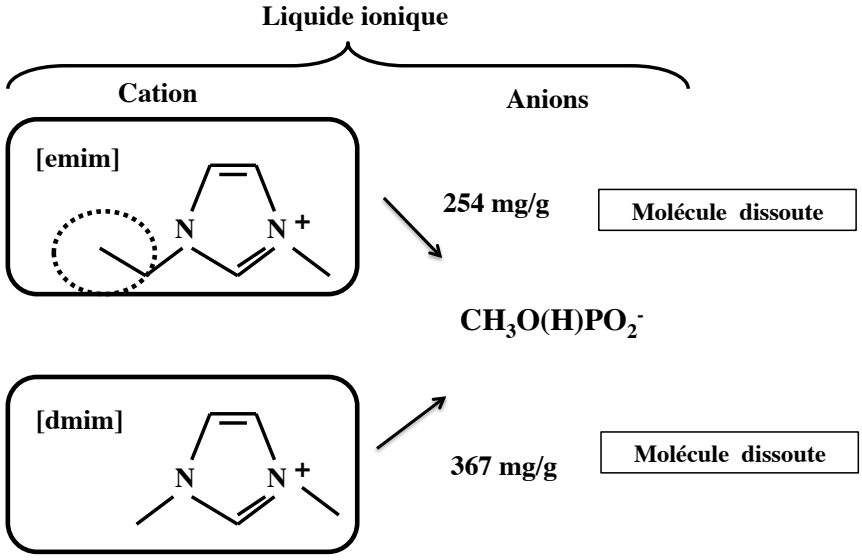


Figure 3.13. Relation entre le type de cation combiné avec l'anion $CH_3O(H)PO_2^-$ et le pouvoir solvant des LIs vers le LASSBio-294.

3.4.2 *Effet de la température sur la solubilité du LASSBio-294 dans l'eau et dans les LIs dérivés du cation [emim]*

La solubilité du LASSBio-294 dans l'eau est mesurée à des températures de 15, 25 et 35 °C. Elle est toujours inférieure à 5 ppm. L'exactitude et la précision de la méthode d'analyse à ce niveau de concentration ne permettent pas de donner une évolution des valeurs de solubilité en fonction de la température.

D'après les données de solubilité dans les LIs pur à 25 ± 0,5°C (Tableau 3.12), trois LIs sont choisis. Ce sont : le [emim][$CH_3O(H)PO_2$], le [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$] et le [emim][CH_3OO]. La solubilité du LASSBio-294 dans ces LIs est déterminée à des températures comprises entre 15 et 35 °C (± 0,5°C). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.13. Ils montrent que la solubilité du LASSBio-294 dans ces LIs purs augmente avec la température dans la gamme de température étudiée. Toutefois, les données de concentration à l'équilibre dans le [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$] à 15 et 25 °C montrent que la solubilité est constante, ce qui n'est pas le cas dans les autres LIs. Ce comportement peut être dû à un problème de mesure de solubilité à 25 °C pour ce LI. En effet, ce dernier présente une viscosité supérieure (0,14 Pa.s) aux autres LIs (< 0,1 Pa.s) ; la séparation solide/liquide est plus difficile, conduisant probablement à une sous-estimation de la solubilité. A 35 °C, la solubilité dans [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$] et [emim][CH_3OO] n'a pu être déterminée en raison de la formation d'un gel à forte concentration en solide.

Tableau 3.13. Effet de la température sur la solubilité du LASSBio-294 dans les LIs.

Température	Concentration ($mg/g_{solution}$)		
(°C)	[emim][$CH_3O(H)PO_2$]	[emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$]	[emim][CH_3OO]
15	233 ± 2	475 ± 1	437 ± 8
25	254 ± 2	474 ± 3	457 ± 5
35	302 ± 1	> 508 ± 8*	> 641 ± 1*

*Les solutions sont sous-saturées, formation d'un gel pour des concentrations supérieures.

3.4.3 *Solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges eau/LI dérivés du cation [emim]*

La première étape pour concevoir un processus de cristallisation par effet anti-solvant est de définir la proportion massique anti-solvant/solvant pour obtenir des rendements élevés en solide. Dans cette partie de l'étude, la solubilité du LASSBio-294 est déterminée dans des

mélanges eau/[emim][$CH_3O(H)PO_2$], eau/[emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$] et eau/[emim][CH_3OO] à 25 ± 0,5°C. Les donnés expérimentales obtenues sont indiquées dans le Tableau 3.14 et la Figure 3.14. Ils révèlent que la solubilité du LASSBio-294 diminue fortement quand de l'eau est ajoutée au mélange.

Ces données confirment que la cristallisation par effet antisolvant du LASSBio-294 solubilisé dans un LI, en utilisant l'eau comme antisolvant, est possible et intéressante. De plus, les valeurs de rendements théoriques (Rdt) montrent que des rendements aux environs de 99 % peuvent être attendus (Figure 3.15).

Ainsi, la connaissance de cet équilibre solide-liquide dans ces systèmes sera utilisée pour déterminer les conditions de opératoires du procédé de cristallisation conduisant à un bon rendement en solide.

Tableau 3.14. Solubilité du LASSBio-294 à 25 ± 0,5°C et pression atmosphérique dans différents mélanges eau-LI.

Fraction massique eau/IL	Concentration (mg/g solution)		
	[emim][$CH_3O(H)PO_2$]	[emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$]	[emim][CH_3OO]
9,00	0,0012 ± 0,0002	*	*
4,00	0,0036 ± 0,0001	*	*
2,30	0,0117 ± 0,0005	*	*
1,50	0,0210 ± 0,0033	*	*
1,00	0,2106 ± 0,0038	0,243 ± 0,011	0,254 ± 0,014
0,67	0,3062 ± 0,0307	0,553 ± 0,001	*
0,43	1,2396 ± 0,0035	1,323 ± 0,012	*
0,25	5,66 ± 0,06	8,661 ± 0,348	*
0,18	10,70 ± 0,25	*	*
0,11	33 ± 7	105 ± 1	*
0,05	85 ± 1	315 ± 5	258 ± 6
0,02	160 ± 7	*	*
0,00	254 ± 2	474 ± 3	457 ± 5

*Non mesuré.

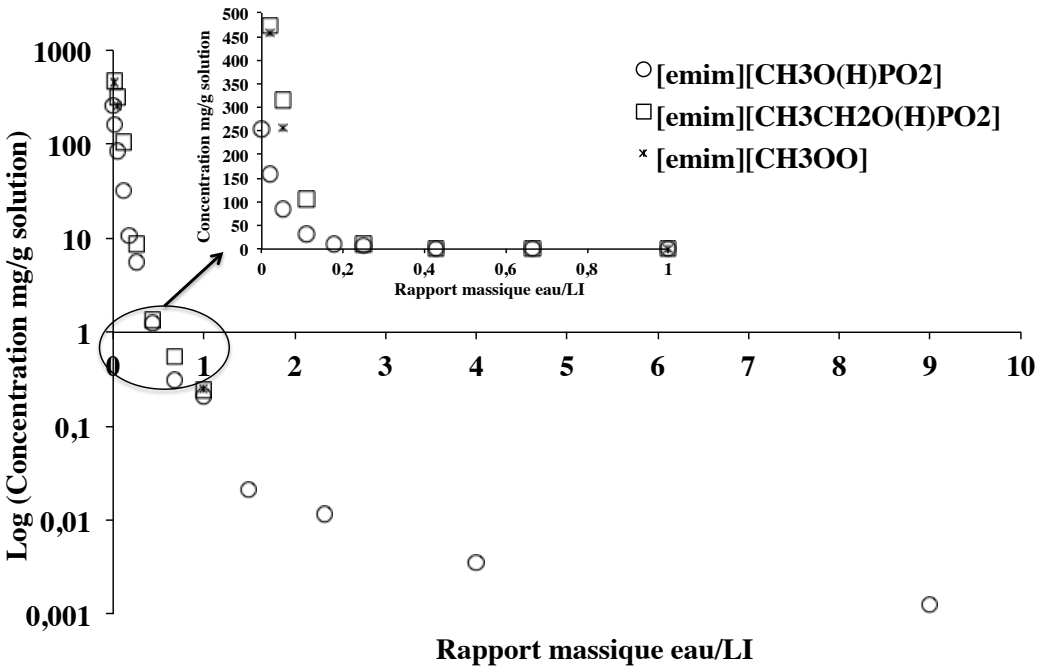


Figure 3.14. Solubilité du LASSBio-294 à 25°C ± 0,5°C et pression atmosphérique en fonction de rapport massique eau/LI.

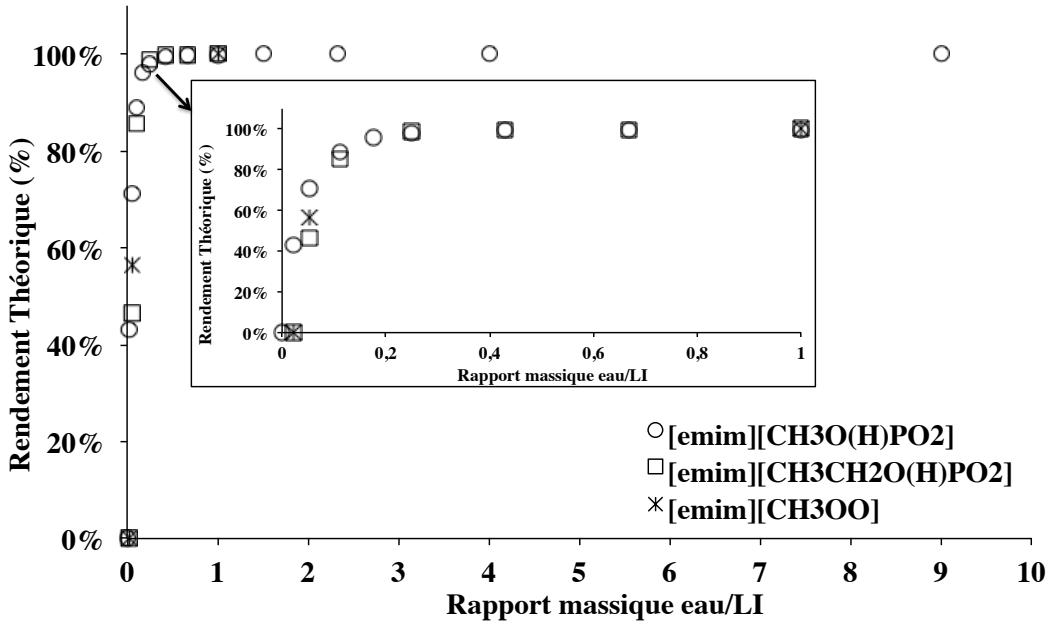


Figure 3.15. Rendements théoriques pour la cristallisation du LASSBio-294 en fonction du ratio massique eau/LI (25 ± 0,5 °C).

3.4.4 *Effet de la température sur la solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges eau/LI*

La solubilité du LASSBio-294 dans des mélanges eau/[emim][CH3O(H)PO2], eau/[emim][CH3CH2O(H)PO2] et eau/ [emim][CH3OO] pour la fraction massique eau/LI de 0,05 et 1 à différentes températures est présentée dans le Tableau 3.15. Les résultats indiquent que la solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges augmente en fonction de la température. Cependant, pour le mélange eau / [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$], la solubilité ne présente pas la même tendance : elle n'augmente pas en fonction de la température pour une fraction massique de 1,0 à la différence d'une fraction massique de 0,05. Ce résultat peut être lié à l'erreur expérimentale, comme cela a été expliqué pour la mesure des solubilités dans le [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$] pur.

Tableau 3.15. Solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges LIs et l'eau à différentes températures (± 0,5 °C) et pression atmosphérique

T (°C)	Fraction massique eau/LI	Concentration (mg/g solution)		
		[emim][$CH_3O(H)PO_2$]	[emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$]	[emim][CH_3OO]
15	1,00	0,172 ± 0,040	0,280 ± 0,080	0,226 ± 0,010
	0,05	62 ± 1	264 ± 1	217 ± 3
25	1,00	0,211 ± 0,010	0,243 ± 0,010	0,254 ± 0,020
	0,05	85 ± 1	314 ± 5	258 ± 6
35	1,00	0,253 ± 0,030	0,377 ± 0,050	0,256 ± 0,010
	0,05	122 ± 1	318 ± 3	312 ± 1

3.4.5 *Viscosité des solutions de LI/LASSBio-294 et des mélanges Eau/LI*

L'analyse des résultats présentés sur la Figure 3.16 indique que la solution de LI contenant LASSBio-294 est un fluide newtonien.

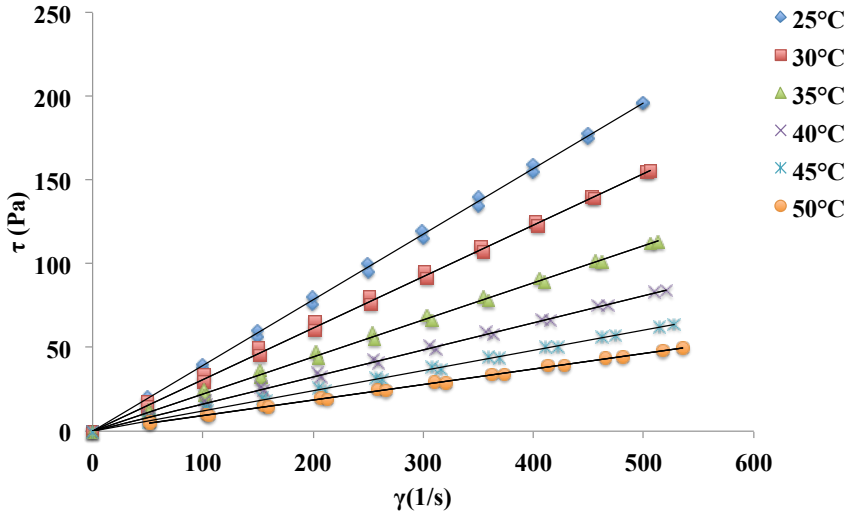


Figure 3.16. Rhéogramme caractéristique d'une solution de LASSBio-294 en LI ([emim][$CH_3O(H)PO_2$]) à 250 mg/g solvant pour différentes températures.

L'augmentation de la température réduit la viscosité des solutions de LASSBio-294 en LI, comme montre les résultats présentés dans la Figure 3.. Les régressions obtenues en fonction de la concentration en soluté et de la température sont données respectivement dans le Tableau 3.16 et le Tableau 3.17.

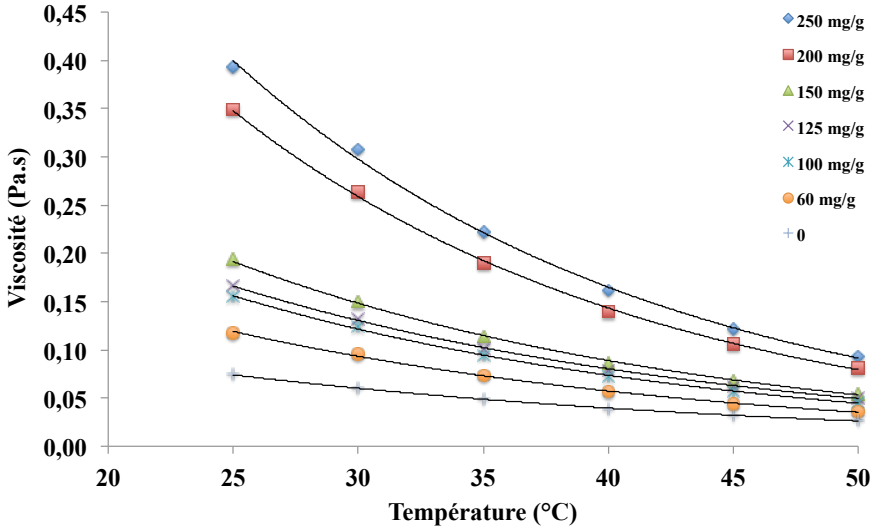


Figure 3.17. Courbes de viscosités des solutions de LI/LASSBio-294 à différentes concentrations de la molécule en fonction de la température.

Tableau 3.16. Équations obtenues à partir de donnés de viscosités des solutions de différentes concentrations de LASSBio-294 en LI en fonction de la température (25-50 °C).

Concentration (mg/g solvant)	Courbes	R^2
250	$\mu = 1{,}7467e^{-0{,}059T}$	0,9984
200	$\mu = 1{,}5216e^{-0{,}059T}$	0,9987
150	$\mu = 0{,}6877e^{-0{,}051T}$	0,9987
125	$\mu = 0{,}5577e^{-0{,}048T}$	0,9987
100	$\mu = 0{,}5451e^{-0{,}05T}$	0,9989
60	$\mu = 0{,}4018e^{-0{,}049T}$	0,9989
0	$\mu = 0{,}2101e^{-0{,}042T}$	0,9991

Tableau 3.17. Équations obtenues à partir de donnés de viscosités à différentes température en fonction de la concentration de LASSBio-294 en LI (0-250 mg/g solvant).

Température (°C)	Courbes	R^2
25	$\mu = 0{,}0014T + 0{,}0362$	0,9125
30	$\mu = 0{,}001T + 0{,}0319$	0,9159
35	$\mu = 0{,}0007T + 0{,}0293$	0,9252
40	$\mu = 0{,}0005T + 0{,}0262$	0,9356
45	$\mu = 0{,}0004T + 0{,}023$	0,9445
50	$\mu = 0{,}0003T + 0{,}0201$	0,9521

La Figure 3.18 montre la courbe obtenue (μ (mPa.s) = - 0,4739 Ra + 12,061, R^2 = 0,8817) à partir des mesures de viscosités des différents mélanges Eau/LI : 3; 5; 7; 14 et 20 (25 °C).

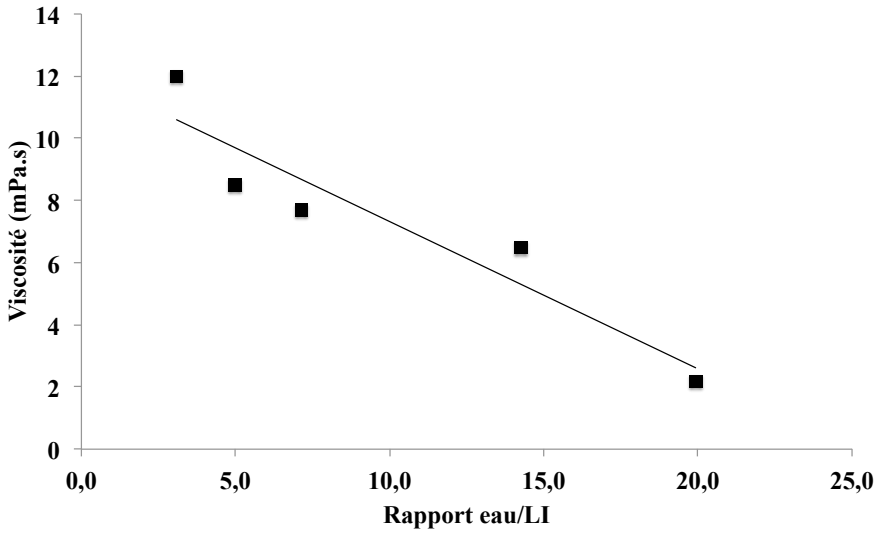


Figure 3.18. Viscosité des différents mélanges Eau/LI à 25 °C.

3.5 Conclusions

Solubilité dans des milieux aqueux

Dans ce chapitre nous avons identifié que la solubilité du LASSBio-294 dans des milieux aqueux sans additifs est très faible (≈ 11 µg/g solution) pour des valeurs de pH compris entre 4,5 et 8,0 (pH physiologiques). Pour des pH entre 12 et 13, la solubilité est augmentée due à l'ionisation de la molécule qui présente un pKa entre 11,2 et 11,3 estimé à partir du profil de solubilité en fonction du pH. La faible solubilité dans ces milieux limite son utilisation pour des essais de dissolution in vitro.

Des milieux en présence d'additifs permettent une augmentation de la solubilité due à la formation de micelles. Ces additifs peuvent donc être utilisés afin d'obtenir une méthode de dissolution discriminatoire pour évaluer le changement de propriétés lors de la recristallisation.

D'après les résultats de solubilité, nous avons identifié également que cette molécule peut être hydrolysée dans des milieux aqueux. L'ionisation dépend de la valeur du pH du milieu et dans certains cas de la teneur en solide. Dans des milieux acides cette hydrolyse est catalysée. À pH 1,2 près de 50 % du produit en solution est dégradé quelle que soit la quantité de solide ajouté. Dans l'eau et dans des milieux de pH 6,8 et 7,4 sans additifs l'hydrolyse augmente avec l'augmentation de la teneur en solide. Dans l'eau la dégradation est observée après 24 h pour des teneurs en solide supérieures à 0,1 g pour une masse de solvant de 50 g. Pour des pH 6,8 et 7,4 la dégradation est observée après 24 h en présence ou en absence d'aditifs. Ceci indique que des milieux à pH 6,8 ou 7,4 peuvent être utilisés pour évaluer les cinétiques de dissolution sans risque de dégradation de la molécule pendant le temps d'essai (normalement inférieur à 3 h). Des analyses RX et MEB ont montré que dans certains cas, la structure cristalline et le faciès des cristaux des solides récupérés ne sont pas identiques à ceux du LASSBio-294 initial. A un pH 1,2, ces changements sont observés après 24 h. Ainsi, comme pour d'autres molécules dérivées du N-acylhydrazone, l'hydrolyse du LASSBio-294 est confirmée. Sur cette base, lors du développement des formes pharmaceutiques pour l'administration orale du LASSBio-294, des stratégies pour la protection d'une possible hydrolyse sont fortement recommandés, par exemple, l'utilisation des systèmes de libération entérique.

Solubilité dans des milieux contenant LI

Les solubilités de cette molécule dans différents LIs, dans l'eau et dans les mélanges de LI/eau à différentes températures sont également déterminées. Des LIs capables de bien solubiliser le LASSBio-294 ont été identifiés. Les résultats obtenus dans les LIs purs et dans les mélanges LI/eau suggèrent une solubilité croissante en fonction de la température (excepté pour le mélange eau / [emim][$CH_3CH_2O(H)PO_2$] et une fraction massique de 1,0).

L'influence du type de cation et d'anion du LI pour la solubilisation de la molécule est observée. Des interactions telles que les liaisons hydrogène, les forces de van der Waals et les interactions du type π-π entre soluté-solvant sont proposées pour expliquer les résultats obtenus dans les différents LIs.

Dans les mélanges LI/eau la solubilité augmente avec l'augmentation de la proportion de LI. Des rendements théoriques pour la cristallisation aux environs de 99% peuvent être attendus.

Enfin, la bonne solubilité du LASSBio-294 dans la plupart des LIs testés dans ce travail permet d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la recristallisation par effet anti-solvant du LASSBio-294. Cette recristallisation fait l'objet du prochain chapitre avec le [emim][$CH_3O(H)PO_2$] comme LI de notre choix.

Chapitre 4 : Cristallisation par effet anti-solvant du LASSBio-294

4.1 Introduction

Après avoir déterminé la solubilité du LASSBio-294 dans LIs différents, la cristallisation de cette molécule par effet anti-solvant peut être envisagée en utilisant catégorie de solvants.

Ce chapitre présente la méthodologie utilisée et les résultats obtenus lors de la recristallisation du LASSBio-294. Le LI [emim][$CH_3O(H)PO_2$] est utilisé le comme solvant choix du LASSBio-294 et l'eau comme l'anti-solvant. L'eau est un solvant entièrement miscible avec ce LI.

4.2 Procédé de cristallisation du LASSBio-294 par effet anti-solvant

De façon générale, ce procédé est réalisé selon le schéma présenté dans la Figure 4.1. Des opérations unitaires de solubilisation, cristallisation, filtration, lavage et séchage sont mises en œuvre pour l'obtention des cristaux.

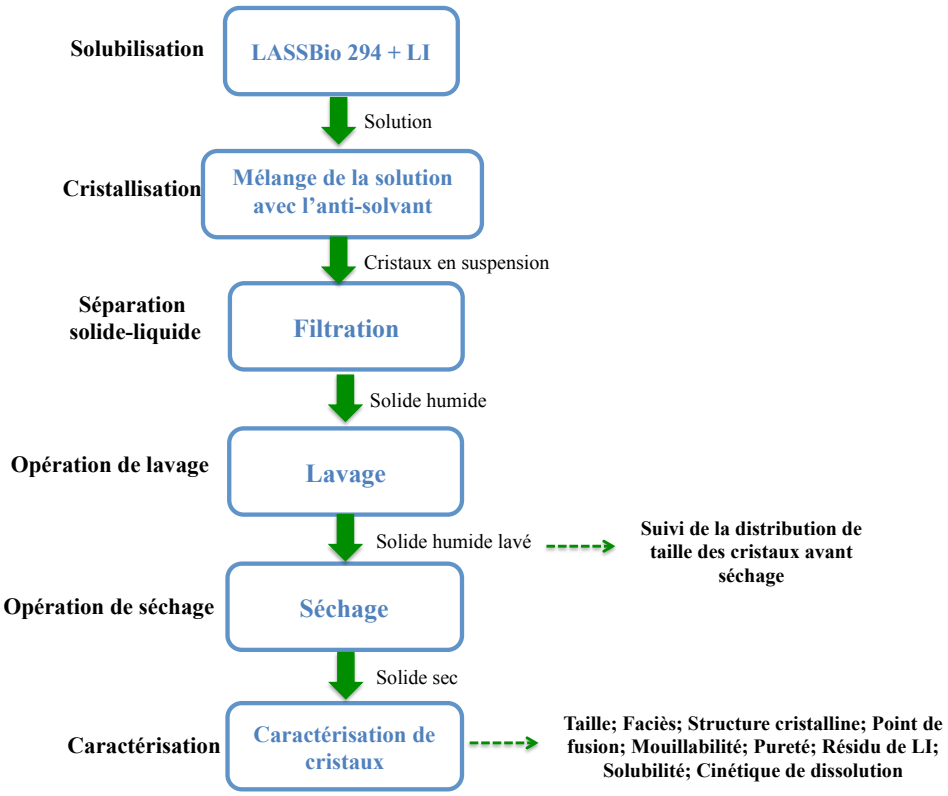


Figure 4.1. Schéma du procédé de cristallisation du LASSBio-294 par effet anti-solvant.

Une solution de LASSBio-294 / [emim][$CH_3O(H)PO_2$] est préparée à la concentration souhaitée à 30 ± 0,5 °C. Cette température a été choisie afin de diminuer la viscosité de la solution organique. Cette solution est mise en contact avec l'anti-solvant pour générer les cristaux. La suspension récupérée est filtrée sur un filtre millipore (0,22 µm, polypropylène) sous vide pour la séparation solide-liquide. Le solide humide récupéré est lavé avec 500 g d'eau ultra pure afin d'éliminer le solvant résiduel. Le filtrat est dosé pour déterminer les concentrations du LASSBio-294 et du LI. Après lavage, la distribution de taille du solide humide récupéré est réalisée. L'eau de lavage est récupérée pour déterminer les concentrations du LASSBio-294 et du LI. Ces dernières opérations sont détaillées dans la Figure 4.2. L'obtention du produit sec se fait par séchage dans une étuve sous vide à 50 °C pendant quelques jours. Après séchage les cristaux sont caractérisés et ses propriétés sont comparées à celles du solide initial. Ces différents dosages nous ont permis d'effectuer un bilan de matière sur le LASSBio-294 et le liquide ionique.

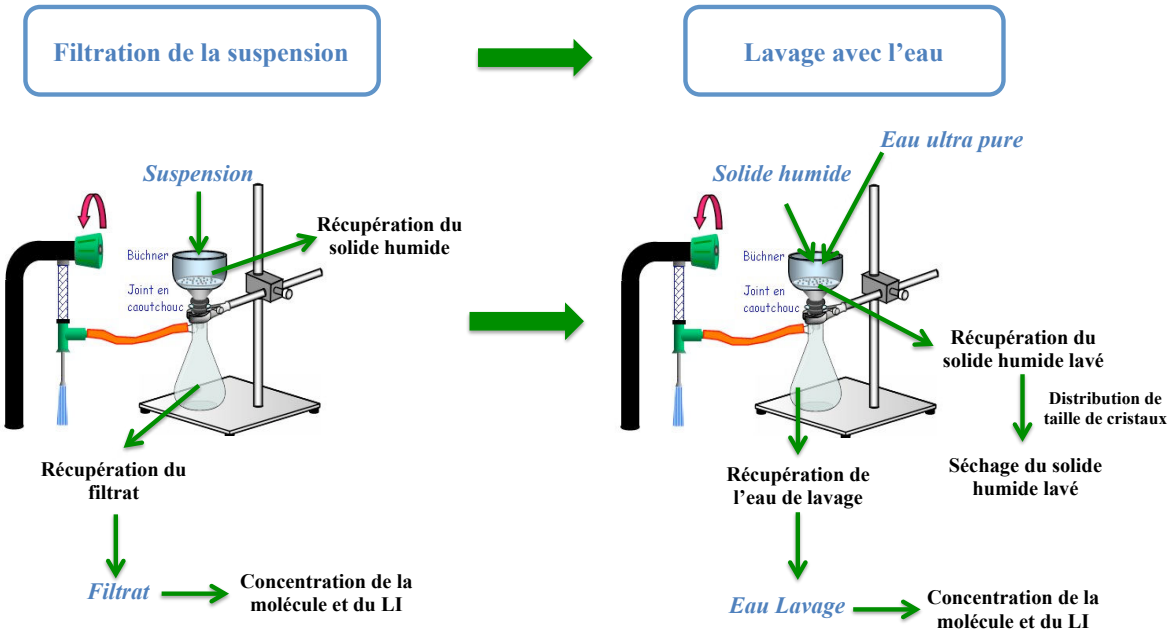


Figure 4.2. Schéma des opérations de filtration et lavage de cristaux.

4.3 Mode de mélange des solutions

La cristallisation peut être effectuée en mode discontinu, semi-continu ou continu, avec addition lente ou rapide. Avec une alimentation très lente, le système retourne à saturation avant l'addition de la fraction suivante. Avec une alimentation très rapide, il n'y a pas de consommation sensible des réactifs et l'état final après addition est égal à l'état initial de la fraction suivante.

Dans le cas d'un *cristallisoir fermé*, l'anti-solvant est ajouté dans la cuve contenant la solution ou l'inverse. Il est possible aussi d'ajouter la solution et l'anti-solvant simultanément. De plus, la solution organique ou l'anti-solvant peut être introduit juste sous la surface ou rapprochées dans la région de décharge de l'agitateur.

Dans un *cristallisoir semi-fermé*, avec une addition simple et lente, une ou plusieurs entrées pour la solution ou l'anti-solvant est possible, sans sortie pendant la cristallisation.

Pour des *cristallisoirs ouverts*, la solution et l'anti-solvant sont introduits continuellement et simultanément et la suspension des cristaux est retirée continuellement (Mersmann 2001).

Dans ce travail, les opérations de cristallisations sont effectuées en mode fermé ou semi-fermé.

En mode fermé, l'addition de la solution organique dans l'anti-solvant est réalisée selon deux modes :

a) par l'introduction simultanée de la solution (phase organique) et l'anti-solvant (phase aqueuse) dans un pré-mélangeur ($t_{addition} << t_{cuve\ agitée}$) ;

b) par l'introduction rapide de la solution dans un cristallisoir agité contenant l'anti-solvant.

En mode semi-fermé, l'ajout de la solution dans la cuve agitée contenant l'anti-solvant est réalisé goutte-à-goutte ($t_{addition} >> t_{cuve\ agitée}$). De plus, les essais sans le pré-mélangeur sont réalisés en présence et en absence des ultrasons.

Deux types d'essais sont présentés dans la suite : les essais avec pré-mélangeur et les essais sans pré-mélangeur. Les ultrasons n'ont été utilisés que dans les essais sans pré-

mélangeur. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'ensemble des caractérisations qui ont été faites sur les cristaux secs.

4.4 Mélange du solvant et de l'anti-solvant avec pré-mélangeur

4.4.1 *Protocole*

Ces essais sont réalisés avec le montage expérimental schématisé dans la Figure 4.3. Les phases organique et aqueuse sont introduites dans le pré-mélangeur grâce à une pompe à double seringues (Harvard PHD 2000 Infusion, USA). La suspension obtenue est coulée sous la surface d'anti-solvant contenue dans une cuve agitée de 200 mL et maintenue à 25 ± 0,5 °C. L'agitation assurée par un agitateur mécanique du type turbine à 8 pales plates montées sur disque est maintenue pendant toute l'opération. La présence d'anti-solvant dans la cuve agitée permet une agitation de la suspension sortant du pré-mélangeur, mais induit la création d'une nouvelle sursaturation.

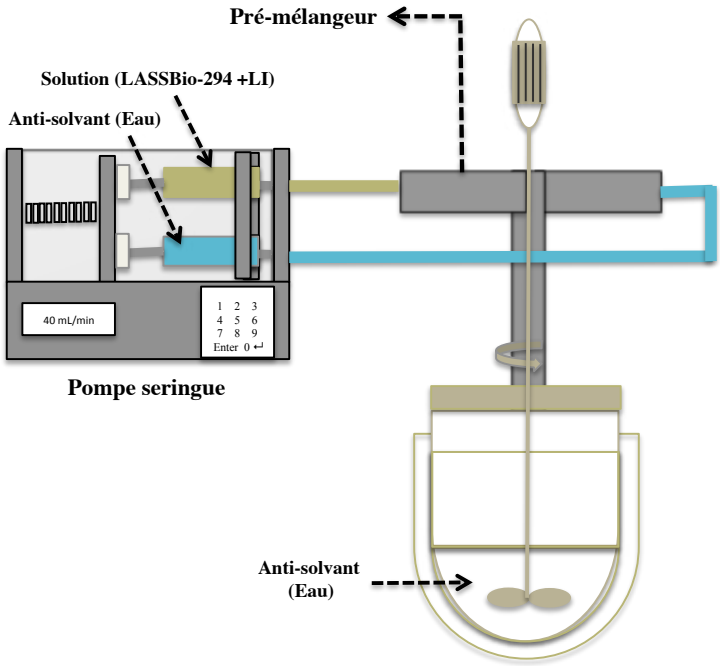


Figure 4.3. Schéma du montage expérimental pour la recristallisation du LASSBio-294 en utilisant un pré-mélangeur.

Basé sur le travail de Lindenberg et al. 2008, deux pré-mélangeurs en inox ont été construits afin de favoriser des conditions de mélange uniforme (Figure 4.4) :

- *Un mélangeur Type Roughton* : composé de deux jets pour former un vortex, une chambre de mélange de 3 mm, deux tubes d'entrée pour la phase organique et l'anti-solvant de 1 mm de diamètre et un tube de sortie de 1,75 mm de diamètre avec une longueur de 15 mm.

- *Un mélangeur Type T* : composé de deux entrées radiales pour la phase organique et l'anti-solvant, avec un diamètre de 1 mm et un tube de sortie de 2 mm de diamètre avec une longueur de 17,5 mm.

L'introduction de la phase organique et de l'anti-solvant dans le pré-mélangeur est réalisée avec un débit d'injection volumique de la pompe de 40 mL/min pour tous les essais. Ce débit a été choisi suite à des essais préliminaires. En effet, lorsque le débit est trop faible (< 30 mL/min), quand les deux solutions arrivent en contact dans le pré-mélangeur, le solide cristallise massivement et colmate le mélangeur. A l'inverse, quand le débit est trop important (> 50 mL/min), l'eau, moins visqueuse que la solution organique (1 mPa.s contre 100 mPa.s), entre en contact avec cette dernière au niveau de son injection dans le mélangeur, le solide cristallise alors et colmate l'entrée du mélangeur.

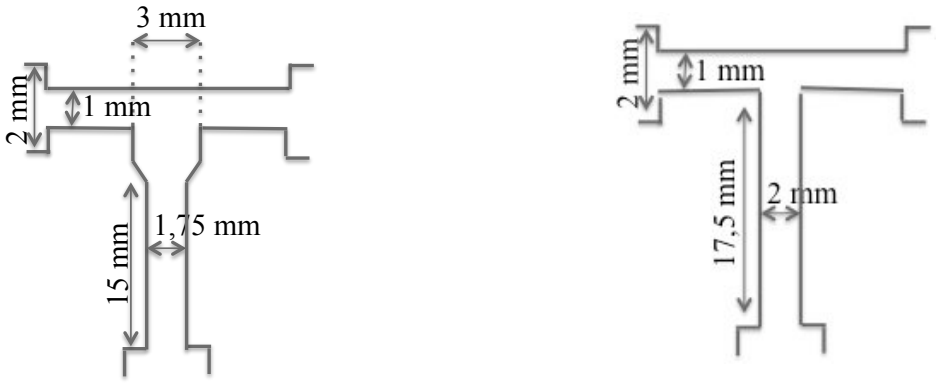


Figure 4.4. Illustration des pré-mélangeurs utilisés pour la cristallisation.

Une série d'expériences est réalisée afin d'évaluer l'influence des conditions opératoires :

- le type de mélangeur (Roughton et Type T),
- la vitesse d'agitation (400, 600 et 800 tours/min),
- la concentration de la molécule en solution (57, 91 et 159 mg/g de solution),
- le rapport massique eau/[emim][$CH_3O(H)PO_2$] (Ra = 13,7, Ra = 9,5 et Ra = 6,5),
- le type d'additif pour une stabilisation stérique (HPMC, Tween 20, Poloxamer 407).

Le Tableau 4.1 regroupe l'ensemble des expériences réalisées.

Tableau 4.1. Liste des expériences réalisées pour l'étude de paramètres opératoires du procédé.

Essai	Concentration initiale (mg/g solution)	Vitesse d'agitation dans la cuve (tours/min)	Rapport massique eau/LI	Anti-solvant	Mélangeur	Paramètre étudié
1	159	800	13,7	Eau	Roughton	Référence
2	159	800	13,7	Eau	Type T	Mélangeur
3	159	600	13,4	Eau	Roughton	Vitesse d'agitation
4	159	400	13,7	Eau	Roughton	
5	91	800	13,0	Eau	Roughton	Concentration
6	57	800	12,5	Eau	Roughton	
7	159	800	9,5	Eau	Roughton	Rapport eau/LI
8	159	800	6,5	Eau	Roughton	
9	159	800	16,5	HPMC 0,1 %*	Roughton	Type d'additifs en phase aqueuse
10	159	800	18,5	Poloxamer 407 0,1 %*	Roughton	
11	159	800	13,7	Tween 20 0,1 %*	Roughton	
12	159	800	13,9	Tween 20 0,5 %*	Roughton	

*Tous les additifs sont ajoutés dans la phase aqueuse, le % correspond au pourcentage massique dans l'anti-solvant.

4.4.2 *Résultats et discussion*

La cristallisation est donc effectuée en deux temps (Figure 4.5) :

a) un qui commence dans le pré-mélangeur (quelques secondes) après le contact de la phase organique avec l'anti-solvant ;

b) l'autre qui continue dans la cuve agitée (30 minutes).

Le premier contact crée les conditions de sursaturation pour générer la nucléation, suivi de la croissance et de l'agglomération. Dans un deuxième temps, la suspension est mélangée à nouveau avec l'anti-solvant présent dans la cuve agitée. Des phénomènes de nucléation, de croissance et d'agglomération des cristaux se produisent également (Figure 4.5).

Les conditions hydrodynamiques régnant dans le pré-mélangeur et dans la cuve agitée vont avoir une influence sur la distribution de taille des particules.

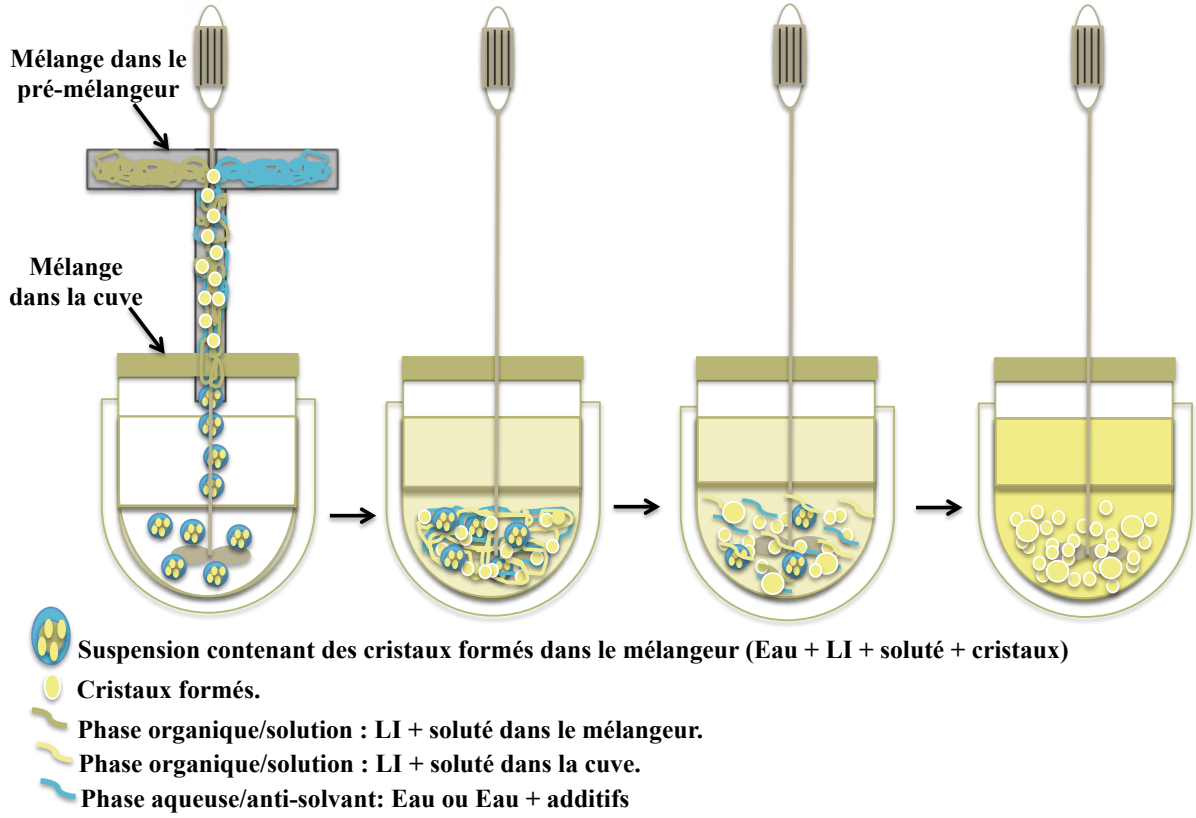


Figure 4.5. Illustration du procédé de cristallisation avec les étapes successives de mélange dans le pré-mélangeur et dans la cuve agitée.

4.4.2.1 Hydrodynamique

Le temps de mélange dans le mélangeur et dans la cuve agitée est comparé au temps d'induction (Tableau 4.2). Pour le pré-mélangeur, nous avons choisi d'utiliser la corrélation donnée par Lindenberg (2008) présentée dans le chapitre 1.

La présence du soluté a été négligée et une température de 25 °C a été choisie pour le calcul des propriétés physiques. Le temps de mélange pour le mélangeur en T n'a pas été calculé. Pour des conditions opératoires identiques, il sera supérieur à celui dans le mélangeur de type Roughton.

Pour le calcul du temps de macro-mélange dans la cuve, nous avons aussi calculé le temps de mélange avant la coulée (eau seule) et après la coulée. Dans ce cas, nous avons supposé un mélange complet des deux solutions sans considérer le solide. La teneur en solide finale est inférieure à 2 % massique (de 1 à 1,5 g).

Dans le cas de la cuve nous avons calculé le temps d'induction avec la sursaturation maximale. Ceci entraîne une sur estimation du temps d'induction.

Malgré un régime hydrodynamique intermédiaire ($10 < Re < 10^4$), un nombre de puissance constant et égal à 4 a été choisi. En effet, dans la gamme de nombre de Reynolds de notre système, ce nombre de puissance varie peu (Trambouze & Euzen 2002).

Les estimations des temps de mélange $t_{mél}$ (mélange pour le pré-mélangeur et macro-mélange pour la cuve) et du temps d'induction t_{ind} sont données dans le Tableau 4.2. Etant données les sursaturations, dans les deux cas, les temps d'induction (10^{-4} ms) sont très faibles devant les temps de mélange ce qui nous permet de conclure que le procédé de formation de cristaux est contrôlé par le mélange de la solution avec l'anti-solvant.

Lors du mélange de la solution (soluté + LI) avec l'anti-solvant dans le pré-mélangeur, des phénomènes de diffusion se produisent permettant la création de la sursaturation et la formation de cristaux (Figure 4.6). Le coefficient de diffusion sera aussi modifié en fonction de l'hydrodynamique.

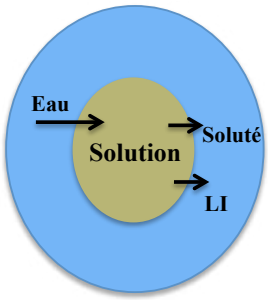


Figure 4.6. Illustration du processus de diffusion dans le pré-mélangeur.

En sortie du pré-mélangeur, nous avons un mélange eau/LI/soluté/cristaux qui est ajouté dans la cuve agitée contenant de l'eau. Des phénomènes de diffusion se produisent également mais, cette fois-ci, en présence de cristaux (Figure 4.7).

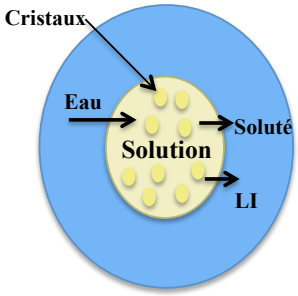


Figure 4.7. Illustration du processus de diffusion dans la cuve agitée.

Ainsi, l'hydrodynamique de la suspension aura une influence sur la formation de cristaux.

Tableau 4.2. Valeurs de t_{ind} et $t_{mél}$ dans le pré-mélangeur et dans la cuve agitée.

		Pré-mélangeur		Cuve agitée					
Essai	**S**	**t_{ind} * 10^4 (ms)**	**$t_{mél}$ (ms)**	**S**	**t_{ind} * 10^4 (ms)**	**Re Eau pure**	**$t_{macro,\ minimum}$ (s)*** Eau pure**	**Re Mélange**	**$t_{macro,\ minimum}$ (s)*** Mélange**
1	8126	1,27	0,292	14943	0,63	10921	1,0	1763	1,3
2	8443	1,26	> 0,292**	15013	0,63	10921	1,0	1753	1,3
3	7861	1,28	0,295	14980	0,65	8191	1,4	1282	1,7
4	8344	1,26	0,289	14938	0,63	5461	2,1	882	2,6
5	4256	1,38	0,294	8094	0,72	10921	1,0	1659	1,3
6	2451	1,48	0,299	4901	0,79	10921	1,0	1599	1,3
7	8146	1,27	0,291	15371	0,86	10921	0,9	1294	1,2
8	8133	1,27	0,292	13852	1,03	10921	0,7	1086	1,0
9	12264	1,12	0,250	14293	0,48	10921	1,0	2304	1,3
10	13526	1,06	0,236	13685	0,37	10921	1,0	3002	1,3
11	8295	1,27	0,290	14941	0,63	10921	1,0	1763	1,3
12	8508	1,26	0,287	15000	0,62	10921	1,0	1780	1,3

Propriétés utilisées : viscosité de l'eau à 25 °C = 0,89 mPa.s, masse volumique de l'eau à 25 °C = 998 kg/m^3.

* Le coefficient de diffusion de la molécule LASSBio-294 a été des valeurs comprises entre 9,3 et 16,0 10^{-11} m^2/s. **Le temps dans le mélangeur type T n'a pas été estimé. Il sera supérieur au temps de mélange dans le mélangeur de type Roughton.

*** $t_{macro,\min} = t_{macro,turbulent} = 7{,}3\left(\frac{T^2}{\bar{\varepsilon}}\right)^{1/3}$, D_{eau}= 1,3 10^{-9} m^2/s. Le temps de macromélange sera supérieur dans le cas d'un écoulement laminaire, c'est pour cela que nous l'avons nommé temps de macromélange minimum (Mersmann 2001).

4.4.2.2 Etude de l'influence des paramètres opératoires

Trois propriétés ont été sélectionnées pour montrer l'influence des paramètres opératoires (distributions de taille en volume ou/et nombre des cristaux humides, microphotographies en microscopie électronique à balayage (MEB) et teneur en LI dans le solide sec).

Afin d'étudier le phénomène d'agglomération, nous avons aussi calculé la distribution de taille en nombre car la masse de solide n'est pas toujours constante, notamment quand la concentration initiale C_i est modifiée. Ces distributions ont été calculées à partir de la masse finale de cristaux calculée en supposant que le système est à l'équilibre après 30 min. Les cristaux ont été supposés sphériques.

Les images MEB présentent des cristaux après lavage et séchage. La teneur en LI dans le solide sec déterminée par chromatographie ionique est aussi donnée.

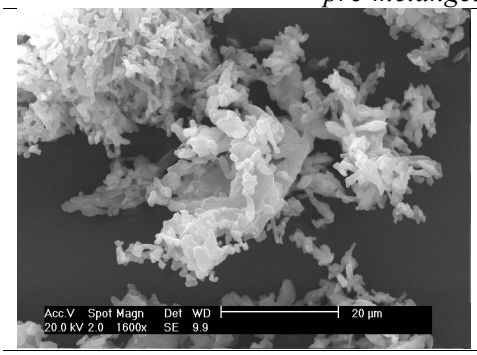
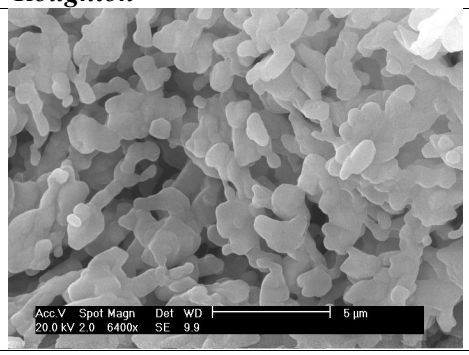
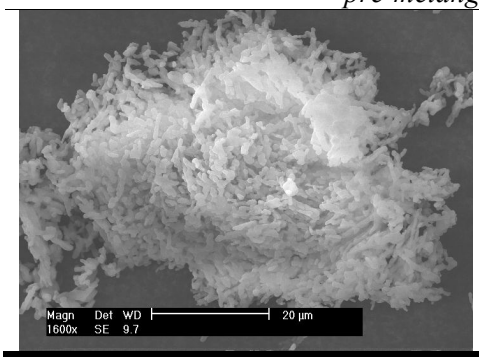
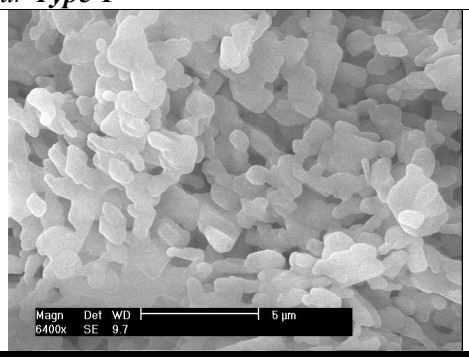
Les principales conclusions par rapport aux paramètres opératoires étudiés sont présentées. Nous avons supposé que ce qui sort du pré-mélangeur est toujours identique à conditions opératoires équivalentes.

4.4.2.2.1 Influence du type de pré-mélangeur

Les deux pré-mélangeurs ont été utilisés afin d'optimiser le mélange de la solution LASSBio-294 / [emim][$CH_3O(H)PO_2$] avec l'anti-solvant et créer des conditions propices de micro-mélange. Les distributions de taille des cristaux humides en volume et en nombre présentées dans la Figure 4.8 sont identiques. Les images MEB et les teneurs en LI du solide sec sont donnés dans le Tableau 4.3. Nous pouvons voir que les teneurs en LI sont très élevées et très proche et que le faciès des cristaux n'est pas bien défini. Aucune arête n'est visible sur les particules formées.

Pour la suite de l'étude des conditions opératoires, le mélangeur Roughton a été sélectionné. Le choix repose sur les résultats obtenus par (De Paiva Lacerda 2013), où le pré-mélangeur Roughton présente une plus grande efficacité de mélange (temps de mélange plus faible et grande énergie dissipée) par rapport au mélangeur type T.

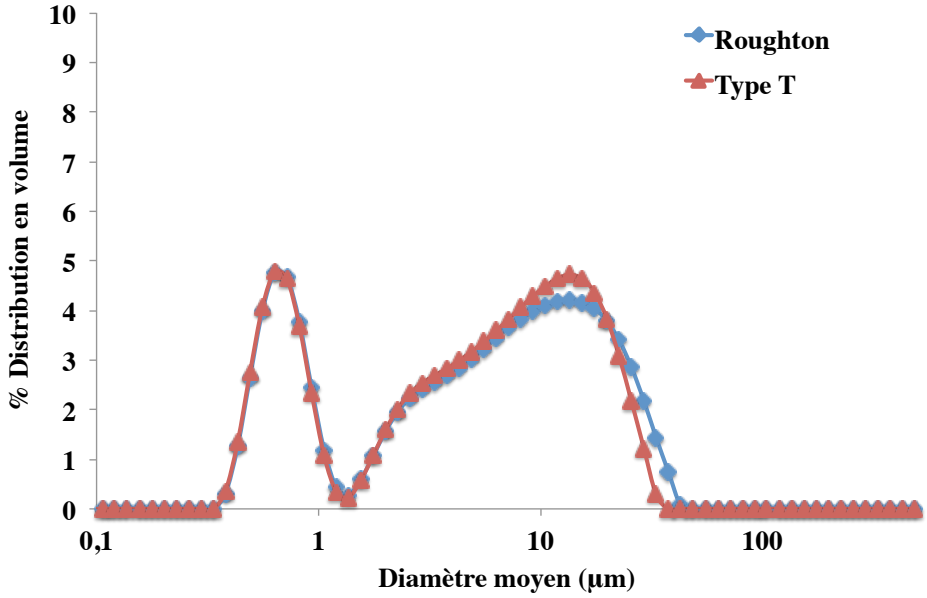
Tableau 4.3. Images MEB des cristaux obtenus avec les pré-mélangeurs Roughton et type T.

Images (1600x) **20 µm**	**Images (6400x)** **5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
pré-mélangeur ***Roughton***		
		23 644
pré-mélangeur ***Type T***		
		19470

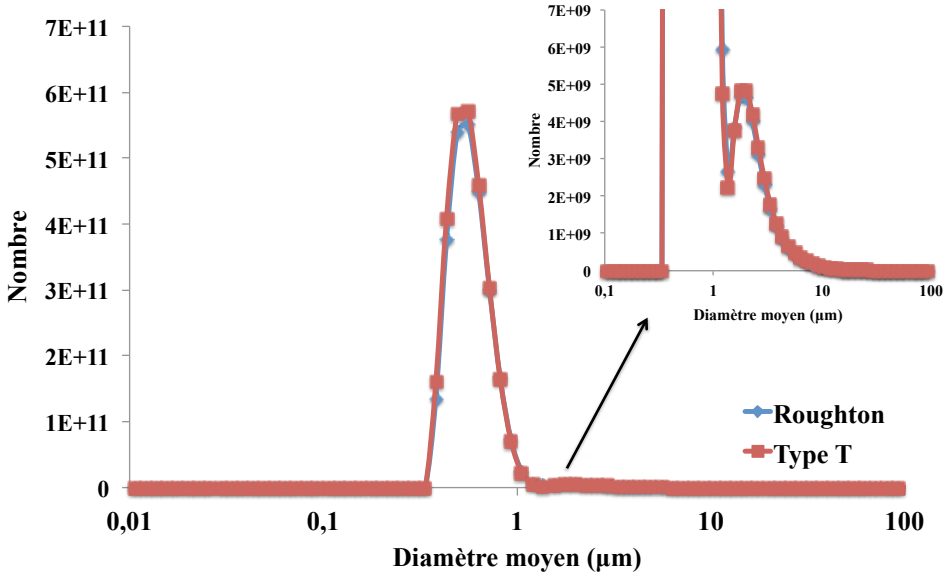
4.4.2.2.2 Influence de la vitesse d'agitation

L'augmentation de la vitesse d'agitation peut conduire à une réduction de taille des cristaux grâce à l'augmentation du transfert de matière dans le milieu agité qui mène à une sursaturation homogène en peu de temps et à une nucléation rapide induisant la formation de petites particules (Zhang et al. 2006). Néanmoins, une agitation trop forte peut favoriser les collisions entre les particules et la formation d'agglomérats. Dans cette étude, avec une vitesse d'agitation de 400 tours/min, la distribution de taille en volume est identique à celle obtenue avec 800 tours/min (Figure 4.9(a)). Pour ces deux vitesses d'agitation, les images MEB montrent des faciès similaires avec une taille légèrement plus petite à 800 tours/min (Tableau 4.4). A 600 tours/min, le second pic de la distribution de taille montre des agglomérats plus gros (Figure 4.9(a)). De plus, les cristaux semblent plus allongés (Tableau 4.4). Ces tendances peuvent être observées également avec la distribution de taille en nombre (Figure 4.9(b)). À 800 et 400 tours/min le nombre de particules inférieur à 1 µm est similaire

et supérieur à celui avec 600 tours/min. Avec un grossissement dans la zone entre 1 et 10 µm, il est possible d'observer que le nombre d'agglomérats formés à 800 tours/min est légèrement inférieur à ceux formés à 400 tours/min. À 600 tours/min la distribution de taille en nombre est déplacée vers les grandes tailles.

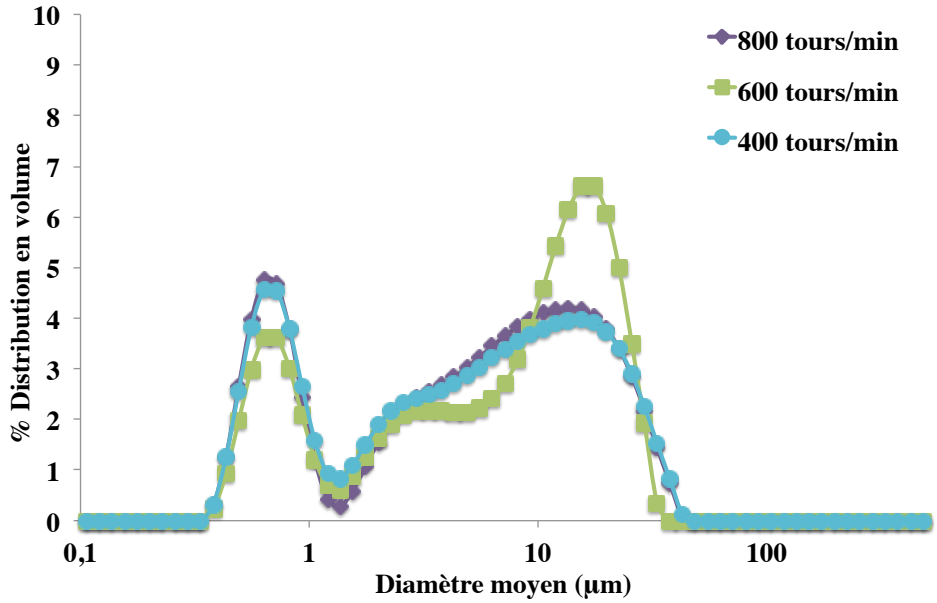


(a)

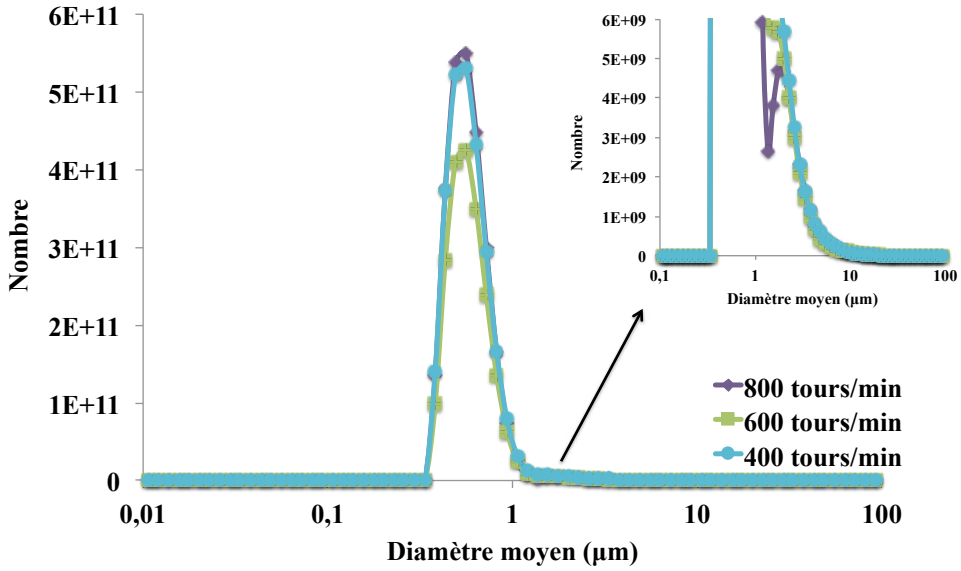


(b)

Figure 4.8. Influence du type de pré-mélangeur sur la distribution de taille en volume (a) et en nombre (b) des cristaux humides après lavage.
(Conditions opératoires : C_i =159 mg/g solution, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes et Ra eau/LI de 13,7).



(a)



(b)

Figure 4.9. Influence de la vitesse d'agitation sur la distribution de taille en volume (a) et en nombre (b) des cristaux humides après lavage.
(Conditions opératoires : Pré-mélangeur : Roughton; Ci = 159 mg/g solution; Ra =13,7 pour N_v = 400 et 800 tours/min et Ra = 13,4 pour N_v = 600 tours/min, temps d'essai de 30 minutes.

Des phénomènes de macro-mélange et micro-mélange (uniformité avec pré-mélangeur) sont mises en œuvre dès l'addition de la suspension dans la cuve. Le macro-mélange caractérise le mélange à l'échelle macroscopique. Le micro-mélange, mélange à l'échelle moléculaire, est l'ensemble des phénomènes qui caractérisent la texture fine du mélange (David & Villermaux 1987). Il permet la réduction progressive des dimensions des éléments du fluide, par déformation et fragmentation, jusqu'à atteindre l'homogénéisation au niveau moléculaire.

Bien que macroscopiquement homogène, un fluide peut présenter une structure microscopique variable où le micro-mélange peut être caractérisé par la notion de ségrégation. Cette notion peut se définir entre deux états extrêmes du fluide : le macro-fluide et le micro-fluide (David & Villermaux 1987)(Figure 4.10). Le premier est formé par des agrégats de particules qui ne se mélangent pas lors des opérations de macro-mélange, c'est un état complément ségrégé (Figure 4.10 (a)). Les agrégats, composé d'environ 10^{12} molécules, peuvent avoir diverses formes : globules sphériques, filamenteuses ou lamelles plus ou moins repliés, tourbillons, etc. Le deuxième est un mélange parfait, où les molécules libres peuvent se mettre en contact les unes par rapport aux autres (Figure 4.10(b)).

Les images MEB de ces cristaux et les teneurs en LI sont présentées dans le Tableau 4.4. On peut voir que le faciès des cristaux semble être directement lié à la teneur en LI. Plus la teneur en LI est élevée moins les arêtes des cristaux sont définies. Les cristaux des expériences menées à 800 et 400 tours/min semblent être des agrégats figés issus d'un mélange complétement ségrégé. La taille des agrégats est plus faible à forte vitesse d'agitation. De plus, la puissance dissipée à 800 tours/min (0,873 W) est supérieure à celles dissipées à 400 et 600 tours/min respectivement de 0,109 et 0,368 W. Des valeurs de $\varepsilon^{1/2}/\upsilon$ plus élevées et, par conséquent, des constantes d'agglomération plus élevées sont attendues avec une vitesse de 800 tours/min. Toutefois, les images MEB suggèrent un autre phénomène.

L'influence de la vitesse d'agitation ou de la puissance d'agitation peut être expliquée par des effets de mélange et de transfert de matière (Figure 4.11). À 800 tours/min, le transfert de matière est rapide et commence dès la formation des agrégats de fluide. Ceci peut entraîner une augmentation rapide de la sursaturation résultant en une nucléation massive (nombre très élevé de cristaux). Le nombre élevé de cristaux freine le transfert de matière et fige les agrégats de fluide.

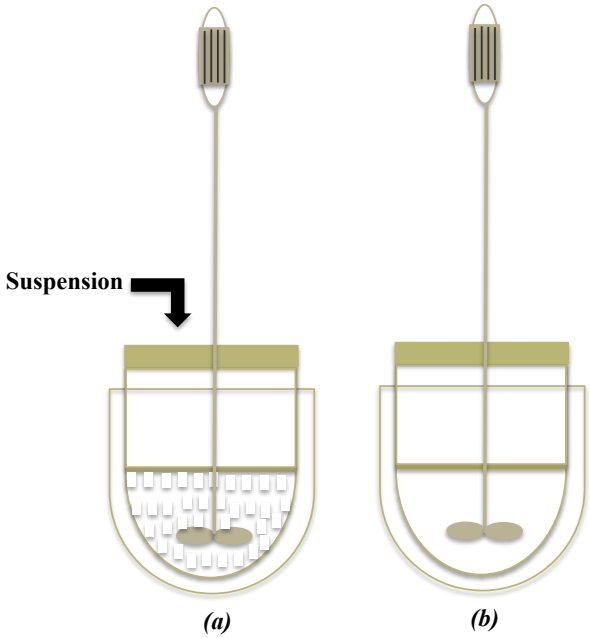


Figure 4.10. Les états extrêmes du mélange : (a) macro-fluide ; (b) micro-fluide.

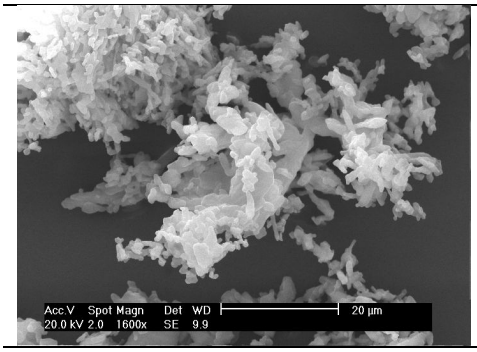
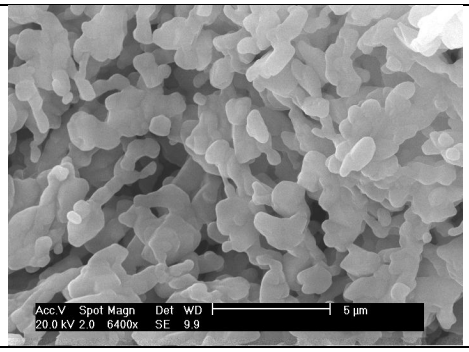
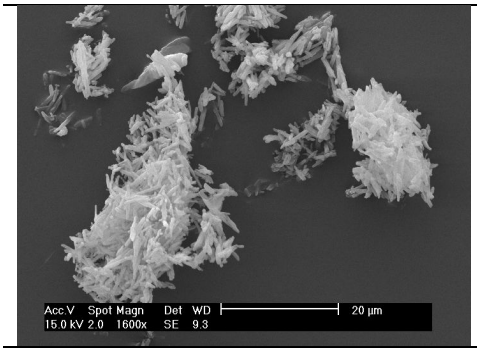
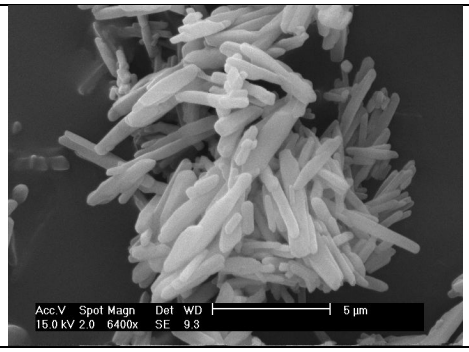
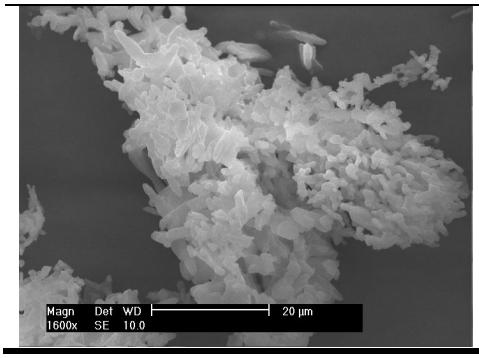
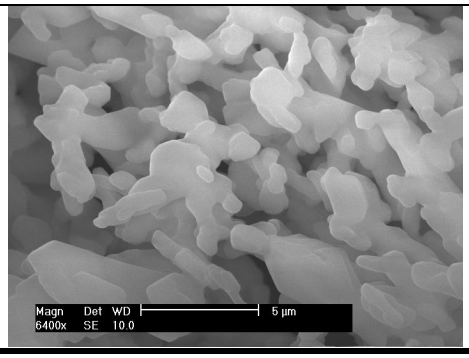
À 400 tours/min, le transfert de matière est lent. Les agrégats de fluide générés sont gros en taille. La création de la sursaturation est donc plus lente. La suspension contenant les cristaux est mal mélangée avec l'anti-solvant présent dans la cuve. Différentes zones de sursaturation sont créées. La croissance des cristaux est probablement majoritaire. Ces cristaux plus gros vont aussi bloquer le transfert et figer le système.

La teneur élevée en LI dans ces solides formés à 400 et 800 tours/min confirme le "gel" des agrégats de fluide soit par la nucléation soit par la croissance.

À 600 tours/min, le transfert de matière se produit avec une vitesse intermédiaire. Les phénomènes de diffusion favorisent plutôt la croissance des cristaux formés par rapport à l'agglomération et une dispersion correcte des agrégats de fluide.

En vue de favoriser la formation de cristaux de petites tailles, nous retiendrons pour la suite des essais une vitesse d'agitation de 800 tours/min.

Tableau 4.4. Images MEB des cristaux obtenus avec différentes vitesses d'agitation.

Images (1600x) **20 µm**	**Images (6400x)** **5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
800 tours/min		
		23644
600 tours/min		
		2241
400 tours/min		
		41878

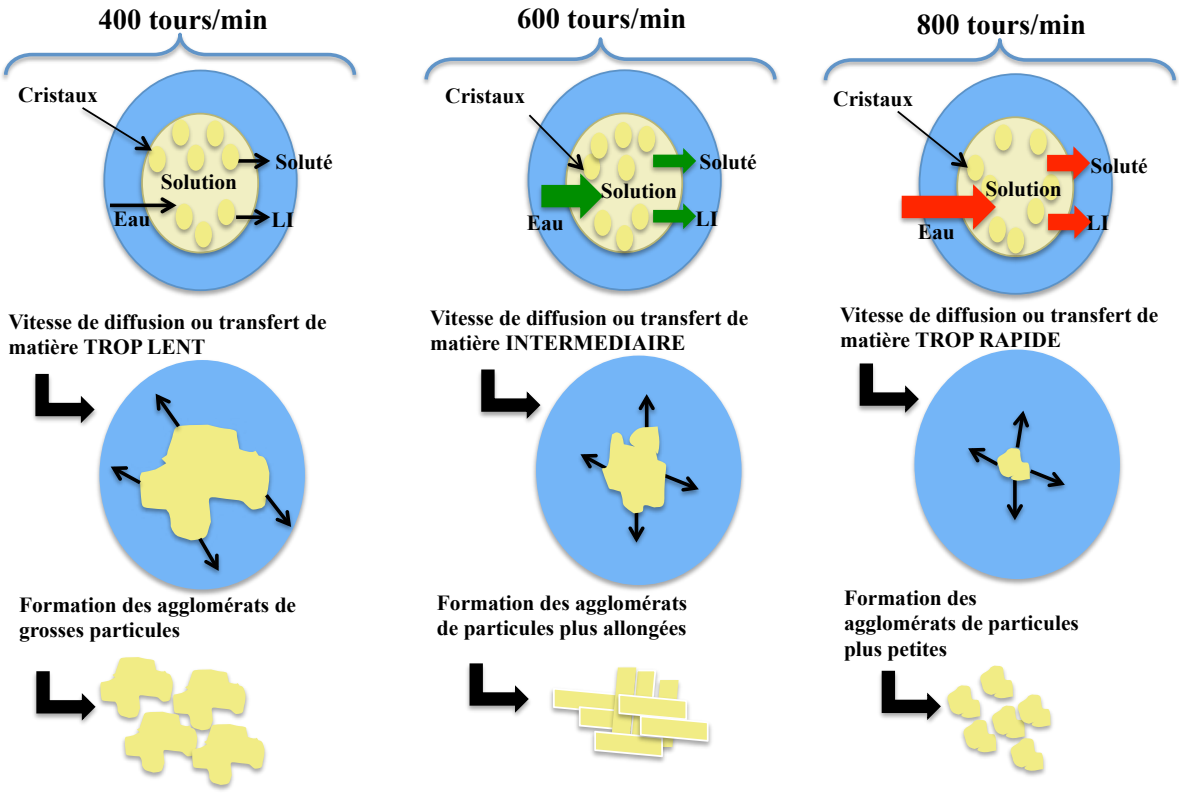


Figure 4.11. Illustration de l'influence de la vitesse d'agitation sur la formation de cristaux.

4.4.2.2.3 Influence de la concentration initiale de LASSBio-294

La distribution de taille en volume des cristaux humides obtenus à différentes concentrations initiales de notre molécule dans la solution est donnée dans la Figure 4.12(a). L'intensité du premier pic (en dessous du micromètre) diminue lorsque la concentration initiale augmente ; en revanche, le second pic reste identique quelle que soit la concentration. La Figure 4.12 (b) présente la distribution de taille en nombre de particules en fonction de la concentration de la phase organique. Pour la concentration de 159 mg/g de solution, le nombre de particules inférieur à 1 µm est logiquement supérieur à celui obtenu pour les concentrations de 91 mg/g et de 57 mg/g. De plus, une observation de la zone entre 1 et 10 µm, montre que le nombre d'agglomérats formés à 159 mg/g est également supérieur.

Le rapport de sursaturation (en négligeant le rapport des coefficients d'activité) donné par l'équation $S = C_i/C_i^*$ dépend de la solubilité C_i^* et de la concentration C_i du LASSBio-294 dans le milieu. La concentration initiale C_i de la molécule peut influencer la distribution de taille des particules de deux façons opposées soit en la réduisant soit en l'augmentant (en la

déplaçant vers des faibles tailles ou vers de grandes tailles). En effet, lorsque que C_i augmente, la vitesse de nucléation est également augmentée en raison d'une sursaturation plus élevée. Une augmentation de la vitesse de nucléation réduit le taux de croissance et favorise la formation de petites particules (Mersmann 2001; Zhang et al. 2006).

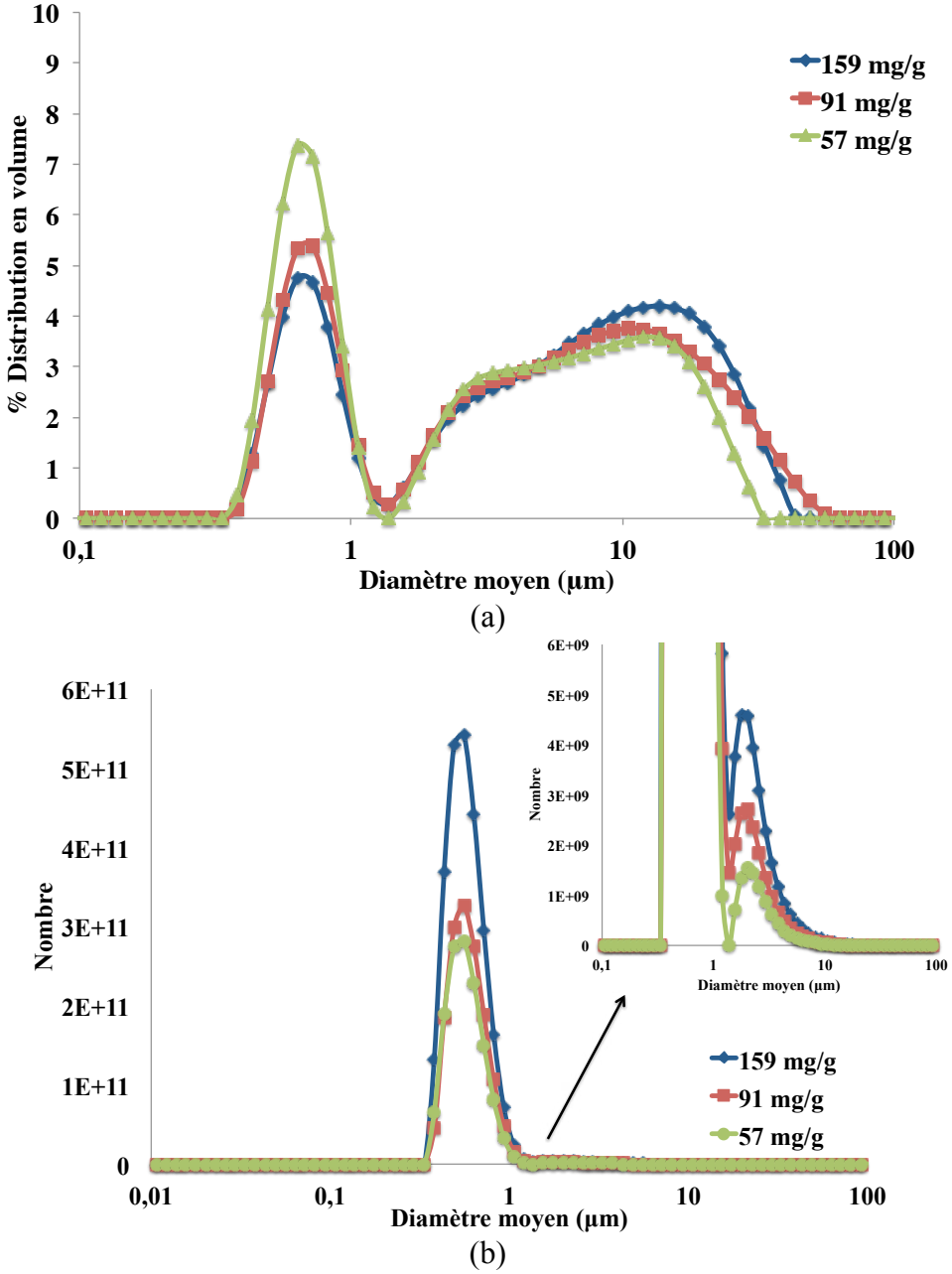


Figure 4.12. Influence de la concentration sur la distribution de taille en volume (a) et en nombre (b) des cristaux humides après lavage.
(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; N_v = 800 tours/min, Ra = 13 (91 mg/g solution), Ra =12,5 (57 mg/g solution) et Ra = 13,7 (159 mg/g solution), temps d'essai de 30 minutes).

Cette tendance a été décrite lors de l'obtention de particules de spironolactone (Dong et al. 2009) et d'atorvastatine calcique (Zhang et al. 2009) par cristallisation par effet anti-solvant. En revanche, l'augmentation du nombre de particules favorise l'agglomération. Nos résultats sont analogues à ceux observés par Zhang et al. (2009) pour des concentrations initiales élevées. Dans leur travail, lorsque la concentration initiale de la molécule augmente de 20 mg/mL à 60 mg/mL, la taille moyenne est réduite. Pour une concentration de 80 mg/mL, les particules commencent à s'agglomérer et leur taille augmente.

Dans notre cas, l'augmentation de la taille moyenne à forte concentration s'explique en considérant deux facteurs (Figure 4.13) : le nombre de cristaux formés à l'interface solvant/anti-solvant et l'influence de la concentration sur la viscosité.

D'une part, à haute concentration, le nombre important de cristaux formés à l'interface solvant/anti-solvant conduit à l'agglomération et formation de plus grosses particules. Simultanément, ces cristaux réduisent la diffusion du solvant à l'anti-solvant, ce qui limite la formation de nanoparticules. La détermination des tailles de Batchelor ($l_B \approx 57$ à 58 nm) et Kolmogoroff ($l_k \approx 114$ à 123 μm), nous permet d'identifier que le régime d'agglomération est plutôt laminaire étant donnée la taille de nos particules. Or nous savons que la constante d'agglomération laminaire est proportionnelle à $\left(\varepsilon/\upsilon\right)^{\frac{1}{2}}$. Le Tableau 4.5 donne cette constante en fonction de la concentration. Ces valeurs confirment que l'agglomération peut être augmentée avec une plus forte concentration de la molécule LASSBio-294 dans le système.

Tableau 4.5. Influence de la concentration sur la constante d'agglomération en régime laminaire.

C_i (mg/g)	$\left(\frac{\varepsilon}{\upsilon}\right)^{\frac{1}{2}}$ $(J/kg/m^2)^{1/2}$
159	416
91	402
57	395

D'autre part, la viscosité de la solution augmente avec l'augmentation de la concentration freinant la diffusion entre la solution et l'anti-solvant, ce qui implique une

sursaturation non uniforme (Figure 4.13) (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009). Ces types de phénomènes peuvent expliquer les résultats obtenus dans ce travail, où de particules plus grosses sont obtenues avec la plus haute concentration de la phase organique.

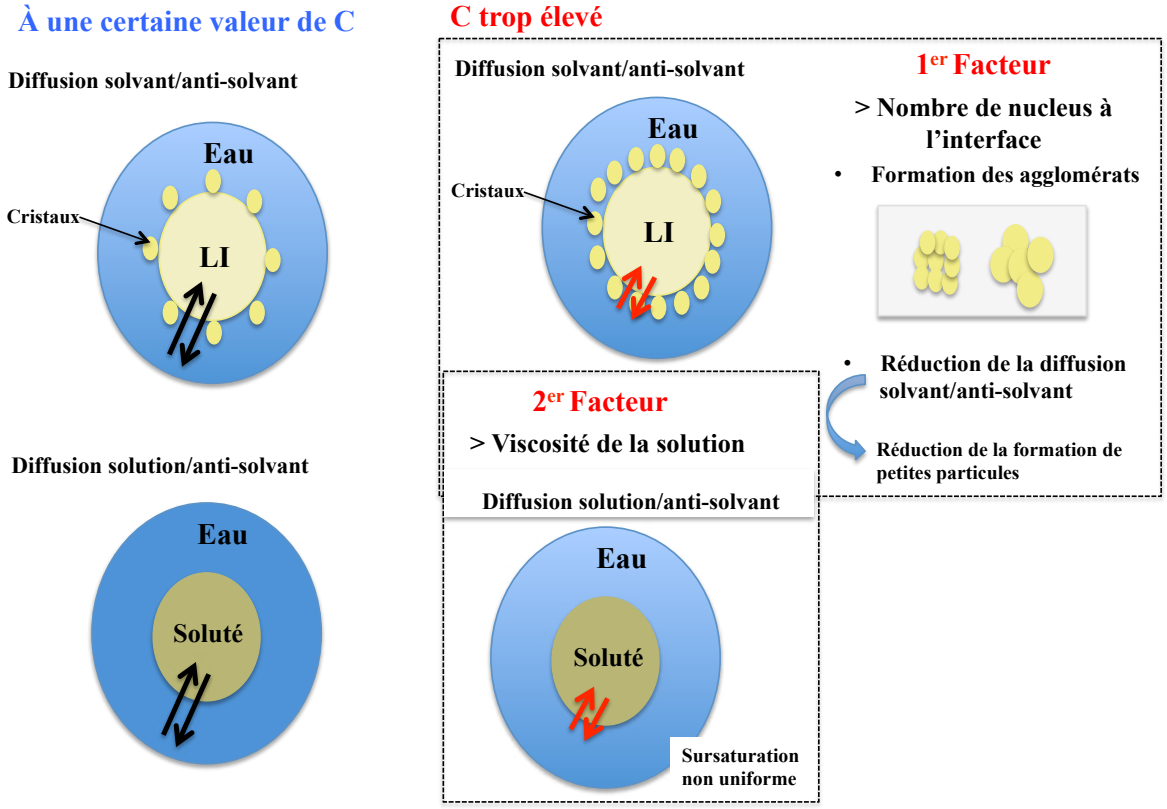


Figure 4.13. Illustration de l'influence de l'augmentation de la concentration sur la formation de cristaux.

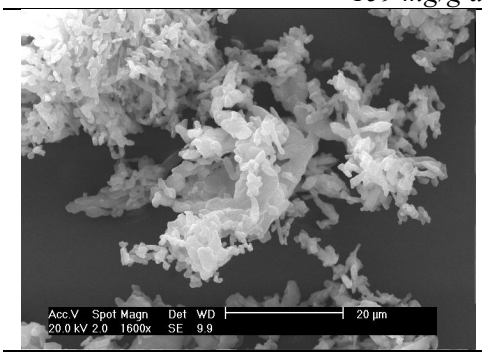
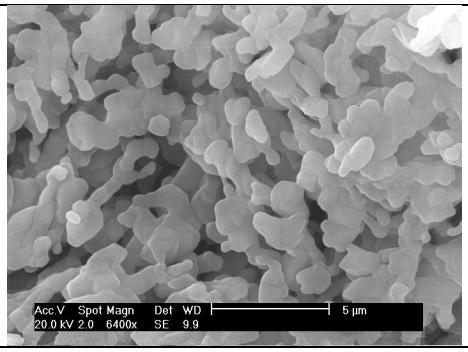
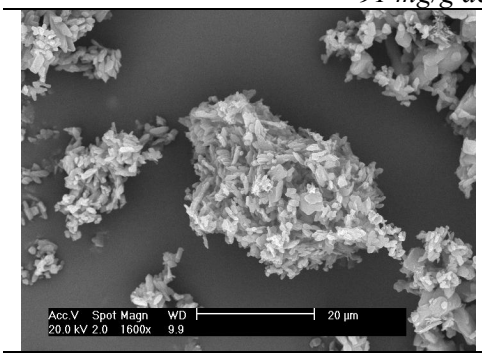
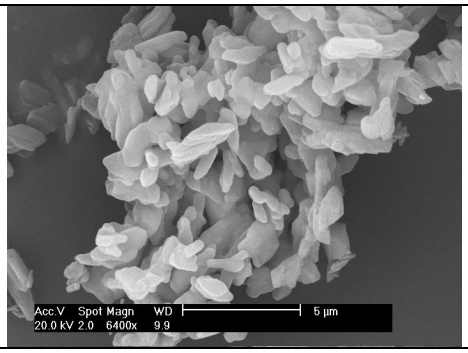
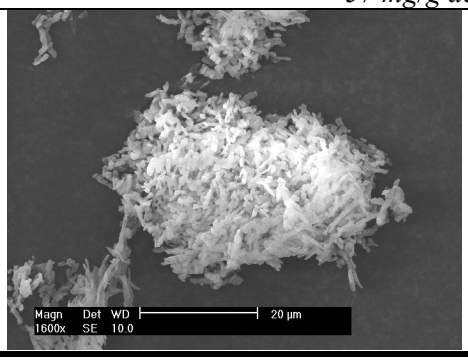
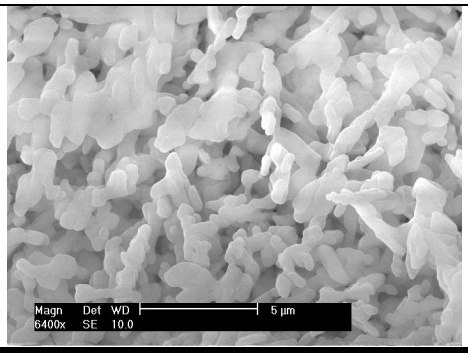
Le Tableau 4.6 montre les cristaux obtenus et leur teneur en LI en fonction de la concentration initiale de la phase organique. Les "agrégats figés" obtenus à 159 mg/g semblent plus petits que ceux observés aux plus faibles concentrations. A son tour, la teneur en LI semble diminuer quand la concentration initiale diminue.

4.4.2.2.4 Influence du rapport massique solvant/anti-solvant

La réduction de la taille des particules avec l'augmentation progressive de la teneur en anti-solvant a été décrite dans plusieurs travaux (Zhang et al. 2006; Wang et al. 2007; Zhao et al. 2007; Dalvi & Dave 2010). En gardant la même teneur en soluté dans le système, si le

rapport solvant/anti-solvant diminue, le degré de sursaturation augmente. Cela augmente le taux de nucléation et le nombre de fines particules formées.

Tableau 4.6. Images MEB des cristaux et teneur en LI obtenus avec différentes concentrations initiales de la phase organique

Images (1600x) **20 µm**	**Images (6400x)** **5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
159 mg/g de solution		
		23644
91 mg/g de solution		
		4271
57 mg/g de solution		
		2708

Dans le Tableau 4.7 nous avons donné la valeur de $\left(\varepsilon/\upsilon\right)^{\frac{1}{2}}$ en fonction des conditions opératoires. On peut donc voir que la constante d'agglomération laminaire est quasiment constante pour les ratios 13,7 et 9,5. Pour un ratio de 6,5 elle augmente plus significativement.

Tableau 4.7. Influence du rapport eau/LI sur la constante d'agglomération en régime laminaire.

Ra	μ (mPa.s)	ε (W/kg)	$\left(\frac{\varepsilon}{\upsilon}\right)^{\frac{1}{2}}$ $(J/kg/m^2)^{1/2}$
13,7	6	0,9	416
9,5	8	1,3	419
6,5*	9	1,8	454

*Le volume de cet essai est deux fois plus petit.

La Figure 4.14 (a) montre la distribution de taille en volume des cristaux humide pour les Ra eau/LI de 13,7 et 9,5. Nous pouvons observer que l'intensité du premier pic (< 1 μm) augmente lorsque la quantité d'anti-solvant augmente. Le second pic indique la présence d'agglomérats plus gros pour un Ra eau/LI plus faible. Dans ce cas la formation des agglomérats plus petits est favorisée par un Ra plus fort du fait de l'augmentation de la sursaturation.

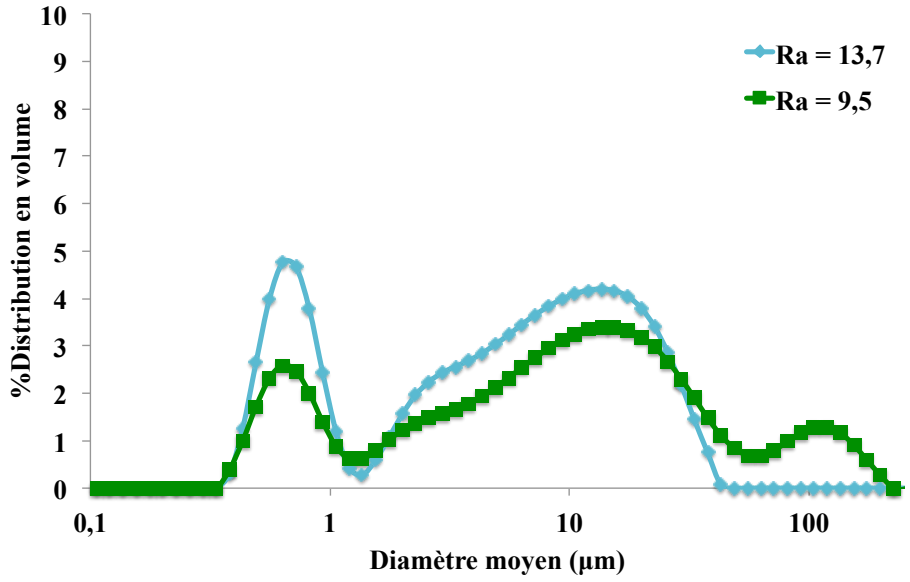
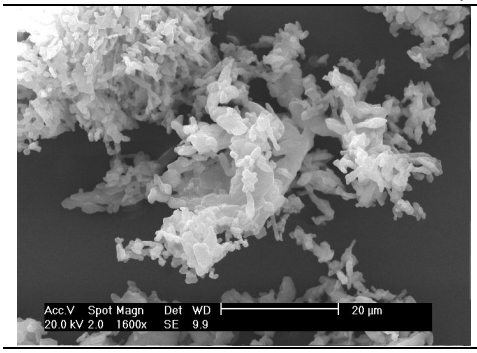
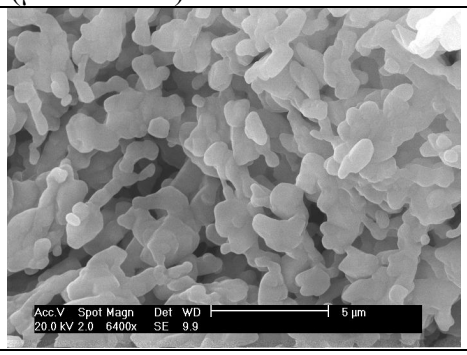
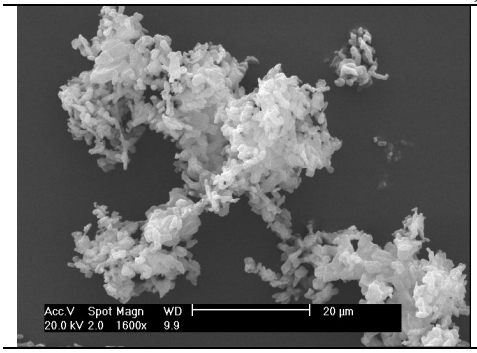
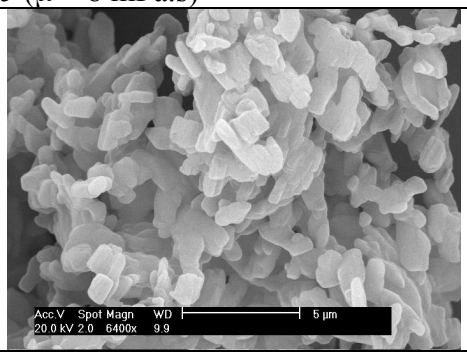
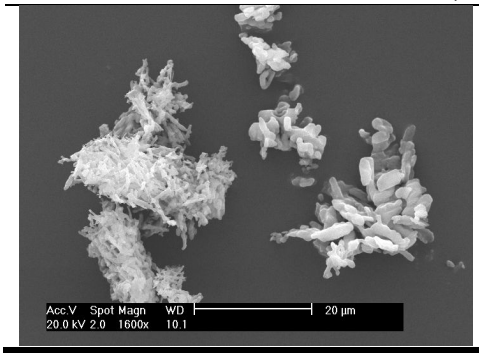
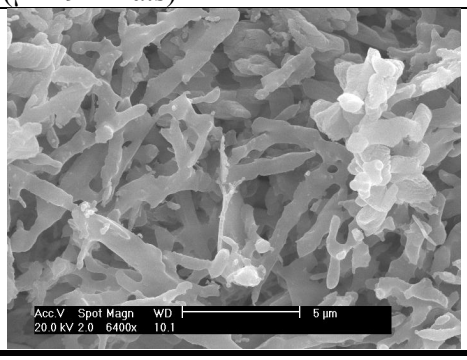


Figure 4.14. Influence du rapport sur la distribution de taille en volume des cristaux humides après lavage.
(Conditions opératoires : Pré-mélangeur : Roughton; C_i =159 mg/g solution, N_v = 800 tours/min, temps d'essai de 30 minutes. Pour le Ra = 6, la distribution de taille de cristaux humides n'a pas était mesurée).

Le Tableau 4.8 présente le faciès des cristaux obtenus et leur teneur en LI en fonction du Ra eau/LI. Le faciès semble être influencé par ce ratio. Des "agrégats figés" plus allongés sont obtenus à faible ratio. Une puissance dissipée plus importante (ε = 1,8 W/kg) peut expliquer l'étirement plus important observé pour le Ra eau/LI de 6,5.

Tableau 4.8. Images MEB des cristaux obtenus avec différents Ra eau/LI.

Images (1600x) **20 µm**	**Images (6400x)** **5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
Ra eau/LI = 13,7 (µ = 6 mPa.s)		
		23 644
Ra eau/LI = 9,5 (µ = 8 mPa.s)		
		6642
Ra eau/LI = 6,5 (µ = 9 mPa.s)		
		6000

Nous venons de voir que les particules obtenues ont une forte tendance à s'agglomérer. Afin de réduire cette agglomération nous avons décidé d'utiliser des additifs.

4.4.2.2.5 Influence des additifs

La diminution de la taille des particules à l'échelle nanométrique augmente la surface, créant ainsi une augmentation de la tension interfaciale, ce qui est thermodynamiquement défavorable. Cette augmentation tend à accélérer l'agglomération des particules afin de minimiser l'énergie de surface (Wu et al. 2011).

L'utilisation d'additifs dans le système (solvant ou anti-solvant) peut contrôler la croissance et l'agglomération des cristaux et contribuer à la formation de cristaux plus petits avec une distribution de taille plus uniforme (Dong et al. 2009; Ali et al. 2011).

Deux principaux mécanismes de stabilisation sont souvent utilisés : la stabilisation stérique et électrostatique (Thorat & Dalvi 2012). La stabilisation dépend des propriétés de la molécule à cristalliser, tels que son hydrophobicité et sa charge. Le choix de l'additif est basé sur son affinité pour la surface de particules et sa capacité de diffusion rapide pour couvrir les surfaces de particules générées.

Dans le cas d'une stabilisation stérique, les polymères non ioniques, et copolymères de blocs amphiphiles sont généralement utilisés. Des molécules de polymère commencent à s'adsorber à la surface du solide hydrophobe par des interactions non spécifiques entre le groupe hydrophobe du solide et du polymère. L'adsorption de molécules du polymère à la surface de particules réduit la tension à l'interface solide-liquide. Il en résulte une augmentation du taux de nucléation et par conséquent une diminution de la taille des particules (Dalvi & Dave 2009; Thorat & Dalvi 2012; Sinha et al. 2013).

Dans la stabilisation électrostatique, des tensioactifs ioniques et des polymères ioniques sont utilisés. Ces types d'additifs s'adsorbent fortement à la surface des particules grâce à des forces électrostatiques répulsives et attractives type van der Waals entre la surface et le polymère. Le mécanisme de stabilisation est lié à la répulsion entre les particules provoquée par les charges du stabilisant à la surface des particules ce qui conduit à la réduction de l'agglomération (Dalvi & Dave 2009; Thorat & Dalvi 2012; Sinha et al. 2013).

Les additifs les plus couramment utilisés sont : les dérivés de cellulose l'hydroxyéthylcellulose (HEC), l'hydroxyméthylcellulose (HPMC), la cellulose microcristalline (MC), la gélatine, la polyvinylpyrrolidone (PVP), le chitosane, le poloxamer 407, le monooléate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 20) et le lauryl sulfate de sodium

(LSS) (Douroumis & Fahr 2007; Dalvi & Dave 2009; Zhang et al. 2009; Maximiano et al. 2011; Viçosa et al. 2012).

Dans ce travail, des additifs pour une stabilisation stérique ont été choisis. Ils sont ajoutés dans la phase aqueuse :

- Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) (Figure 4.15) : polymère neutre, soluble dans l'eau, capable de s'adsorber à la surface des particules grâce à des liaisons hydrogène entre les groupements méthoxyle et hydropropyl de l'HPMC et les groupements fonctionnels de la molécule (Zhang et al. 2009; Viçosa et al. 2012).

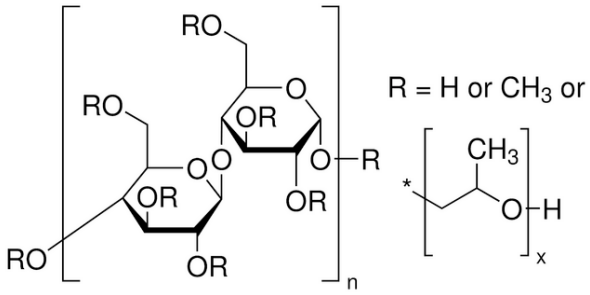


Figure 4.15. Formule développée de l'HPMC (masse molaire : 22000 g/mol).
Source : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/56340?lang=fr&region=FR.

– Poloxamer 407 ou Pluronic F-127 (Figure 4.) : copolymère tribloc amphiphile, formé par 70% d'oxyde d'éthylène et 30% d'oxyde de propylène, capable d'induire la stabilisation stérique de nanocristaux (Deng et al. 2010).

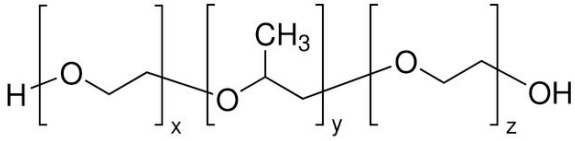


Figure 4.16. Formule développée du Poloxamer 407 (Poly(éthylène glycol)-*block*-poly(propylène glycol)-*block*-poly(éthylène glycol) (masse molaire : 8400 g/mol).
Source : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/16758?lang=fr&region=FR

- Monooléate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 20) (Figure 4.17) : surfactant non-ionique, capable d'adsorber sur la surface des molécules hydrophobes (Dalvi & Dave 2009; Pardeike et al. 2011).

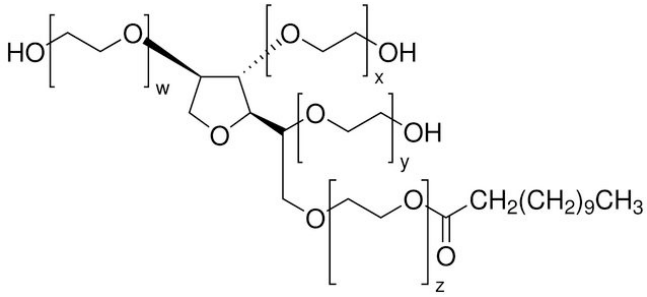


Figure 4.17. Formule développée du Tween 20 (Masse Molaire: 1228 g/mol).
Source : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2287?lang=fr&region=FR

L'influence de ces trois différents additifs sur la distribution de taille des cristaux de LASSBio-294 obtenus par recristallisation peut être démontrée à l'aide de la Figure 4.18. En effet, l'intensité du premier pic (< 1 µm) est plus intense lorsque le Tween 20 est utilisé comme additif pour la cristallisation de cette molécule. La plus forte concentration de Tween 20 (0,5 % en masse) permet d'obtenir des cristaux plus fins.

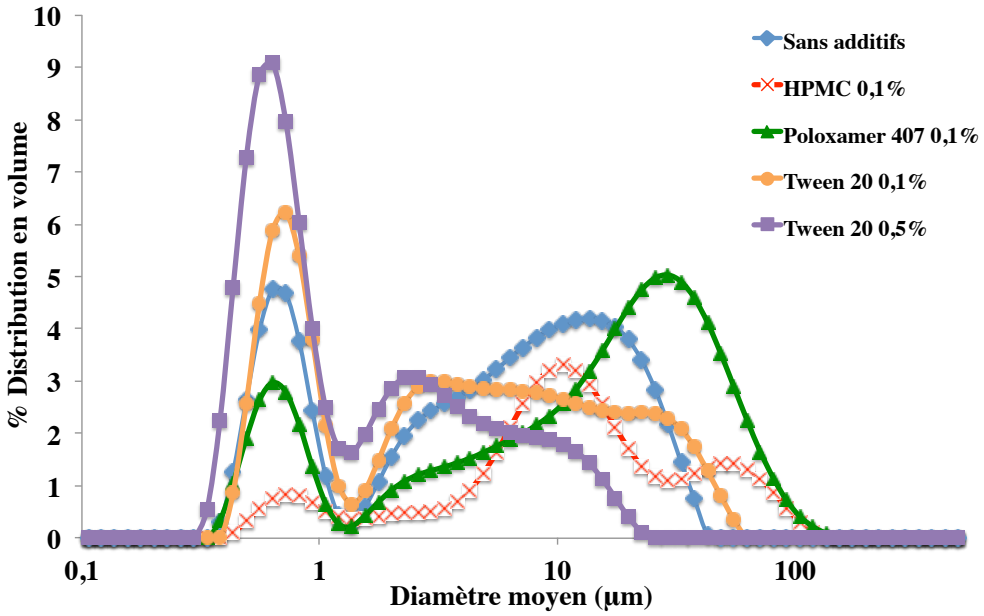
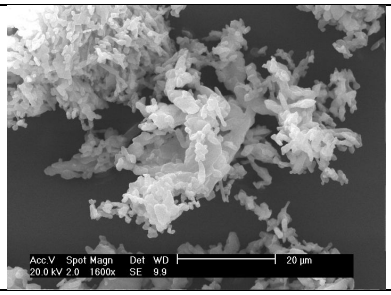
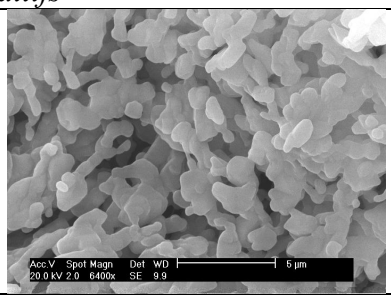
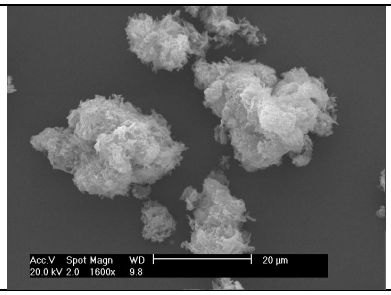
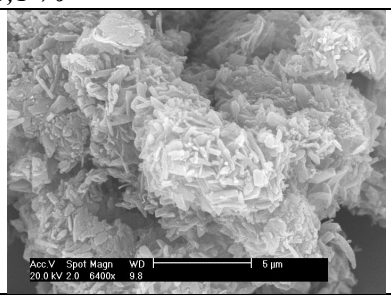
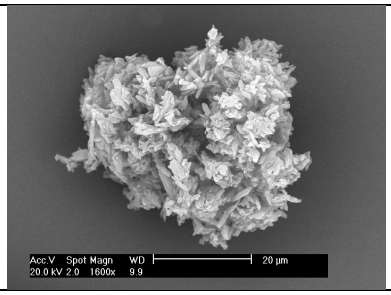
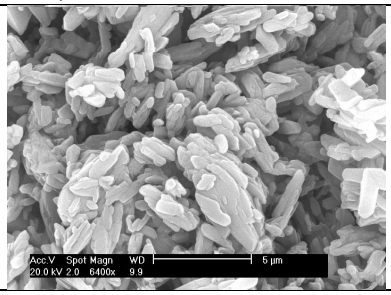
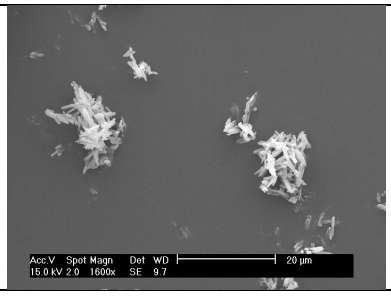
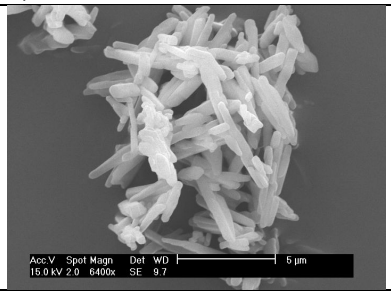
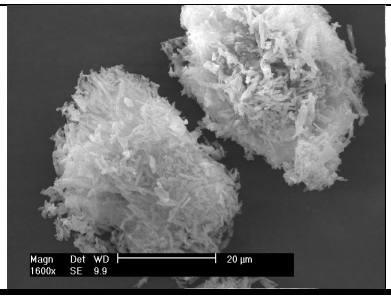
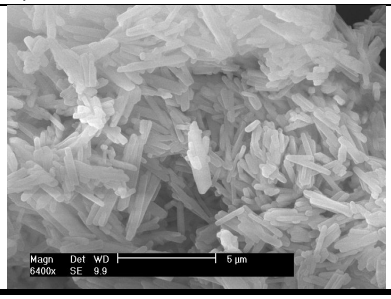


Figure 4.18. Influence du type d'additifs sur la distribution de taille en volume (a) des cristaux humides après lavage.
(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; C_i = 159 mg/g solution; N_v = 800 tours/min; temps d'essai de 30 minutes).

D'une part, le Tween 20 pourrait former des liaisons hydrogène avec les groupements fonctionnels de la surface des particules du LASSBio-294 et réduire la tension de surface. D'autre part, la formation des interactions hydrophobes pourrait créer une barrière mécanique favorisant la diminution du taux d'agglomération. Pour l'HPMC et le Poloxamer 407, malgré leurs capacités à former ce type de liaisons, le pourcentage de petites particules formées (premier pic) est inférieur à celui obtenu avec l'eau sans additif. En regardant les images MEB (Figure 4.18 et Tableau 4.9), nous pouvons voir que les petites particules existent mais forment des agglomérats qui ne sont pas brisés par les ultrasons pendant la mesure de taille, contrairement à ceux produits avec Tween 20 0,1 ou 0,5 %.

De plus, nous pouvons constater que la teneur en LI est fortement diminuée et que les cristaux ont des faciès mieux définis en présence d'additifs (Tableau 4.9). Les particules élémentaires constituant les agglomérats sont généralement plus petites avec additifs exceptés avec le Poloxamer 407.

Tableau 4.9. Images MEB et teneur en LI des cristaux obtenus avec et sans additifs.

Images (1600x) 20 µm	**Images (6400x)** 5 µm	**Teneur en LI (ppm)**
Sans additifs		
		23 644
HPMC 0,1 %		
		1783
Poloxamer 407 0,1 %		
		734
Tween 20 0,1 %		
		965
Tween 20 0,5 %		
		978

4.5 Mélange du solvant et de l'anti-solvant sans pré-mélangeur

En admettant que la formation de cristaux est contrôlée par le mélange de la solution avec l'anti-solvant, des essais de cristallisation en mode simple jet ont été menés. Des essais en addition rapide (R) et goutte-à-goutte (GG) avec et sans ultrasons (US) sont réalisés.

Lors de l'addition de la solution dans la cuve agitée, des étapes de nucléation, croissance et agglomération se produisent pour la formation des cristaux (Figure 4.19).

L'application d'ultrasons modifie essentiellement l'efficacité du mélange, la nucléation, la croissance des cristaux, la taille des particules, et l'agglomération (Thorat & Dalvi 2012). Le mélange est favorisé grâce à l'augmentation de l'énergie dissipée (Dhumal et al. 2008; Dalvi & Dave 2009), ce qui entraîne une réduction du temps de mélange et, par conséquent, des conditions plus uniformes pour la cristallisation (Verma et al. 2009; Beck et al. 2010; Dalvi & Dave 2009). En outre, les ultrasons réduisent significativement le t_{ind} due à la diffusion accélérée de molécules du soluté (modification du mécanisme de nucléation, augmentation du coefficient de diffusion du soluté) (Guo et al. 2005; Dodds et al. 2007; Beck et al. 2010). Les ultrasons peuvent aussi réduire l'agglomération (Guo et al. 2005). Tous ces effets contribuent à la diminution de la taille et au déplacement de la distribution de taille des particules vers des tailles plus faibles. En conclusion, une dispersion plus uniforme des particules est formée en présence d'ultrasons (Figure 4.20).

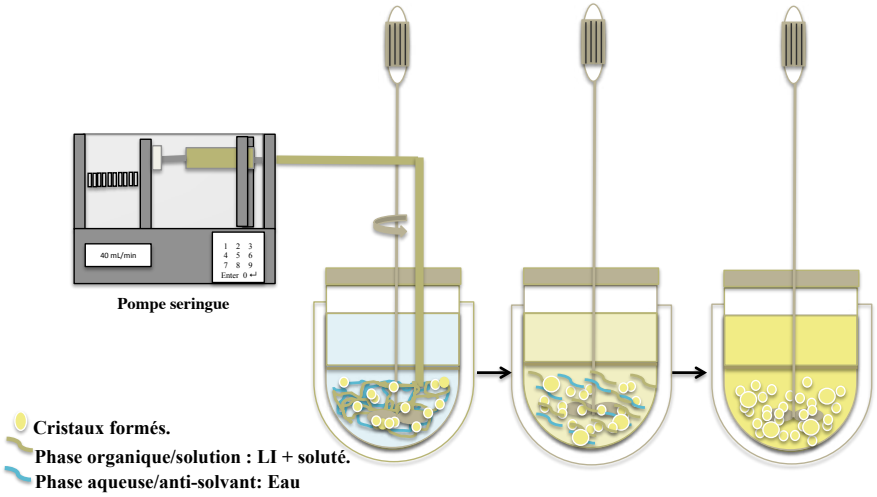


Figure 4.19. Illustration de la cristallisation dans la cuve agitée.

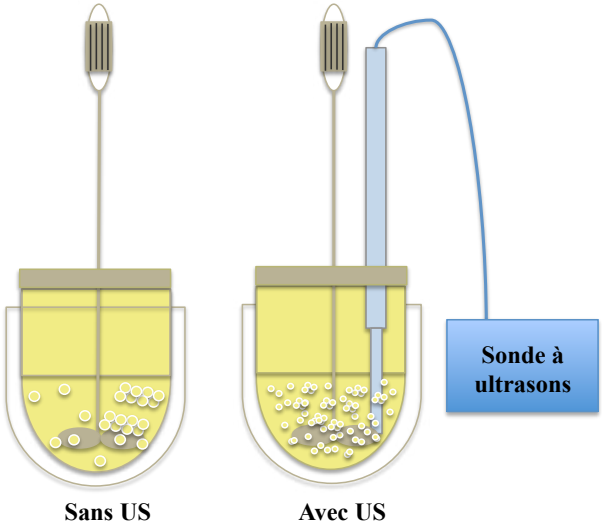


Figure 4.20. Illustration de la dispersion de cristaux dans la cuve agitée en présence et en absence d'ultrasons.

4.5.1 *Protocole*

En absence d'ultrasons : La phase organique est introduite dans la cuve agitée en mode (R) ou (GG) au niveau de la région de décharge de l'agitateur, à l'aide d'une pompe seringue. La cuve contient initialement 110 g d'anti-solvant à 25 ± 0,5 °C. L'agitation mécanique est maintenue à 800 tours/min pendant 30 minutes. Le Tableau 4.10 donne les conditions opératoires de ces essais.

En présence d'ultrasons : la phase organique est introduite dans la cuve agitée au niveau de la sonde ultrasonore en mode (R) ou (GG). La cuve contient initialement 110 g d'anti-solvant à 25 ± 0,5 °C. L'agitation mécanique est maintenue à 800 tours/min pendant 30 minutes. Les ultrasons sont appliqués dès le début de l'alimentation de la cuve pendant environ 50 secondes lors de l'addition rapide et 20-22 minutes pour l'addition goutte-à-goutte. La fréquence ultrasonore est de 20 kHz. La puissance donnée est la puissance délivrée par le générateur (SINAPTEC). La puissance réellement dissipée dans la suspension est de 70-90 % de la puissance délivrée par le générateur. Le Tableau 4.11 donne les conditions opératoires de ces essais.

Tableau 4.10. Liste des expériences réalisées pour l'étude du mode d'addition de la phase organique en absence d'ultrasons.

Essai	Concentration initiale (mg/g solution)	Débit d'injection volumique de la pompe (mL/min)	Mode d'addition	Rapport eau/LI	Puissance ultrasonore (W)
13	159	40	R	13,9	0
14	159	40	R	3,7	0
15	57	40	R	4,7	0
16	57	1	GG	4,6	0
17	57	2	GG	13,3	0

Tableau 4.11. Liste des essais réalisés pour l'étude de l'influence des ultrasons.

Essai	Concentration initiale (mg/g solution)	Débit d'injection volumique de la pompe (mL/min)	Mode d'addition	Rapport eau/LI	Puissance ultrasonore (W)
18	159	40	R	14,9	40
19	159	40	R	3,9	40
20	57	40	R	4,7	40
21	57	2	GG	13,1	40
22	57	1	GG	4,6	40
23	159	1	GG	4,5	40
24	29	1	GG	4,7	40
25	57	1	GG	4,6	30
26	57	1	GG	4,9	20
27	57	1	GG	4,7	10

4.5.2 *Résultats et discussion*

4.5.2.1 Hydrodynamique

Le temps de macromélange t_{macro} dans la cuve agitée après l'addition rapide de la phase organique en absence d'ultrasons est comparé au temps d'induction t_{ind}, considérant un régime hydrodynamique intermédiaire ($10 < Re < 10^4$) (Tableau 4.12). Pour le calcul du t_{macro} dans la cuve, nous avons supposé un mélange complet des deux solutions sans considérer le solide. Le t_{ind} varie de 0,062 à 0,131 ms et le t_{macro} de 1,636 à 2,441 s en régime laminaire.

Tableau 4.12. Valeurs de t_{ind} et $t_{mél}$ dans la cuve agitée après l'addition de la phase organique en mode rapide (régime intermédiaire).

Essai	**C_i (mg/g)**	**Ra eau/LI**	**Re**	**t_{ind} 10^4 (ms)**	**$t_{macro\ laminaire}$ (s)**
13	159	13,9	1801	0,62	0,164
14	159	3,7	948	1,24	0,244
15	57	4,7	992	1,31	0,238

Lors d'une addition goutte-à-goutte, le régime hydrodynamique passe de turbulent (Re > 10^4) à intermédiaire ($10 < Re < 10^4$) après 4 minutes d'alimentation (Tableau 4.13). L'estimation des ces deux temps montrent qu'ils augmentent au cours du temps si on suppose que le solide ne cristallise pas. Le temps d'induction t_{ind} varie de 0,18 à 1,59 10^{-4} ms et le temps de macro-mélange minimum $t_{macro,minimum}$ de 1,0 à 1,14 s. La formation est toujours contrôlée par les phénomènes de mélange.

Tableau 4.13. Valeurs de tind et tmél dans la cuve agitée après l'addition en mode goutte-à-goutte de la solution à 57 mg/g de solution (Essai 16, Ra = 4,6).

Temps d'addition (min)	**S**	**t_{ind} 10^4(ms)**	**Re**	**$t_{macro\ minimum}$ (s)**
0	0		9720	1,00
1	1464	0,15	11367	1,00
2	2571	0,14	11460	1,01
3	3395	0,14	11494	1,01
4	3995	0,13	11511	1,01
5	4418	0,44	3440	1,09
6	4702	0,62	2404	1,10
7	4876	0,75	1979	1,10
8	4965	0,85	1747	1,10
9	4988	0,93	1602	1,11
10	4959	0,99	1502	1,11
11	4891	1,05	1429	1,11
12	4794	1,09	1373	1,11
13	4676	1,13	1329	1,12
14	4542	1,17	1294	1,12
15	4397	1,20	1265	1,12
16	4246	1,23	1240	1,13
17	4091	1,25	1219	1,13
18	3934	1,28	1201	1,13
19	3779	1,30	1186	1,14
20	3625	1,32	1172	1,14

*** $t_{macro,\min} = t_{macro,turbulent} = 7{,}3\left(\frac{T^2}{\bar{\varepsilon}}\right)^{1/3}$. Le temps de macro-mélange sera supérieur dans le cas d'un écoulement laminaire, c'est pour cela que nous l'avons nommé temps de macro-mélange minimum (Mersmann 2001).

4.5.2.2 Etude de l'influence des paramètres opératoires

4.5.2.2.1 Effet du mode de mélange rapide ou goutte-à-goutte avec et sans ultrasons

En comparant les deux modes d'addition sans ultrasons, pour des Ra eau/LI similaires, l'ajout de la solution de concentration de 57 mg/g solution en mode (R) engendre la formation de cristaux plus petits par rapport à l'addition GG (Figure 4.21). Ceci peut être justifié car en mode (R) la vitesse de nucléation est plus forte ce qui permet de générer des petites particules.

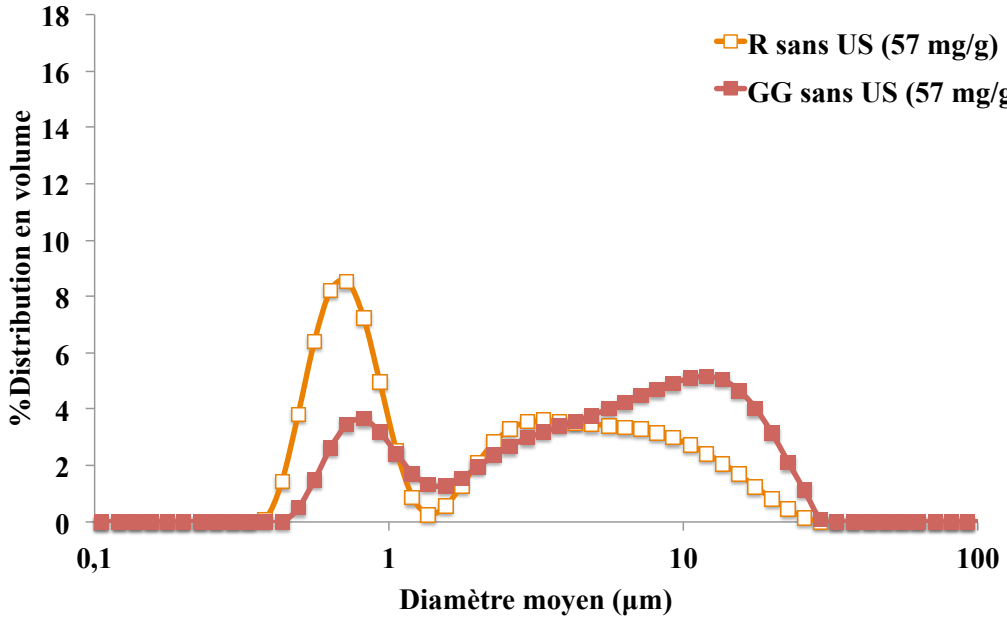
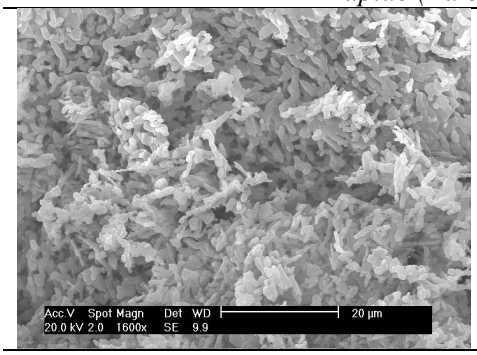
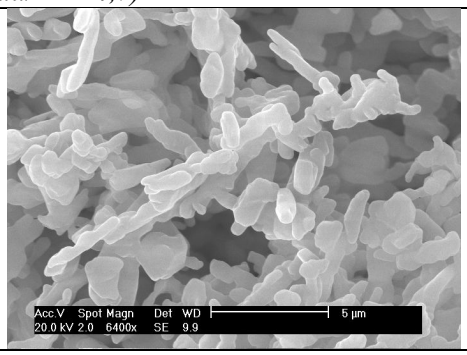
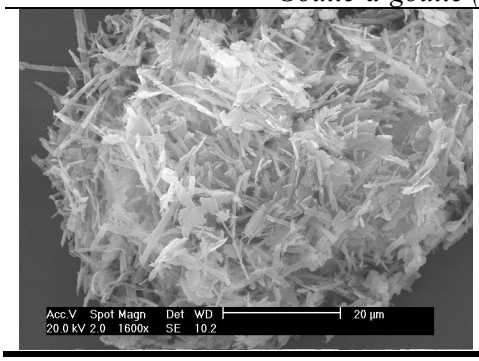
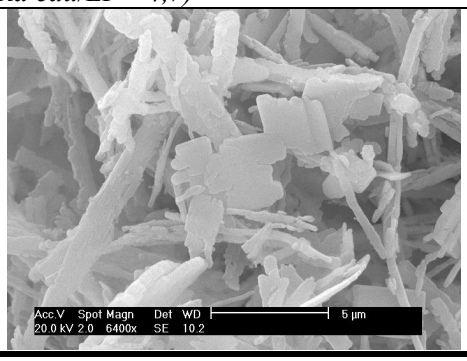


Figure 4.21. Influence du mode d'addition (rapide et goutte-à-goutte) sur la distribution de taille en volume des cristaux humides lavés.
(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra = 4,7 (R) et Ra = 4,6 (GG), N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes).

Ces résultats peuvent s'expliqués par des micro-mélanges différents. Dans notre dispositif, le macro-mélange est pauvre en comparaison avec le micro-mélange. Des sursaturations locales élevées sont donc générées en addition rapide. Ces dernières induisent une nucléation massive (temps d'induction estimés < 1 ms) : le système est à nouveau figé (Tableau 4.14 mode (R)) impliquant une teneur en LI élevée de l'ordre de 18 000 ppm. En mode (GG), les particules sont plus grosses (Tableau 4.14 mode (GG)). Deux faciès semblent avoir été générés : des plaquettes et des bâtonnets. Durant les 5 premières minutes, le macro-mélange est différent (<1 s). L'observation de la coulée nous a permis de voir que le solide se forme à chaque goutte introduite dans la cuve. Le solide nuclée moins massivement étant

donné les sursaturations plus faibles et grossit. La quantité de LI est nettement plus faible en mode GG (<1000 ppm) car le système évolue plus "tranquillement".

Tableau 4.14. Images MEB des cristaux obtenus en mode d'addition R et GG de la solution à 57 mg/g solution en absence d'ultrasons.

Images (1600x) **20 µm**	**Images (6400x)** **5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
Rapide (Ra eau/LI = 4,7)		
		18240
Goutte-à-goutte (Ra eau/LI = 4,7)		
		987

Des expériences identiques ont été menées en présence d'ultrasons. La différence entre les deux distributions (Figure 4.22) obtenues en modes (R) et (GG) avec ultrasons est beaucoup moins marquée que celle observée sans ultrasons (Figure 4.21).

En mode (GG) des cristaux plus petits et plus uniformes sont obtenus en comparaison avec ceux obtenus en absence d'ultrasons (Figure 4.22 et Tableau 4.15 (GG)). La nucléation est favorisée et la croissance inhibée. La teneur en LI de ces cristaux est analogue à celle obtenue sans ultrasons.

Les distributions de taille obtenues en mode (R) en présence et en absence d'ultrasons sont parfaitement identiques (Figure 4.21 et Figure 4.22). En revanche, les ultrasons permettent d'obtenir des cristaux de taille plus uniforme avec des faces mieux définies et de

diminuer la teneur résiduelle en LI (Tableau 4.14 et Tableau 4.15). Cette dernière est de l'ordre de 1 200 ppm avec ultrasons contre 18 000 ppm sans ultrasons. Les bulles de cavitations permettent de renouveler la surface des cristaux formés en éliminant le LI.

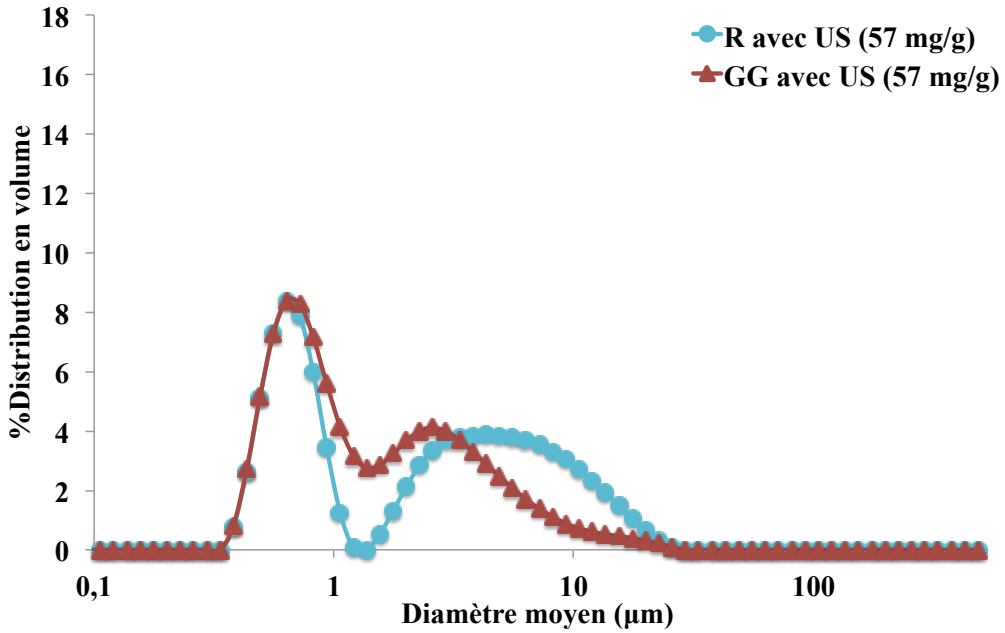
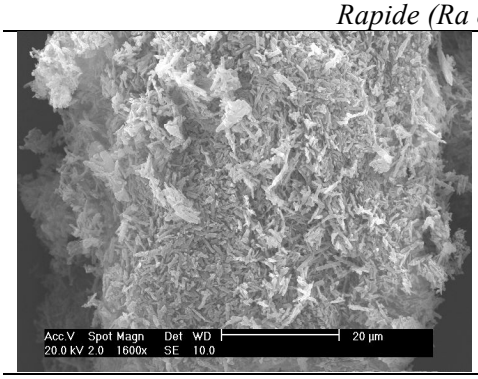
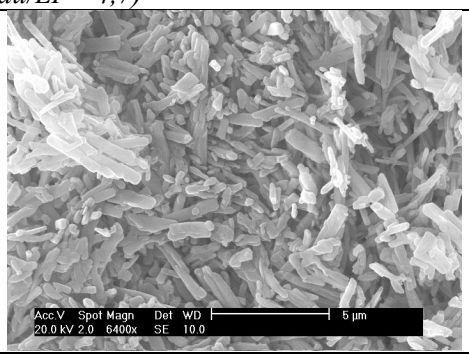
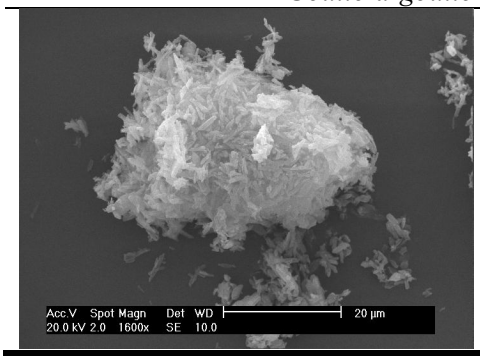
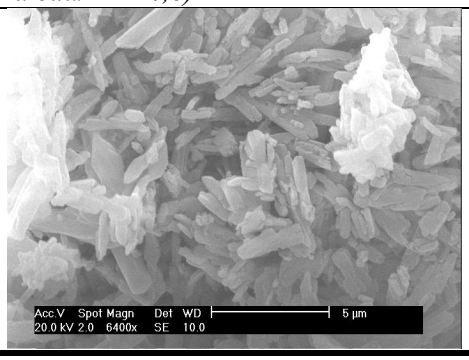


Figure 4.22. Influence du mode d'addition sur la distribution de taille de cristaux humides après lavage obtenus en présence d'ultrasons.

(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra = 4,7 (R) et Ra = 4,6 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes).

Des expériences en présence d'ultrasons sont également réalisées à partir de l'addition d'une solution à 159 mg/g solution (Ra eau/LI de l'ordre de 3-4). D'après les distributions de taille, nous pouvons observer une tendance contraire qu'à faible concentration : le mode d'addition (GG) en présence d'ultrasons favorise l'obtention des fines particules par rapport au mode (R) (Figure 4.23). En revanche, les microphotographies montrent de grosses particules et des fines. L'homogénéité obtenue auparavant à faible concentration n'est plus observée. Les ultrasons semblent ne plus avoir d'effet ni sur la distribution de taille ni sur la teneur en LI qui devient très élevée (Tableau 4.16).

Tableau 4.15. Images MEB des cristaux obtenus en mode d'addition R et GG de la solution à 57 mg/g solution en présence d'ultrasons.

Images (6400x) **5 µm** ▬▬		**Teneur en LI (ppm)**
Rapide (Ra eau/LI = 4,7)		
		1176
Goutte-à-goutte (Ra eau/LI = 4,6)		
		955

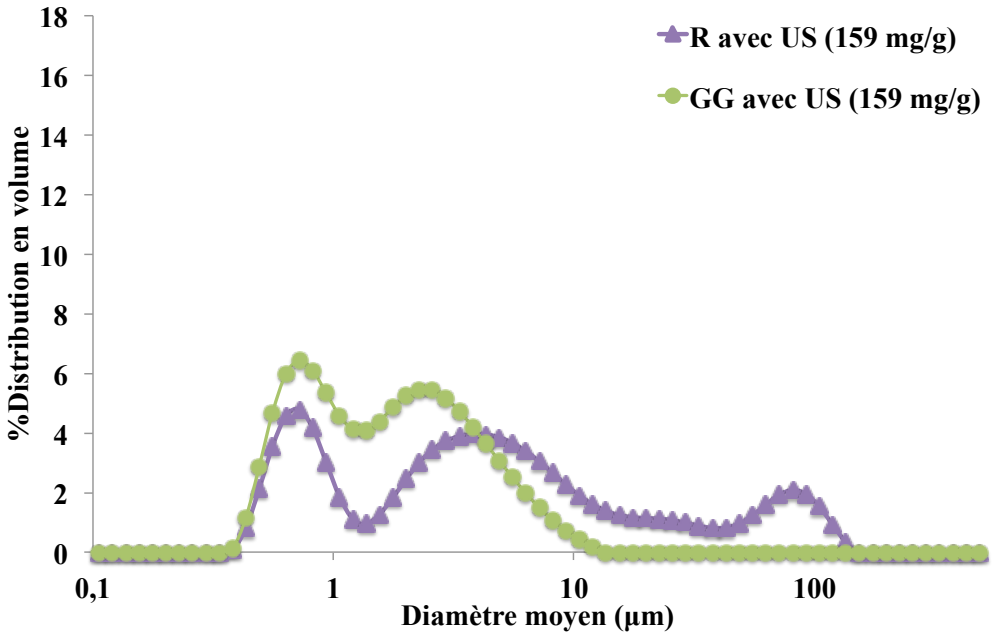
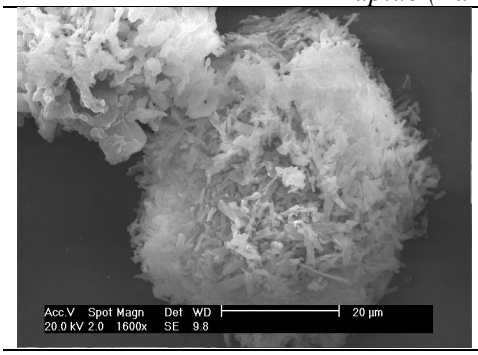
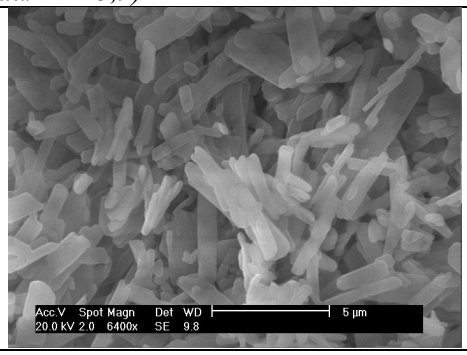
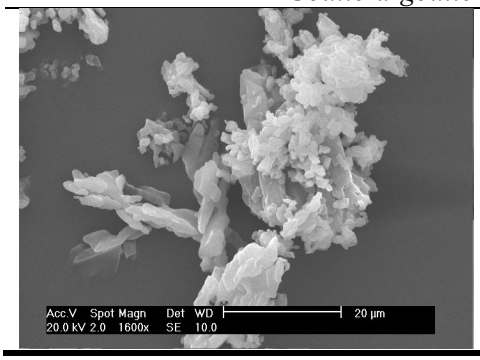
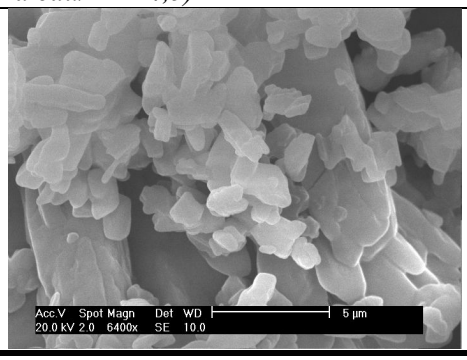


Figure 4.23. Influence du mode d'addition sur la distribution de taille des cristaux humides après lavage obtenus avec solution à 159 mg/g de solution en présence d'ultrasons. (Conditions : Ra eau/LI = 3,9 (R) et Ra eau/LI de 4,5 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes).

Tableau 4.16. Images MEB des cristaux obtenus avec différents modes d'addition de la solution à 159 mg/g solution en présence d'ultrasons.

Images (1600x) 20 µm	**Images (6400x)** 5 µm	**Teneur en LI (ppm)**
Rapide (Ra eau/LI = 3,9)		
		45 674
Goutte-à-goutte (Ra eau/LI = 4,5)		
		13273

4.5.2.2.2 Effet des ultrasons sur le mode d'addition rapide

D'après les résultats présentés dans la Figure 4.24 pour une phase organique ayant C*i* = 159 mg/g solution, ajoutée en mode (R) en absence d'ultrasons, un Ra eau/LI plus grand favorise l'agglomération des particules. En effet, avec un Ra de 3,7, le premier pic (< 1 µm) est déplacé vers de plus fines tailles. En présence d'ultrasons, des résultats inverses sont obtenus : de plus fines particules sont générées avec un Ra plus fort (Ra = 14,9). Quand le Ra augmente, la sursaturation augmente du fait de la diminution de la concentration à saturation impliquant ainsi une augmentation de la vitesse de nucléation (Tableau 4.17).

Dans le Tableau 4.18, on peut voir que la valeur de $\left(\frac{\varepsilon}{\upsilon}\right)^{\frac{1}{2}}$ diminue très légèrement en fonction de nos conditions opératoires en absence d'ultrasons. Globalement la vitesse d'agglomération va donc augmenter quand le Ra augmente (Tableau 4.17). Cette augmentation va donc induire une diminution du nombre de particules fines à fort Ra. Il est à

noter qu'il n'est pas possible d'estimer la constante de proportionnalité de la constante d'agglomération laminaire en présence d'ultrasons.

Ainsi, en mode d'addition rapide d'une solution à C*i* = 159 mg/g $_{solution}$, deux situations sont possibles pour différents Ra eau/LI (Tableau 4.17) :

a) en absence d'ultrasons, la formation des particules semble être plutôt gérée par l'hydrodynamique du mélange ;

b) en présence d'ultrasons, comme la taille moyenne diminue, l'agglomération et la croissance sont probablement inhibées par les ultrasons. Ils permettent de former une dispersion plus uniforme.

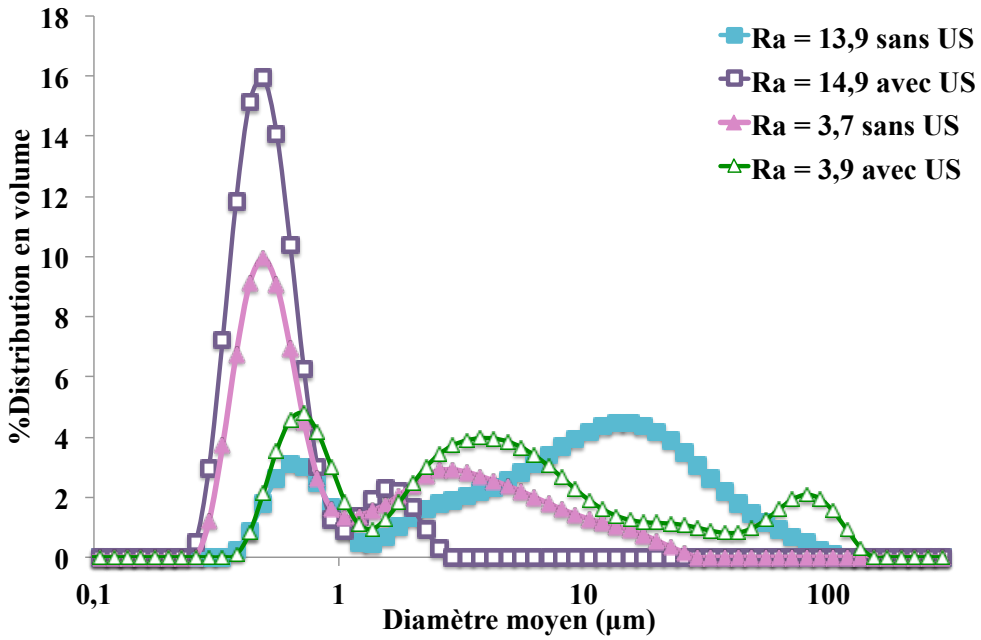


Figure 4.24. Influence des ultrasons sur la distribution de taille en volume des cristaux humides lavés obtenus à la concentration de 159 mg/g solution.
(Conditions opératoires : C_i = 159 mg/g solution; Ra eau/LI entre 3,7 et 14,9; N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

Tableau 4.17. Influence de l'augmentation du Ra eau/LI sur les cinétiques de cristallisation

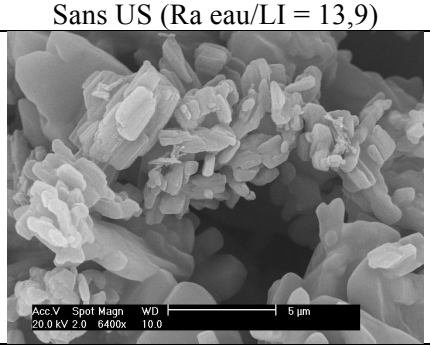
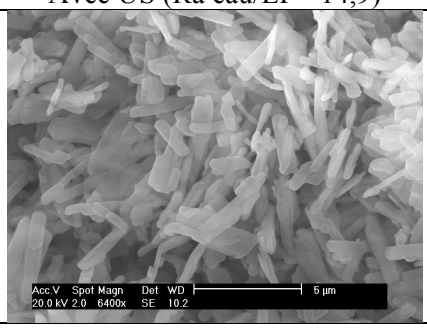
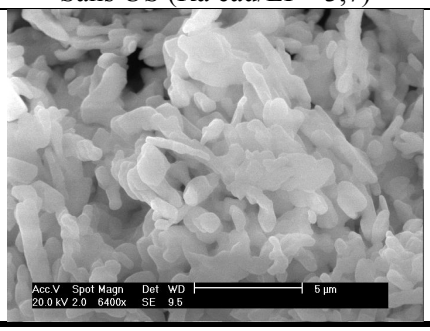
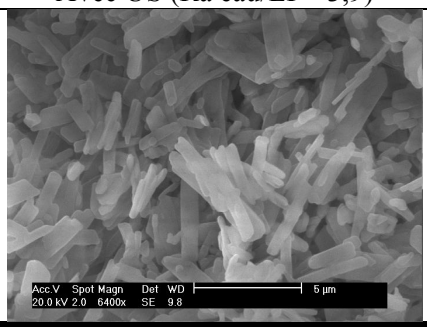
Ultrasons	Ra	C*	S	J	N	G	R_{agg}	Taille
non	↗	↘	↗	↗	↗	↗	↗ (cf nombres)	↗
oui	↗	↘	↗	↗↗	↗↗	?	?	↘

Tableau 4.18. Influence d'augmentation du Ra eau/LI sur la constante d'agglomération dans la cuve agitée en régime laminaire sans ultrasons.

Ra	μ (mPa.s)	ε (W/kg)	$\left(\frac{\varepsilon}{\upsilon}\right)^{\frac{1}{2}}$ $(J/kg/m^2)^{1/2}$
13,9	5	0,9	418
3,7	10	1,9	439

Les microphotographies présentées dans le Tableau 4.19 montrent que la taille et le faciès des particules semblent plus homogènes avec ultrasons. En revanche la teneur en LI est plus élevée en présence d'ultrasons.

Tableau 4.19. Images MEB des cristaux obtenus en rapide de la solution à 159 mg/g solution avec et sans ultrasons.

Images (6400x) 5 µm	**Teneur en LI (ppm)**	**Images (6400x) 5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
Sans US (Ra eau/LI = 13,9)		Avec US (Ra eau/LI = 14,9)	
	6920		29904
Sans US (Ra eau/LI = 3,7)		Avec US (Ra eau/LI = 3,9)	
	12055		45674

4.5.2.2.3 Effet des ultrasons sur le mode d'addition goutte-à-goutte

Influence du Ra eau/LI à concentration faible en soluté (57 mg/g)

Les résultats concernant les distributions de taille de cristaux lors d'addition (GG) avec et sans ultrasons sont comparés dans la Figure 4.25 : déplacement du premier pic inférieur au micron vers les plus faibles tailles. Nous pouvons voir que l'application d'ultrasons favorise la formation de fines particules, quel que soit le Ra eau/LI. Les microphotographies des essais avec différents Ra eau/LI sont présentées dans le Tableau 4.20. La formation des fines particules est légèrement favorisée par un plus grand Ra eau/LI. Comme décrit précédemment, l'application d'ultrasons augmente le taux de nucléation et peut inhiber la croissance et l'agglomération. Avec le Ra eau/LI de 13,1, le taux de nucléation est supérieur à celui avec Ra eau/LI de 4,6 et des petits cristaux sont formés en plus grand nombre. La teneur en LI à faible concentration est identique avec et sans ultrasons.

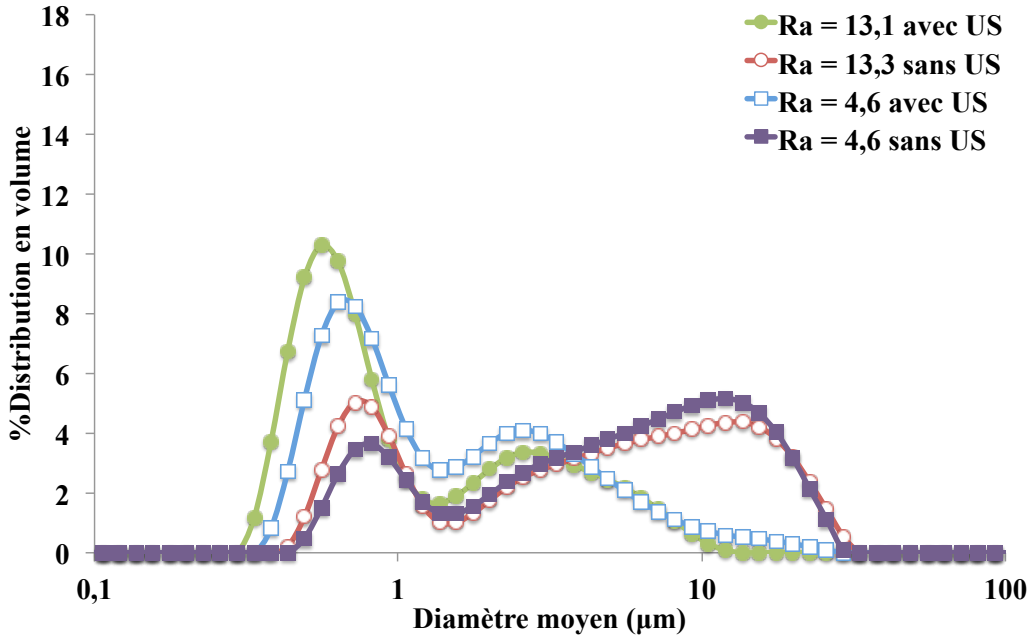
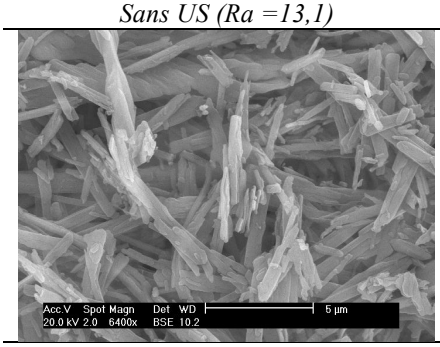
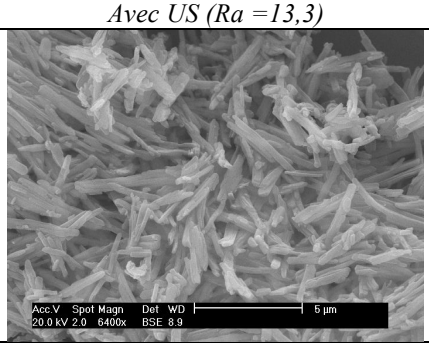
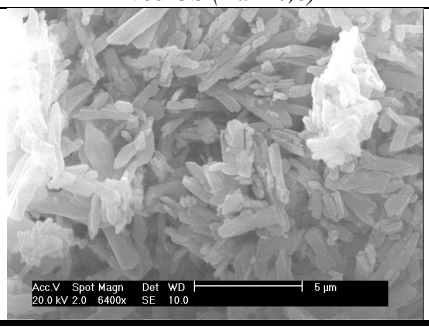


Figure 4.25. Influence des ultrasons sur la distribution de taille en volume de cristaux humides lavés obtenus à la concentration de 57 mg/g solution.
(Conditions opératoires : C_i = 57 mg/g solution; Ra eau/LI entre 4,6 et 13,3; N_v = 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes).

Tableau 4.20. Images MEB des cristaux obtenus en mode goutte-à-goutte de la solution à 57 mg/g de solution avec et sans ultrasons

Images (6400x) 5 µm	**Teneur en LI (ppm)**	**Images (6400x) 5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
Sans US (Ra =13,1)		*Avec US (Ra =13,3)*	
	984		933
Sans US (Ra =4,6)		*Avec US (Ra =4,6)*	
	1265		956

Influence de la puissance ultrasonore à faibles Ra eau/LI

Quatre essais ont été réalisés à quatre puissances dissipées avec un mode d'addition (GG) et une concentration initiale de 57 mg/g solution. Les distributions de taille en volume montrent que des cristaux plus fins sont formés en appliquant une puissance supérieure à 20 W. Avec une puissance de 10 W, nous pouvons observer un pourcentage plus élevé d'agglomérats. A 10 W, les particules élémentaires semblent plus petites et plus homogènes mais les arêtes des particules ne sont pas bien définies. A 40 W, un léger décalage vers des tailles plus importantes est observé. La teneur en LI donnée diminue quand la puissance dissipée augmente puis semble se stabiliser entre 30 et 40 W (Figure 4.26 et Tableau 4.21).

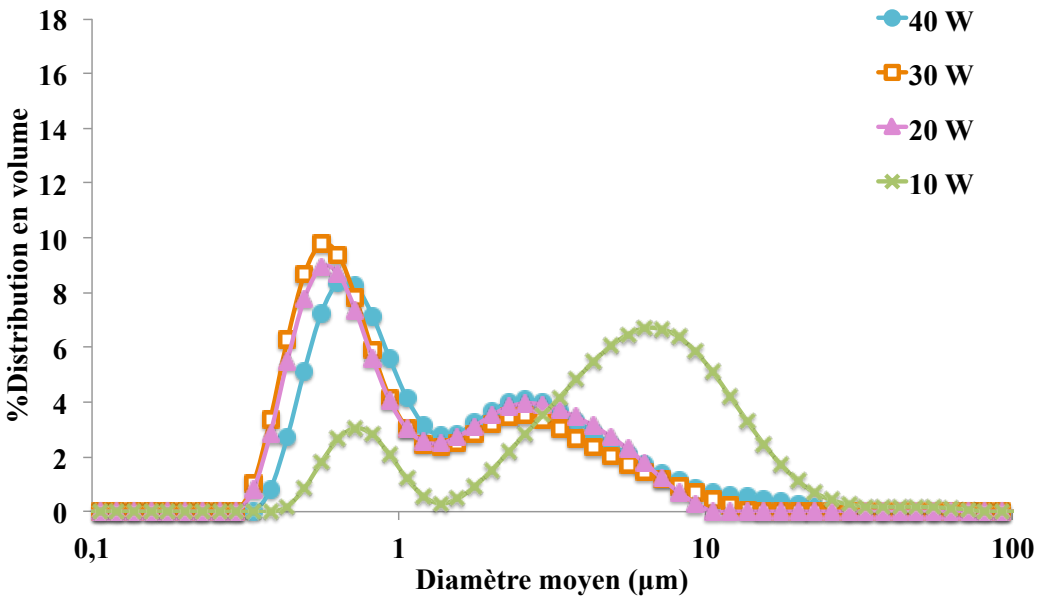
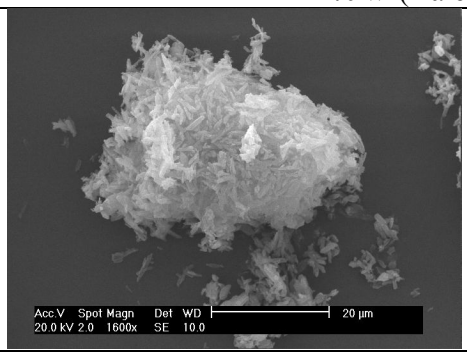
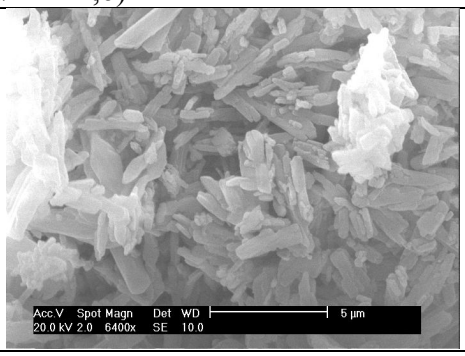
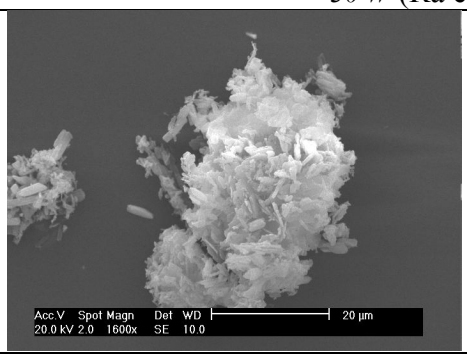
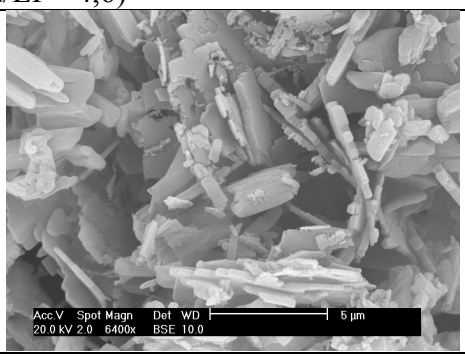
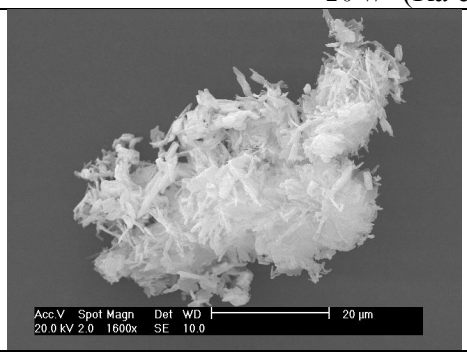
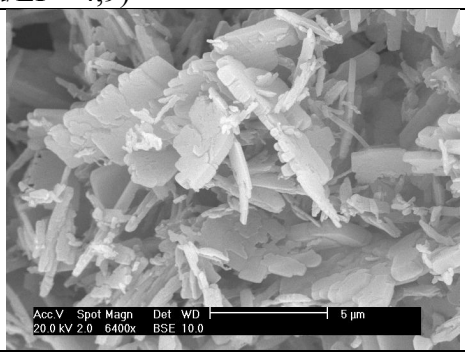
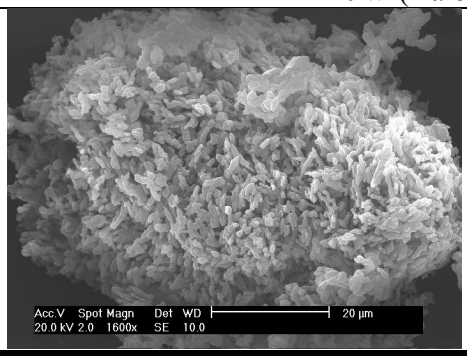
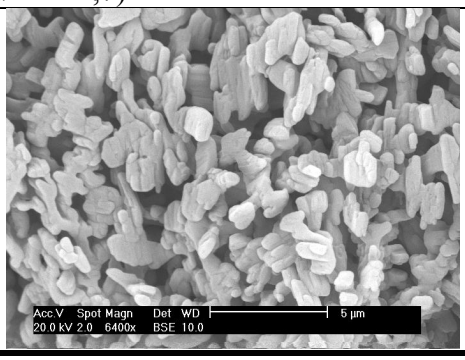


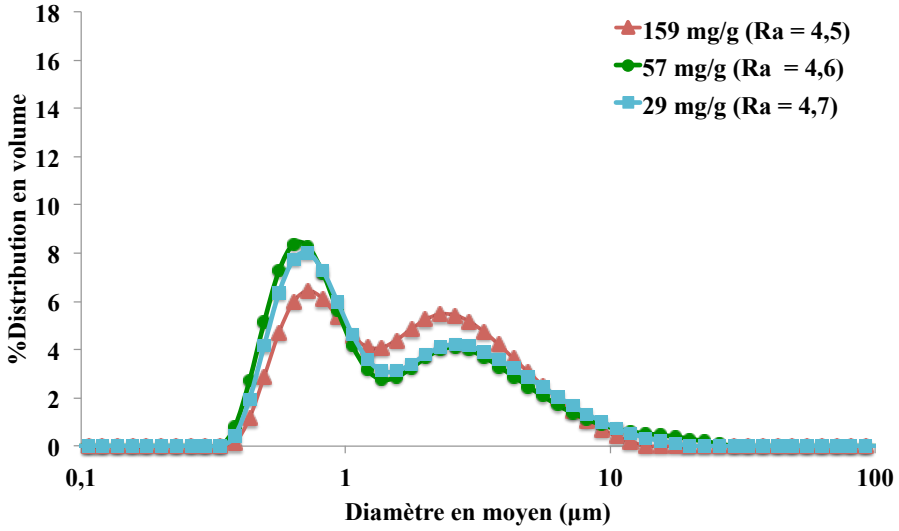
Figure 4.26. Influence de la puissance des US sur la distribution de taille de cristaux humides après lavage.
(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI entre 4,6 à 4,9; N_v = 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes).

Influence de la concentration à de faibles Ra eau/LI

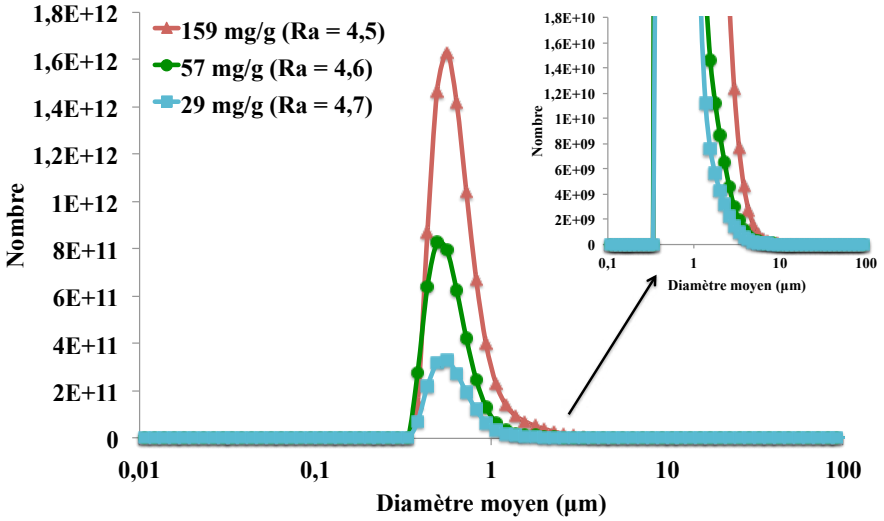
Pour des faibles Ra eau/LI, l'influence de la concentration de la solution sur la distribution de taille de cristaux est présentée dans la Figure 4.27. En volume, les distributions de taille sont similaires (Figure 4.27 (a)). Cependant, les distributions de taille en nombre indiquent des plus fines particules avec la solution à 159 mg/g de solution (Figure 4.27 (b)). Ces résultats sont confirmés par les images MEB (Tableau 4.22). La plus forte nucléation avec la solution de concentration plus élevée favorise la formation d'agglomérats plus petits. La teneur en LI diminue quand la concentration initiale diminue.

Tableau 4.21. Images MEB des cristaux obtenus en mode goutte-à-goutte avec différentes puissances d'ultrasons (Ra eau/LI de 4,6 à 4,9).

Images (1600x) **20 µm**	**Images (6400x)** **5 µm**	**Teneur en LI (ppm)**
40 W (Ra eau/LI = 4,6)		
		935
30 W (Ra eau/LI = 4,6)		
		904
20 W (Ra eau/LI = 4,9)		
		1414
10 W (Ra eau/LI = 4,7)		
		9517



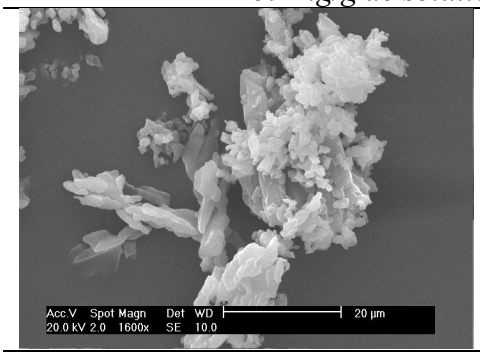
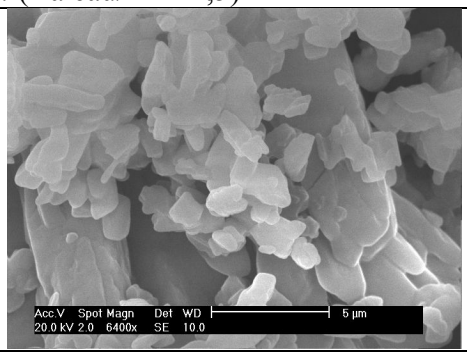
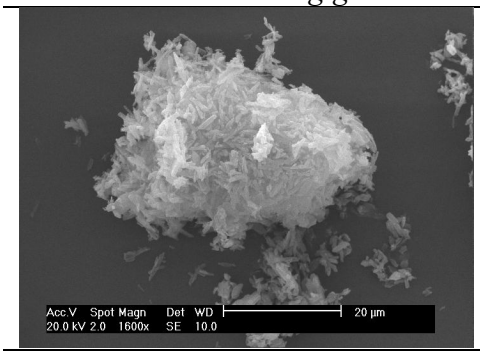
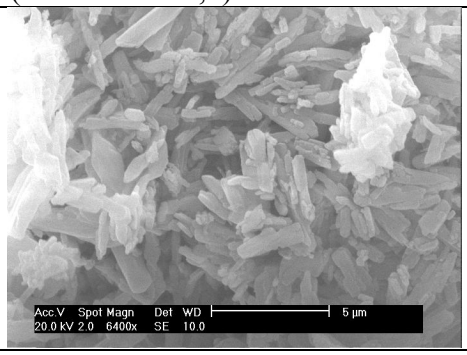
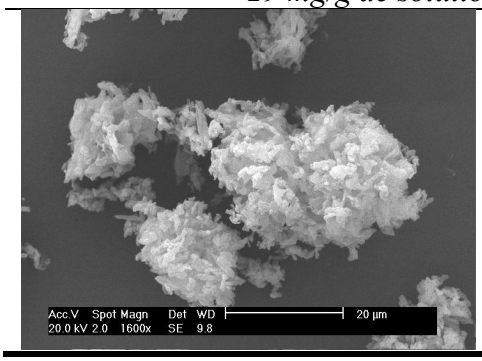
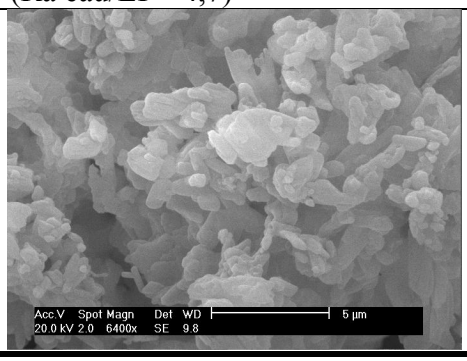
(a)



(b)

Figure 4.27. Influence de la concentration sur la distribution de taille en volume (a) et nombre (b) des cristaux humides après lavage.
(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra eau/LI entre 4,5 et 4,7; N_v = 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes).

Tableau 4.22. Images MEB des cristaux obtenus en mode goutte-à-goutte en présence d'ultrasons avec différentes concentrations (Ra eau/LI de 4,5 à 4,7).

Images (1600x) **20 µm** ———	**Images (6400x)** **5 µm** ———	**Teneur en LI (ppm)**
159 mg/g de solution (Ra eau/LI = 4,5)		
		13273
57 mg/g de solution (Ra eau/LI = 4,6)		
		955
29 mg/g de solution (Ra eau/LI = 4,7)		
		887

4.6 Caractérisation des cristaux secs

Les résultats de la caractérisation de cristaux secs (diamètre moyen, l'angle de contact, images MEB, rendement, pureté et teneur en LI pour chaque essai) sont regroupés dans l'Annexe 1.

4.6.1 *Granulométrie du solide sec*

Les tailles moyennes du solide sec ($D_{4,3}$ et $D_{3,2}$) ne varient pas de manière remarquable en fonction des paramètres opératoires étudiés, bien qu'ils soient plus petits que ceux de la molécule LASSBio-294 originale.

4.6.2 *Rendement et pureté*

Des rendements en solide supérieur à 73% sont obtenus. Les principales pertes se produisent dans la cuve agitée (solides collés aux parois ou au mobile d'agitation). La pureté de ces cristaux (teneur en LASSBio-294) varie entre 81,84 ± 0,01 % et 104,47 ± 0,36 %.

4.6.3 *Angle de contact et teneur résiduelle en LI*

Les valeurs d'angle de contact et de la teneur résiduelle en LI pour les cristaux secs obtenus lors des essais réalisés en utilisant le pré-mélangeur Roughton sont présentées dans le Tableau 4.23. Celles obtenues pour les échantillons produits sans pré-mélangeur avec et sans ultrasons sont présentées dans le Tableau 4.24 et le Tableau 4.25. Les valeurs d'angle de contact varient énormément. Parfois, elles sont similaires à celle du LASSBio-294 initial (132,08 ± 0,79°), parfois elles sont très inférieurs et parfois même supérieures.

La mesure de l'angle de contact permet de vérifier des changements de propriétés de surface. Toutefois, dans notre cas, la réduction semble ne pas être liée seulement à l'augmentation de la mouillabilité dans l'eau ou à la modification des propriétés de surface, mais également à la concentration de LI dans le solide. Par exemple, de très faibles valeurs d'angle de contact comme 7,91 ± 0,01 et 8,82° ± 1,78 sont obtenues. La première valeur se réfère à l'échantillon obtenu avec un additif (HPMC à 0,5%). La deuxième valeur est mesurée pour l'échantillon sans additif (l'essai de référence avec pré-mélangeur), où une teneur élevée de LI résiduel (23644 ppm) a été trouvée dans le solide. Cependant, cette réduction de l'angle de contact n'est pas proportionnelle à la quantité de LI comme le montre le résultat obtenu pour le solide contenant une teneur résiduelle de 41878 ppm de LI (essai réalisé à 400 tours/min avec pré-mélangeur) : l'angle de contact mesuré est de 74,79° ± 2,88.

Tableau 4.23. Résultats de mesures d'angle de contact et concentration de LI (ppm) pour les échantillons obtenus en utilisant un pré-mélangeur.

Essai	***Produits***	***Angle de contact (°)***	***Concentration de LI dans le solide (ppm)***
	LASSBio-294 initial	132,08 ± 0,79	0
1	Référence	8,82 ± 1,78 Adsorption rapide	23644
2	Type T	78,02 ± 3,41 Adsorption rapide	19470
3	600 tours/min	123,29 ± 3,70	2241
4	400 tours/min	74,79 ± 2,88 Très chargé	41878
5	91 mg/g	105,35 ± 0,70 Adsorption rapide	4291
6	57 mg/g	120,45 ± 1,20 Adsorption rapide	2708
7	9,5	99,97 ± 1,09 Adsorption rapide	6642
8	6,5	142,33 Mauvais mouillage les particules recouvrent la goutte	6000
9	HPMC 0,1%	111,4 ± 1,27	1783
10	Poloxamer 407 0,1%	10,23 ± 0,25	734
11	Tween 20 0,1%	12,01 ± 0,01	965
12	Tween 20 0,5%	7,91 ± 0,01 Adsorption rapide	978

Tableau 4.24. Résultats de mesures d'angle de contact et concentration de LI (ppm) pour les échantillons obtenus sans pré-mélangeur et sans ultrasons.

Essai	***Produits***	***Concentration initiale*** ($mg/g_{solution}$)	***Angle de contact (°)***	***Teneur en LI (ppm)***
	LASSBio-294 originale	-	132,08 ± 0,79	-
13	R, Ra = 13,9	159	89,96 ± 2,6 Adsorption rapide	6920
14	R, Ra = 3,7	159	118,45 ± 2,46	12055
15	R, Ra = 4,7	57	81,12 ± 0,02 Mais recouvrement	18240
16	GG, Ra = 13,3	57	146,80 ± 0,37	1265
17	GG, Ra = 4,6	57	133,73 ± 0,86	984

Tableau 4.25. Résultats de mesures d'angle de contact et concentration de LI (ppm) pour les échantillons obtenus sans pré-mélangeur et avec ultrasons.

Essai	***Produits***	***Concentration initiale*** ($mg/g_{solution}$)	***Angle de contact (°)***	***Teneur en LI (ppm)***
	LASSBio-294 originale	-	132,08 ± 0,79	
18	R, Ra = 14,9	159	75,76 ± 3,41	27019
19	R, Ra = 3,9	159	101,00 ± 0,61	45674
20	R, Ra = 4,7	57	118,45 ± 2,46	12055
21	GG, Ra = 13,1	57	137,50 ± 0,46	1176
22	GG, Ra = 4,6	57	Pas de mouillage les particules se collent à la goutte	956
23	GG, Ra = 4,5	159	107,39 ± 3,68	13273
24	GG, Ra = 4,7	29	133,71 ± 0,89	887
25	GG, Ra = 4,6 (30 W)	57	140,43 ± 0,72	904
26	GG, Ra = 4,9 (20 W)	57	133,27 ± 0,47	1415
27	GG, Ra = 4,7 (10 W)	57	124,29 ± 0,87	9517

4.6.4 *Diffraction de rayons X*

L'ensemble des diffractogrammes est présenté dans l'Annexe 2. Les résultats indiquent des changements des intensités de pics, principalement, pour les pics à 24,59; 25,19 et 26.54 en 2θ. A titre d'exemple, nous rassemblons dans la Figure 4.28, les diffractogrammes des cristaux secs générés à partir de différentes concentrations du LASSBio-294 en solution. Les différences observées peuvent être dues à un changement d'orientation des cristaux, à un changement de faciès mais aussi à la réduction de leur taille.

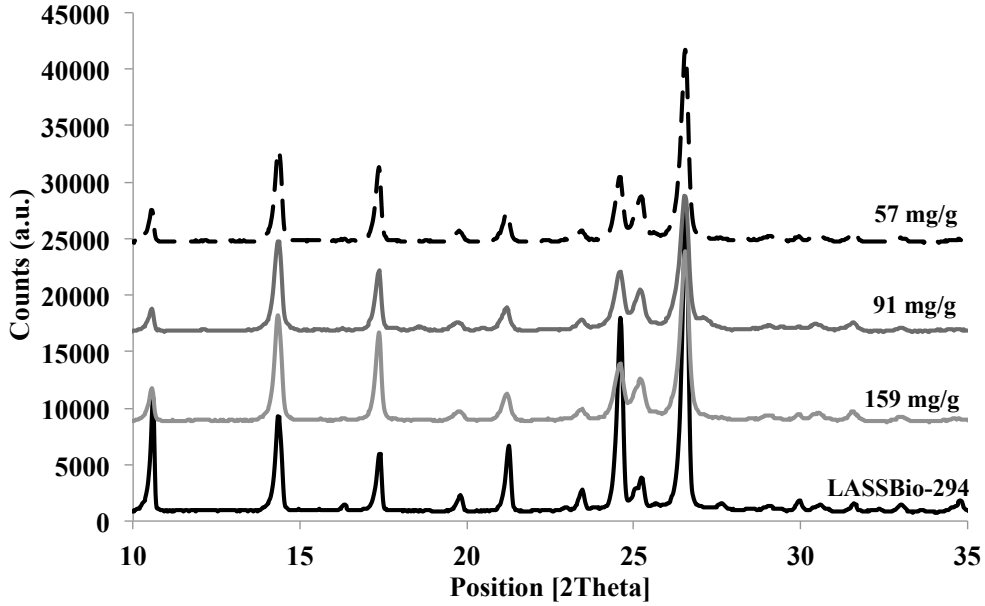


Figure 4.28. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous sa forme initiale et recristallisé à partir de différentes concentrations initiales de la molécule dans la phase organique.
(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; Ra 12,5 (Ci = 57 mg/g solution), Ra 13 (Ci = 91 mg/g solution) et Ra 13,7 (Ci = 159 mg/g solution), N_v = 800 tours/min, temps d'essai de 30 minutes).

4.7 Optimisation du processus de lavage des cristaux

Au cours des synthèses, nous avons constaté que le faciès des cristaux était fortement influencé par la teneur en LI. Nous avons donc décidé de modifier le protocole de lavage.

4.7.1 *Protocole*

Deux nouvelles méthodes de lavage des cristaux humides ont été testées afin de réduire la quantité de solvant résiduel dans les cristaux secs.

Dans les deux cas, le processus est réalisé en quatre étapes avec une masse totale de 1000 g d'eau. Dans la première méthode, 250 g d'eau est ajouté directement au système de filtration et les cristaux sont mélangés avec l'eau de lavage. Une fois la filtration finie, 250 g d'eau est ajoutée à nouveau, puis deux fois encore. Dans la deuxième méthode, le mélange des cristaux humides avec l'eau de lavage (250 g) est maintenu sous agitation magnétique pendant 10 minutes. Ensuite, cette suspension est filtrée et les cristaux humides sont à nouveau mélangés avec l'eau de lavage, et la procédure est répétée.

Pour cette étude, l'essai est réalisé en mode d'addition rapide pour Ci = 57 $mg/g_{solution}$ (Ra = 4,7) sans ultrasons est répété deux fois (Essai 15). Ce choix est dû à la forte concentration en LI trouvé dans ce solide, soit 18240 ppm après un lavage avec 500 g d'eau.

4.7.2 *Résultats et discussion*

L'analyse de la concentration en LI dans le solide par chromatographie ionique, nous a permis de voir que les deux méthodes de lavage sont efficaces et analogues. Des concentrations plus faibles de LI sont trouvées : 1503 ppm (Méthode 1) et 2656 ppm (Méthode 2).

De plus, les images MEB indiquent que le faciès des cristaux peut être modifié par le lavage (Tableau 4.26). Ce lavage permet d'éliminer le "gel" formé à la surface des cristaux par une nucléation massive à la surface des agrégats de fluide. Ce type de gel a déjà été observé lors de la mesure de solubilité d'une molécule organique dans un LI (Viçosa et al. 2012).

Les analyses DSC montrent très clairement que le mode de lavage a une influence sur le point de fusion du LASSBio-294 (Tableau 4.27). Après un lavage normal, nous avons une température et une enthalpie de fusion respectivement égale à 202 °C et à 102,8 J/g, alors que, dans le cas du nouveau lavage, on obtient une température de fusion de 206 °C et une enthalpie de fusion de l'ordre de 120 J/g. Après lavage, la température et l'enthalpie de fusion sont voisines de celles mesurées pour le solide initial (205,9 °C et à 122,9 J/g).

De façon similaire, des changements sont observés sur les diffractogrammes (Figure 4.29). Le pic à 10° disparaît et de nouveaux pics apparaissent entre 17 et 20°.

Tableau 4.26. Images MEB des cristaux considérant différentes méthodes de lavage.

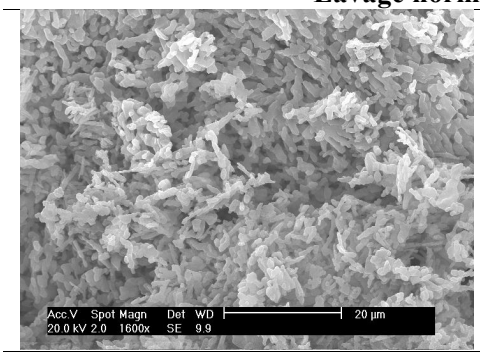
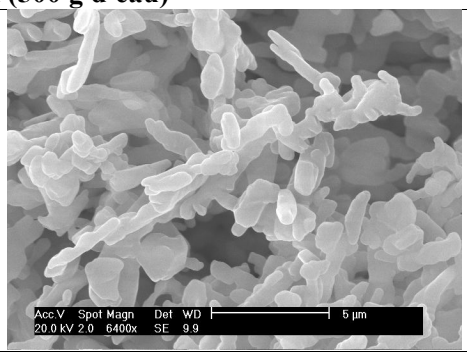
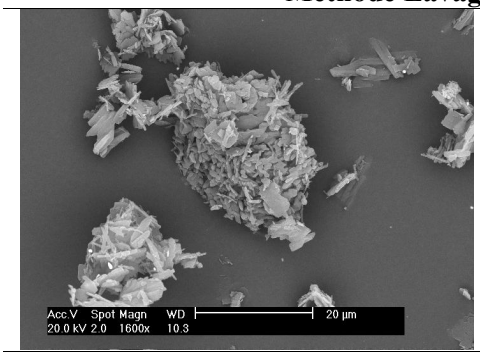
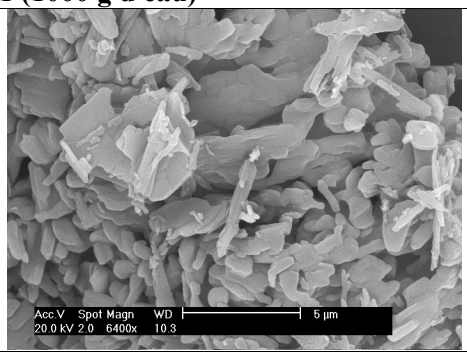
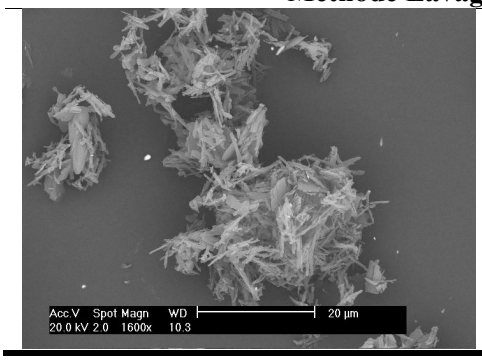
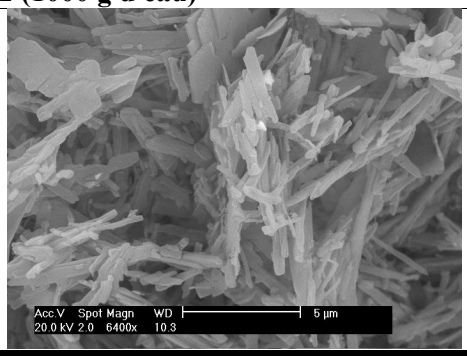
Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Teneur en LI (ppm)
Lavage normal (500 g d'eau)		
		**18240**
Méthode Lavage 1 (1000 g d'eau)		
		**1503**
Méthode Lavage 2 (1000 g d'eau)		
		**2656**

Tableau 4.27. Résultats DSC des cristaux considérant différentes méthodes de lavage.

Lavage	Masse (mg)	Tf (°C)	ΔH (J/g)	Perte en masse après analyse %
Normal	2,9620	202,69	102,8	3,13
Méthode 1	3,1510	206,98	126,4	2,34
Méthode 2	2,3250	206,47	120,2	5,76

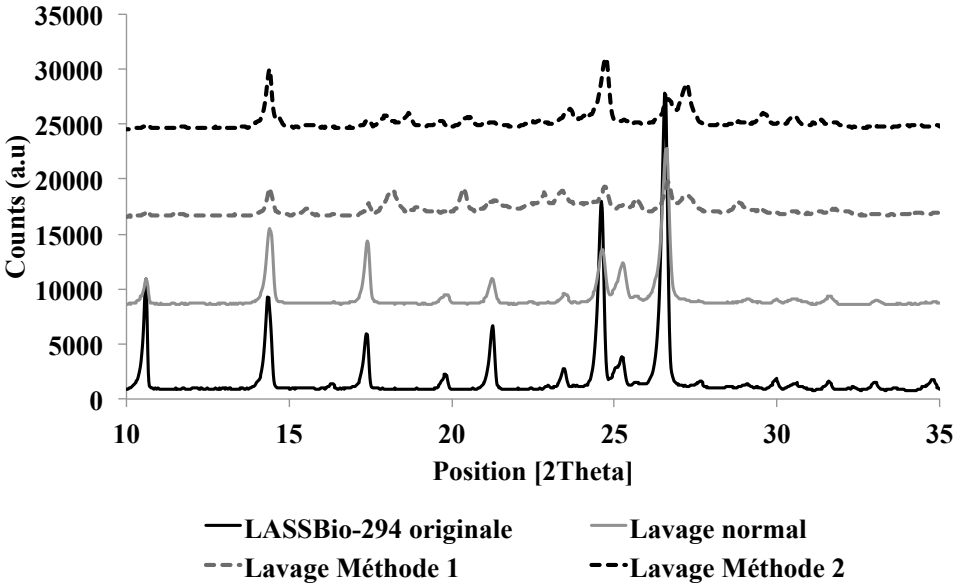


Figure 4.29. Diffractogrammes des cristaux considérant différentes méthodes de lavage.

4.8 Optimisation du procédé de séchage des cristaux

4.8.1 *Protocole*

Afin de réduire l'agglomération pendant le séchage, quatre essais sans pré-mélangeur sont reproduits et les cristaux sont séchés par atomisation ("spray drying"). Il s'agit des essais avec une concentration initiale de 57 mg/ solution en mode R et GG en absence et présence d'ultrasons (Essais de nombre : 15; 16; 20 et 22).

Après le processus de lavage, les cristaux obtenus sont re-dispersés dans de l'eau pure. La nouvelle suspension est introduite dans l'atomiseur (Büchi Mini Spray-dryer B-290, Suisse) par une pompe péristaltique. La température d'entrée est maintenue à 110 °C et le débit est de 2 g de suspension/min. La température de sortie (l'air humide +cristaux) est de 90 ± 5 °C. Les étapes du séchage sont illustrées dans la Figure 4.30.

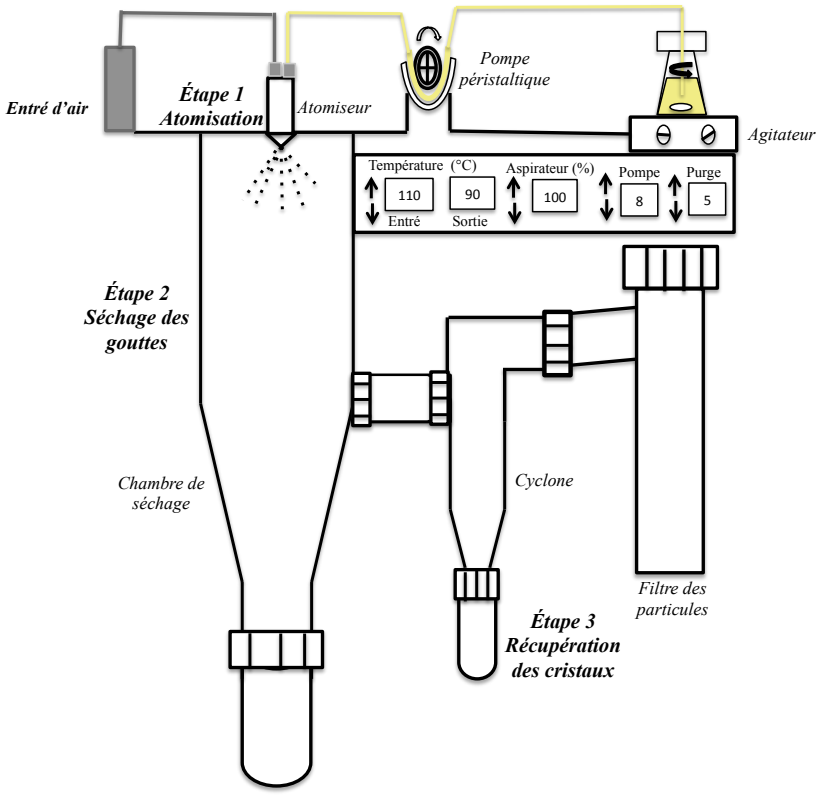


Figure 4.30. Les principales étapes du processus de séchage par atomisation.

4.8.2 *Résultats et discussion*

Les images MEB présentées dans le Figure 4.28 et le Tableau 4.29 indiquent que les agglomérats formés en mode R avec et sans ultrasons et séchés par atomisation sont plus petits que ceux obtenus après séchage en étuve. En mode GG cette différence est visible pour les cristaux obtenus en absence d'ultrasons (Tableau 4.29).

Dans un souci de faciliter l'analyse, les résultats de caractérisation des cristaux secs (diamètre moyen, teneur LI et surface spécifique) obtenus avec les deux modes de séchage sont regroupés dans le Tableau 4.30. Les valeurs de diamètre moyenne du solide sec ($D_{4,3}$ et D_{32}) diminuent avec le séchage par atomisation et la surface spécifique augmente.

Le problème de l'agglomération des cristaux a deux origines : la synthèse dans la cuve agitée et le séchage en étuve. Lors du séchage en étuve, les tailles moyennes du solide sec ne varient pas de manière remarquable en fonction des paramètres opératoires étudiés. La réduction de l'agglomération observée avec le séchage par atomisation démontre l'importance de l'étape de séchage.

Nous pouvons également constater que la teneur en LI n'évolue pas avant et après séchage par atomisation pour tous les échantillons, sauf pour les cristaux synthétisés en mode d'addition rapide sans ultrasons (Tableau 4.30). Pour ce dernier, la teneur passe de 18240 à 1319 ppm. Cette diminution peut s'expliquer par une dégradation lors du séchage à 110 °C. En effet lorsque les cristaux sont mis en suspension dans l'eau, le LI migre dans l'eau et lors de l'atomisation, la brutale évaporation de l'eau peut entraîner sa dégradation.

Tableau 4.28. Effet su mode de séchage (étuve et atomisation) sur les images MEB des cristaux obtenus en mode R.

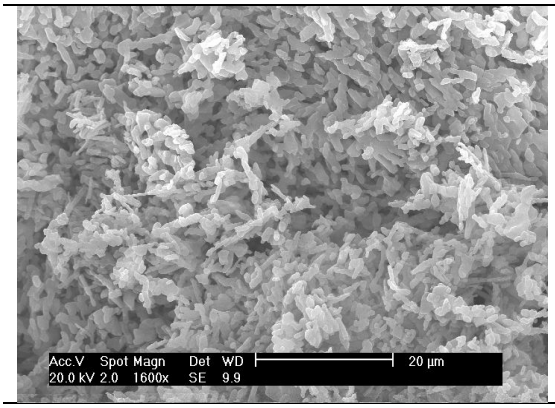
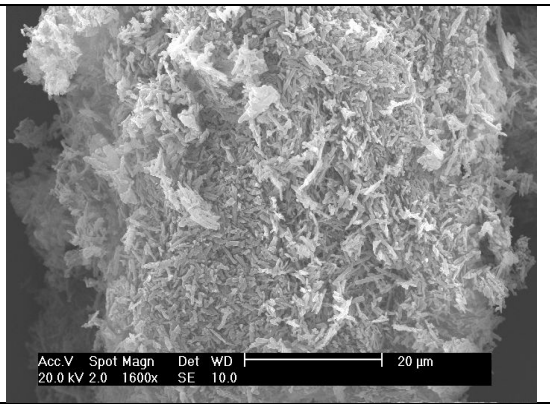
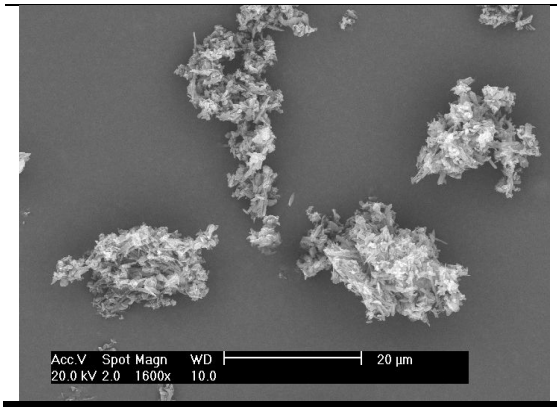
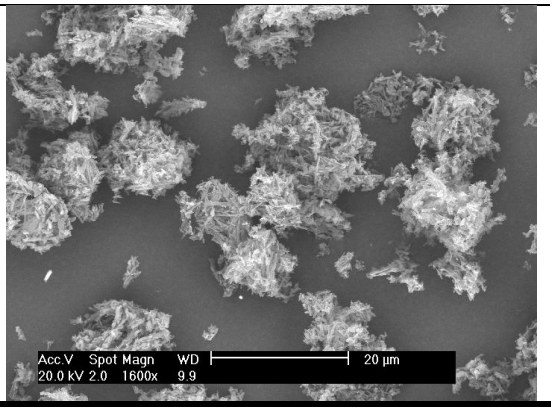
Images 20 µm ——— (1600x)	
Rapide, séchage en étuve	
Sans US	***Avec US***
	
Rapide, séchage par atomisation	
Sans US	***Avec US***
	

Tableau 4.29. Effet su mode de séchage (étuve et atomisation) sur les images MEB des cristaux obtenus en mode GG.

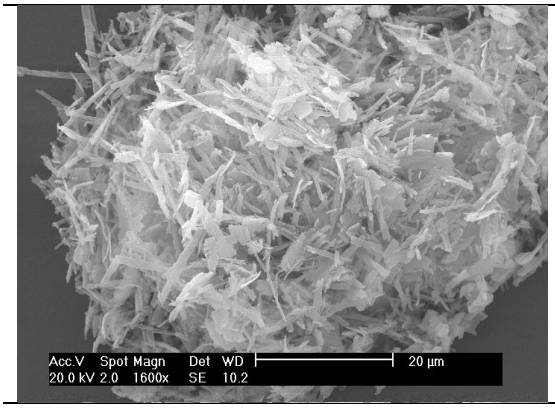
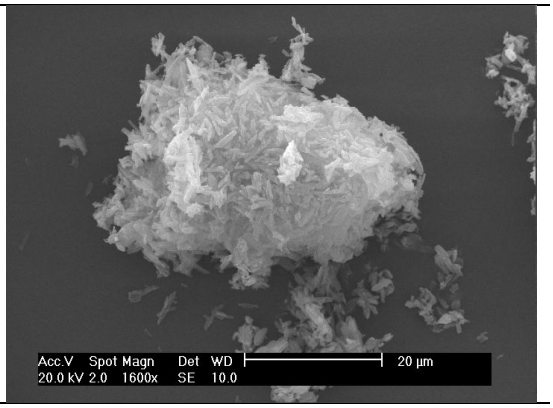
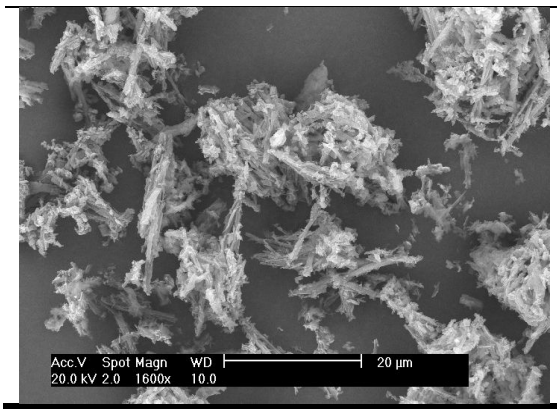
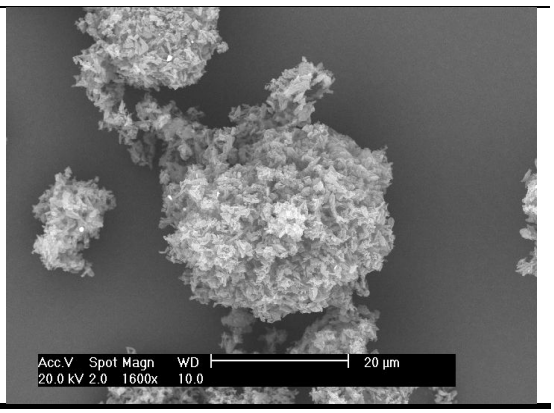
Images 20 µm ——— (1600x)	
Goutte-à-goutte, séchage en étuve	
Sans US	***Avec US***
	
Goutte-à-goutte, séchage par atomisation	
Sans US	***Avec US***
	

Tableau 4.30. Caractéristiques des cristaux secs obtenus avec le séchage par atomisation et étuve.

	Séchage en étuve				**Séchage par atomisation**			
Mode d'addition	**D4,3 (µm)**	**D3,2 (µm)**	**Teneur en LI (ppm)**	**Surface spécifique (m^2/g)**	**D4,3 (µm)**	**D3,2 (µm)**	**Teneur en LI (ppm)**	**Surface spécifique (m^2/g)**
R sans US	6,5	2,7	18240	1,30 ± 0,02	4,8	1,5	1319	7,40 ± 0,09
R avec US	7,0	2,1	1176	3,45 ± 0,03	4,2	1,3	1185	7,53 ± 0,06
GG sans US	9,5	3,1	1265	1,13 ± 0,08	4,6	1,7	1100	2,72 ± 0,14
GG avec US	11,0	2,6	956	3,12 ± 0,03	3,6	1,4	785	5,78 ± 0,06

R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

4.9 Conclusions

La cristallisation par effet anti-solvant du LASSBio-294 en utilisant le [emim][$CH_3O(H)PO_2$] comme solvant et l'eau comme anti-solvant est présentée dans ce chapitre. Deux modes de mélange (fermé et semi-fermé) de la phase organique avec la phase aqueuse sont étudiés pour évaluer l'influence des conditions de mélange sous la formation des cristaux. En mode fermé, les deux phases sont mélangées avec et sans un pré-mélangeur. En mode semi-fermé, les essais sont effectués avec l'addition goutte-à-goutte de la solution organique dans l'anti-solvant.

Nous avons vu que la formation des cristaux est influencée par le mélange, la sursaturation, les mécanismes de cristallisation (nucléation, croissance, agglomération). Ces différents paramètres opératoires les affectant sont énoncés dans la Figure 4.31.

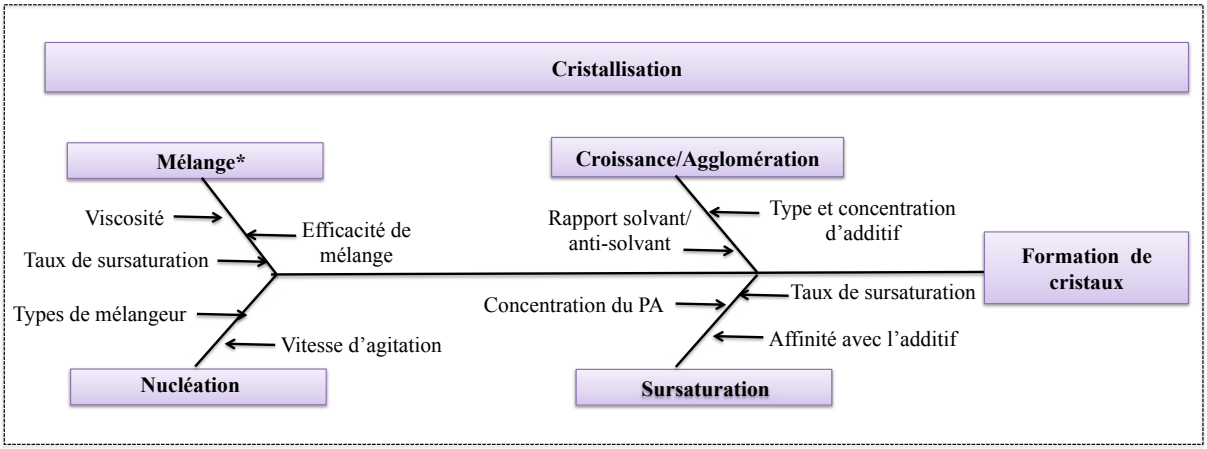


Figure 4.31 Illustration des facteurs qui affectant le processus de cristallisation.

Les essais sans pré-mélangeur sont réalisés en présence et en absence des ultrasons.

Les propriétés choisies pour l'étude des paramètres opératoires sont la distribution de taille des cristaux humides, les images MEB et la teneur en LI.

La recristallisation par effet anti-solvant a permis d'obtenir des cristaux plus petits de même structure cristalline que le solide initial. Cependant ces cristaux sont très agglomérés et leurs distributions de taille présentent au moins deux populations. L'estimation des temps de mélange et temps d'induction par des corrélations montre que les conditions hydrodynamiques du mélange contrôlent la formation des cristaux. Pour chaque paramètre opératoire, un mécanisme de formation est proposé. Un phénomène de "gélation" est observé

pour des sursaturations élevées. En effet le système semble se figer. Dans ces cas là, des structures sans arêtes définies et riches en LI sont observées.

Avec pré-mélangeur, différentes expériences sont réalisées pour étudier l'influence des paramètres opératoires sur la formation des cristaux (type de mélangeur, vitesse d'agitation, concentration initiale, rapport massique eau/LI, additifs). Les distributions de taille en volume de cristaux humides présentent toutes au moins deux pics : un premier pic, inférieur à 1 μm et, un deuxième pic entre 12 et 100 μm. Le premier pic semble avoir toujours la même largeur, seule son intensité varie excepté pour les expériences avec additifs. Le premier pic pourrait donc être attribué aux particules élémentaires formées dans le pré-mélangeur et les autres pics aux particules agglomérées formées principalement dans la cuve agitée. Cela signifie que la cristallisation n'est pas terminée à la sortie du pré-mélangeur et continue dans la cuve agitée. Le type de pré-mélangeur n'influence pas la formation des cristaux. Des agglomérats plus petits sont formés avec une vitesse d'agitation plus élevée, ou une concentration plus faible en soluté ou un rapport massique eau/LI plus élevé : augmentation de la sursaturation.

En présence d'additifs, des agglomérats plus petits sont créés en présence de Tween 20. Ce dernier pourrait former des liaisons hydrogène avec les groupements fonctionnels de la surface des particules du LASSBio-294 ou une barrière mécanique qui favoriserait la diminution du taux d'agglomération.

Une teneur élevée en LI (> 5 000 ppm) est obtenue à forte concentration de la solution organique (159 mg/g). Cette teneur est plus faible en présence d'additif.

Sans pré-mélangeur, des essais en mode addition goutte-à-goutte (GG) et addition rapide (R) sont conduits avec et sans ultrasons. Le mode GG en mode silencieux conduit à des cristaux de taille plus importante. L'influence de la concentration de la phase organique, et des ultrasons est étudiée. A concentration moyenne (57 mg/g), les cristaux obtenus en présence d'ultrasons sont plus petits et plus homogènes en terme de faciès que sans ultrasons. La teneur en LI est aussi plus faible en présence d'ultrasons. A concentration plus élevée (159 mg/g), les ultrasons ne semblent plus avoir d'effet ni sur la taille, ni sur la teneur en LI. On peut conclure qu'avec ultrasons ou sans ultrasons mais à concentration élevée, la formation du solide est contrôlée par le mélange. Les ultrasons ont un effet promoteur sur le mélange (dispersion de la solution organique dans l'eau) et sur la nucléation et un effet inhibiteur sur la croissance et l'agglomération. Une puissance minimale de 20 W semble cependant nécessaire.

La teneur en LI peut être diminuée en modifiant les conditions de lavage. Les structures riches en LI lavées avec une quantité plus importante d'eau se transforment en agglomérats de particules mieux définies. Les structures gélifiées seront donc constituées de cristaux et d'un gel riche en LI et en soluté.

L'agglomération observée sur les images a deux origines : la synthèse dans la cuve agitée et le séchage en étuve. Lors du séchage en étuve, l'agglomération des « agglomérats » issus de la cristallisation implique que les tailles moyennes du solide sec ne varient pas entre tous les essais. Un séchage par atomisation est testé pour tenter de réduire cette deuxième agglomération. Les résultats montrent que les agglomérats formés en mode R avec et sans ultrasons sont plus petits que ceux obtenus en étuve. En mode GG cette différence est plus visible pour les cristaux obtenus en absence d'ultrasons.

Chapitre 5 : Propriétés de dissolution des cristaux synthétisés

5.1 Introduction

La cristallisation menée dans ce travail est une opération durant laquelle un changement de phase se développe et une phase solide cristalline se forme à partir d'une solution. Elle permet de fabriquer des cristaux dont les propriétés telles que la morphologie, la structure cristalline (polymorphes), la taille moyenne ou encore la distribution de tailles conditionnent la vitesse de dissolution in vivo des médicaments, ou biodisponibilité, et donc de ce fait l'effet du principe actif dans l'organisme.

Nous venons d'exposer dans le Chapitre 4 l'ensemble des résultats concernant l'étude du procédé de cristallisation par effet anti-solvant du LASSBio-294 dans des conditions opératoires différentes, ce qui peut influencer notoirement le comportement de dissolution de ce PA. Dans ce chapitre, le travail s'est focalisé autour d'une étude de dissolution in vitro des cristaux obtenus dans certaines conditions opératoires données dans le Chapitre 4 en vue d'identifier leurs propriétés de dissolution dans un milieu aqueux. Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans la première partie de ce chapitre.

Nous avons montré dans le Chapitre 3 que le LASSBio-294 est susceptible de subir une réaction d'hydrolyse acide. Dans la deuxième partie du chapitre, nous proposons une formulation gastro-résistante pour améliorer la protection des cristaux synthétisés d'une dégradation d'origine chimique en milieu acide. Nous évaluerons quelles en sont les conséquences en termes de dissolution lors de l'incorporation d'un polymère gastro-entérique (Eudragit S100) dans un milieu aqueux où les cristaux synthétisés sont dispersés avant le séchage par atomisation.

5.1.1 *Partie 1 : Étude de la dissolution in vitro du LASSBio-294*

5.1.1.1 Protocole

Un appareil de dissolution à palettes tournantes ERWEKA modèle DT 60 est utilisé pour évaluer la cinétique de dissolution du LASSBio-294 initial et recristallisée, selon les conditions décrites dans le Tableau 5.1. La composition du milieu a été choisie à partir de l'étude de solubilité de la molécule dans les milieux aqueux (Chapitre 3). Les autres paramètres ont été définis soit à partir des spécifications de différentes pharmacopées ou

guidelines (température et masse du milieu de dissolution, test 1, Tableau 5.1) (FDA 1997; The United States Pharmacopoeia 2003) soit à partir d'essais préliminaires (le type et la vitesse d'agitation). Les concentrations de la molécule dissoute sont mesurées par HPLC en utilisant la méthode développée pour la quantification du LASSBio-294 en solution aqueuse (Chapitre 2, 2.3.2.1.1).

En raison d'une quantité de cristaux insuffisante obtenus dans une des séries d'essais réalisées, nous avons réduit la quantité de poudre pour les tests de dissolution tout en gardant la proportionnalité entre la masse de PA et la masse du milieu de dissolution. Les conditions employées sont également décrites pour le test 2, (Tableau 5.1). Dans le deux cas, les conditions "*sink"* ont été respectées pour s'assurer que la partie dissoute des cristaux n'aurait pas d'effet sur la vitesse de dissolution de ceux non encore dissous.

Tableau 5.1. Conditions expérimentales pour l'étude de dissolution

Paramètres	Test 1	Test 2
Agitateur	Pales	Pales
Milieu	LSS 0,5% pH 7,4	LSS 0,5% pH 7,4
Masse du milieu (g)	900	350
Masse LASSBio-294 (mg)	14,00	5,44
Température (°C)	37,0 ± 0,5	37,0 ± 0,5
Vitesse des pales (tours/min)	50	50
Temps de prélèvements (minutes)	1; 5; 10; 20; 30; 60 et 120	1; 5; 15; 10; 20; 30; 60
Nombres de cuves par essai	3	3

Le pourcentage de molécule dissoute est calculé par :

$$\%Dissolution = \frac{M_{LASSBio-294(t)}}{M_{LASSBio-294(initiale)}} \qquad \text{Équation 37}$$

Avec :

$M_{LASSBio-294(t)}$, la masse du LASSBio-294 au temps "*t*" du prélèvement (calculée à partir de la concentration mesurée du LASSBio-294 en solution).

$M_{LASSBio-294(initiale)}$, la masse du LASSBio-294 initialement ajoutée.

5.1.1.2 Traitement mathématique des résultats

Les résultats sont traités par des modèles indépendants (facteurs *f1* et *f2*) et dépendants (mécanisme de libération).

5.1.1.2.1 Facteurs de différence et de similarité *f1* et *f2*

Les facteurs de différence *f1* et de similarité *f2* représentent un moyen simple de comparaison des profils de dissolution. Ils font partie des méthodes modèles indépendants adoptées par la FDA (Food and Drug Administration / États-Unis) et l'EMEA (European Medicines Agency) comme critère de similarité *in-vitro* entre deux profils de dissolution (Flanner & Moore 1996) (Costa & Sousa Lobo 2001). Ils sont déterminés par les formules de calcul données par :

$$f1 = \left\{ \sum_{t=1}^{n_p} \left| Rt - Tt \right| / \sum_{t=1}^{n_p} Rt \right\} x100 \qquad \text{Équation 38}$$

$$f2 = 50x\log\left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^{n_p} \left(Rt - Tt \right)^2 \right]^{-0,5} x100 \right\} \qquad \text{Équation 39}$$

Avec :

- n_p, nombre de points de prélèvements ;

- *Rt*, quantité dissoute au temps t pour l'échantillon de la référence ;

- *Tt*, quantité dissoute au temps t de la forme à tester.

Le facteur *f1* mesure le pourcentage de différence entre deux courbes de dissolution pour autant que tous les tests aient été réalisés dans les mêmes conditions. Ce pourcentage est nul quand l'échantillon test et référence présentent des profils identiques et augmente proportionnellement avec la disparité entre ces deux profils. Le facteur *f2* est utilisé pour quantifier le degré de similitude entre deux profils de dissolution réalisés dans les mêmes conditions. Les limites des facteurs de différence et de similarité entre deux profils réalisés

dans les mêmes conditions sont fixées à (Flanner & Moore 1996) : $0 \leq f1 \leq 15$ et $50 \leq f2 \leq 100$.

5.1.1.2.2 Mécanisme de libération

Des modèles dépendants permettent d'identifier le mécanisme limitant la libération du principe actif et de comparer différents profils de dissolution. Les principaux mécanismes de cinétique de libération de molécules actives utilisées en pharmacie galénique sont régis par différents modèles mathématiques en fonction de la nature de la libération (Costa & Sousa Lobo 2001). Nous avons appliqué quatre de ces modèles mathématiques à notre étude afin de mieux identifier le mécanisme de libération des molécules du LASSBio-294 à partir des solides recristallisés. Les quatre modèles appliqués ainsi que leurs expressions mathématiques et la nature du mécanisme correspondant sont répertoriés dans le Tableau 5.2.

Tableau 5.2. Modèles mathématiques régissant les mécanismes de cinétique de libération

Modèles	***Equation***	***Représentation graphique***	***Nature du mécanisme***
Ordre zéro	$Q_t = Q_\circ + K_\circ t$ *avec K_0 : constante ordre 0*	le tracé de la concentration cumulée Q_t en fonction du temps est une droite	Libération *indépendante de la concentration* de substance dissoute
Premier ordre	$\ln\left(\frac{Q_t'}{Q_\circ'}\right) = -K_1 t$ *avec K_1 : constante ordre 1*	le tracé de $\ln\left(Q_t'\right)$ en fonction du temps est une droite	Libération *dépendante de la concentration* de substance dissoute
Hixson-Crowell	$1-\left(1-\frac{Q_t}{Q_\circ'}\right)^{1/3} = K_{HC} t$ *avec K_{HC} : constante de Hixson-Crowell*	le tracé de la racine cubique de la fraction non libérée $\sqrt[3]{\frac{Q_t'}{Q_\circ'}}$ en fonction du temps est une droite	Libération par *dissolution* accompagnée d'un changement de surface spécifique et du diamètre des particules
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$ avec K_H : constante de Higuchi	le tracé de la concentration cumulée Q_t en fonction racine carré du temps $\sqrt{t}$ est une droite	Libération par *diffusion*

où Q_o représente la quantité initiale de molécule dans la solution (généralement, $Q_o = 0$), Q_o' représente la quantité de poudre initiale ajoutée, Q_t est la quantité dissoute au temps t, Q_t' la quantité non dissoute au temps t, et K_o, K_1, K_{HC} et K_H sont les constantes des modèles d'ordre zéro, du premier ordre, de Hixson-Crowell et de Higuchi, respectivement.

5.1.1.3 Résultats et discussion

5.1.1.3.1 Cinétique de dissolution du LASSBio-294 sous sa forme originale

Pour la dissolution du LASSBio-294 nous avons choisi une solution contenant du lauryl sulfate de sodium (LSS) à 0,5 %, pH 7,4 comme milieu de dissolution. Notre molécule est très peu soluble dans l'eau (Chapitre 3). Néanmoins, sa solubilité augmente avec la présence du tensioactif LSS car elle se disperse dans les micelles formés. Ce phénomène de solubilisation micellaire permet de quantifier la molécule en solution lors d'un essai de dissolution en milieu aqueux (Figure 5.1). De plus, la présence du LSS réduit la tension interfaciale liquide-solide et favorise la mouillabilité des cristaux de LASSBio-294 par le milieu de dissolution.

Tout d'abord nous remarquons l'influence des conditions des tests 1 et 2 (Figure 5.1) sur la cinétique de dissolution : la dissolution menée dans les conditions du test 2 est plus lente que celle réalisée dans les conditions du test 1. La réduction de la masse du milieu (de 900 g à 350 g) a dû modifier les conditions hydrodynamiques dans les cuves et les conditions de mise en suspension. Le mouvement des particules dans la cuve dépend de la dynamique du fluide caractérisée par la vitesse moyenne dans la cuve et la valeur moyenne de la fluctuation de vitesse, toutes les deux étant proportionnelles à la vitesse de l'agitateur (Trambouze & Euzen 2002). En effet, nous avons observé que dans les conditions du test 2 (350 g de milieu), les cristaux du LASSBio-294 initial se déposaient au fond de la cuve. Il est donc possible que, pour ces conditions, l'énergie cinétique due au mouvement au fond de la cuve soit inférieur à l'énergie potentielle des forces de gravité. Cela expliquerait la dissolution plus lente observée lors de la dissolution menée dans les conditions du test 2.

Ces deux courbes sont utilisées pour la comparaison du profil de dissolution du LASSBio-294 initial avec celles de la molécule sous forme recristallisée. Le choix d'une ou de l'autre dépend des conditions employées lors des essais de dissolution. Il est important de savoir que la présence de la poudre au fond de la cuve n'a été observée que dans les conditions du test 2 pour la molécule initiale.

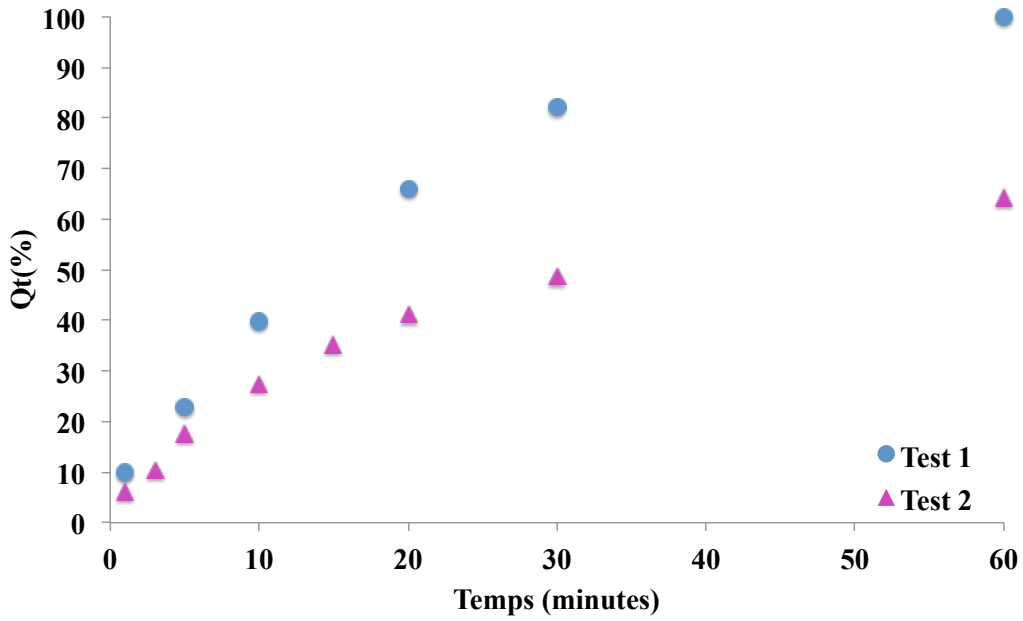


Figure 5.1. Profil de dissolution du LASSBio-294 initial dans une solution de LSS 0,5 %, pH 7,4 (n = 3). Test 1 : 900 g de milieu de dissolution ; Test 2 : 350 g.

5.1.1.3.2 Influence des conditions de mélange entre les phases organique et aqueuse sur les propriétés de dissolution des cristaux synthétisés

5.1.1.3.2.1 Données expérimentales

Dans le Chapitre 4 nous avons montré l'influence de l'utilisation d'un dispositif de pré-mélange (Roughton) et nous avons ensuite, sans le pré-mélangeur, réalisé des essais de cristallisation en variant le mode d'addition de la phase organique dans la phase aqueuse (mode de addition rapide (R) et mode goutte-à-goutte (GG)). L'application d'ultrasons (US) au système a été également étudiée pour les deux différents modes d'addition testés sans le pré-mélangeur.

La Figure 5.2 représente les cinétiques de dissolution pour les cristaux synthétisés selon les différents modes de mélange : avec pré-mélangeur et sans pré-mélangeur. L'objectif étant de vérifier l'impact des conditions de micro et de macro-mélange sur les propriétés de dissolution des cristaux formés.

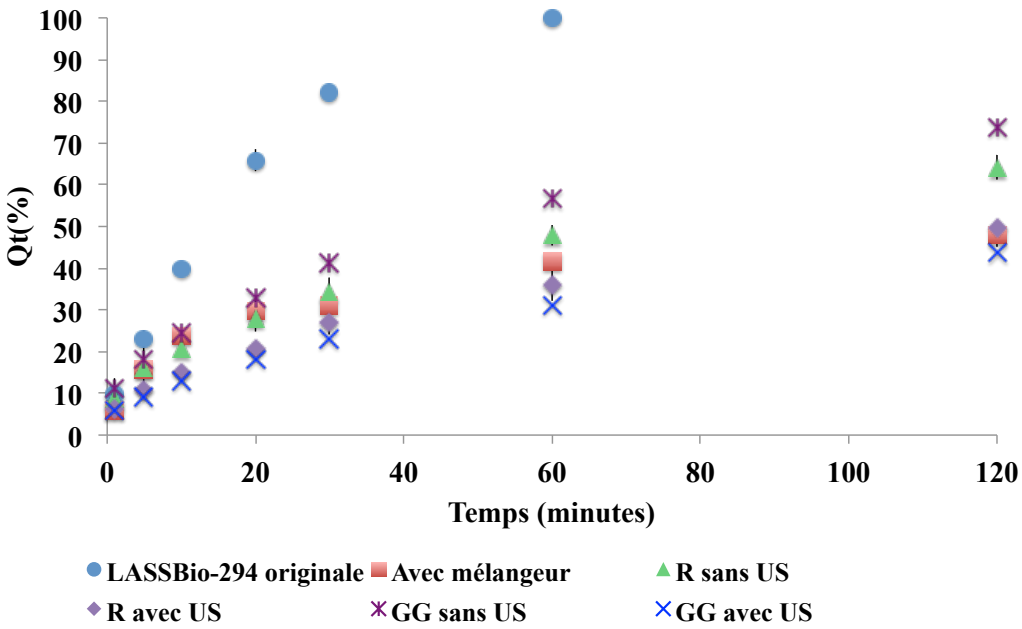


Figure 5.2. Profils de dissolution (solution de LSS 0,5%, pH 7,4) du LASSBio-294 sous forme originale et recristallisé avec et sans pré-mélangeur (n=3).
R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI 12,5 (avec pré-mélangeur) et Ra eau/LI = 4,7 (R) ou 4,7 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). * n est le nombre d'essais de dissolution. Conditions de dissolution (Test 1)

Contre toute attente, les cristaux synthétisés se dissolvent plus lentement que les cristaux initiaux pour l'ensemble des conditions de cristallisation étudiées comme le montre les courbes de la Figure 5.2. Ces profils sont statistiquement différents de celui du LASSBio-294 initial pour un test de dissolution d'une durée de 120 minutes (Annexe A3, Tableau A3. 1). A titre d'exemple, après 30 minutes de dissolution on remarque que le taux de dissolution des cristaux synthétisés selon le mode GG et sans US est de 41% contre 82% pour les cristaux originaux.

Ces résultats nous montrent aussi que l'application d'ultrasons forme des cristaux dont la dissolution est encore plus lente, malgré une surface spécifique plus élevée (Tableau 5.3) ce qui à priori devrait conduire à une vitesse de dissolution plus rapide. En revanche, si les poudres sont examinées en microscopie électronique à balayage (Tableau 5.4), on voit apparaître des différences spectaculaires tant au niveau de la morphologie des cristaux que des états d'agrégation et/ou d'agglomération. Ceci est encore une fois l'illustration qu'une même forme cristalline, suivant les conditions de cristallisation (ici, le mode de mélange), peut être obtenue suivant des états d'association différents.

On peut déduire sur cet exemple que la vitesse de dissolution n'est pas proportionnelle à la surface spécifique des cristaux. Le classement des cinétiques obtenues **GG sans US > R sans US > R avec US > GG avec US** est assez bien corrélé avec la morphologie et le faciès des cristaux et les états d'agglomération/agrégation (dissolution plus rapide du moins au plus compact). Par ailleurs, aucune relation n'est observée entre la vitesse de dissolution et les autres caractéristiques des cristaux secs données : teneur en LI, angle de contact et distribution granulométrique (incluant donc les agglomérats/agrégats) (Tableau 5.3).

Tableau 5.3. Caractéristiques des cristaux secs obtenus avec et sans pré-mélangeur

Essai	Mode d'addition**	D4,3 (µm)	D3,2 (µm)	Span*	Angle de contact (°)	Teneur en LI (ppm)	Surface spécifique (m^2/g)
2	Avec mélangeur Roughton	4,8	2,4	2,6	120,45 ± 1,20 Adsorption rapide	2708	3,35 ± 0,03
15	R sans US	6,5	2,7	3,0	81,12 ± 0,01	18240	1,30 ± 0,02
20	R avec US	7,0	2,1	4,5	137,50 ± 0,46	1176	3,45 ± 0,03
16	GG sans US	9,5	3,1	4,5	146,80 ± 0,37	1265	1,13 ± 0,08
22	GG avec US	11,0	2,6	6,0	Pas de mouillage	956	3,12 ± 0,03

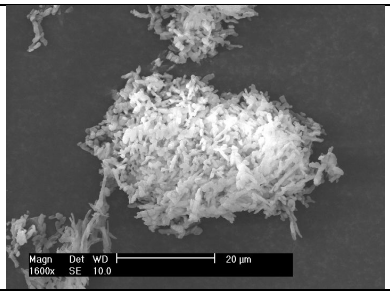
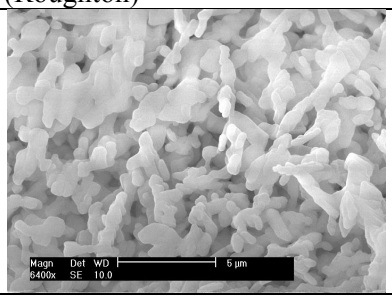
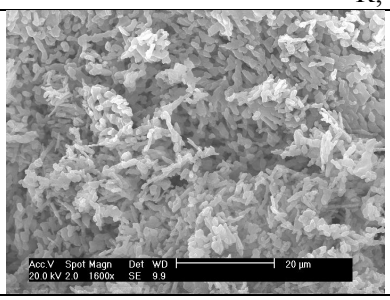
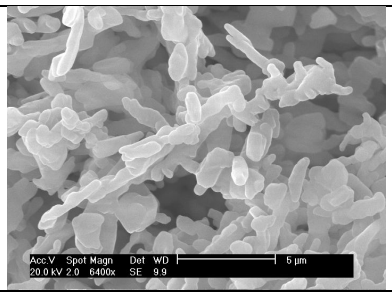
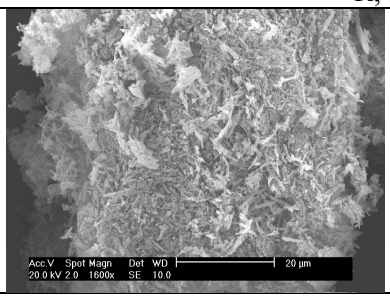
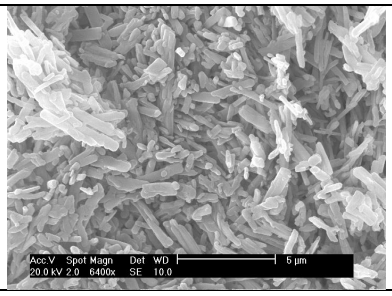
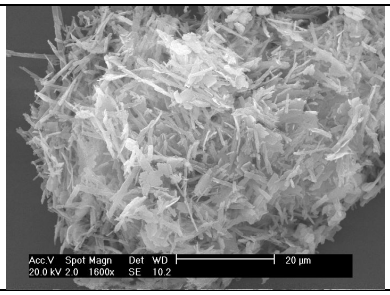
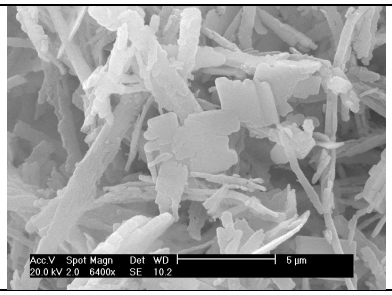
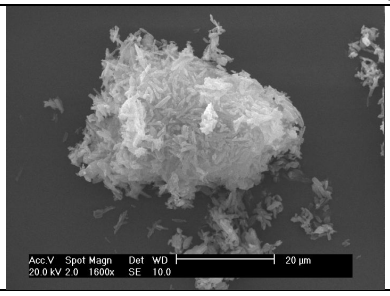
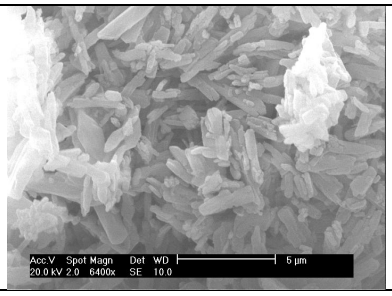
*Span $=d_{90}-d_{10}/d_{50;}$ **R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI 12,5 (avec pré-mélangeur) et Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_r = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

5.1.1.3.2.2 Traitement mathématique

Nous avons appliqué des modèles mathématiques aux cinétiques de libération obtenues pour le LASSBio-294 initial et synthétisé. Les représentations graphiques des cinétiques de dissolution selon les différents modèles appliqués sont regroupées dans l'Annexe 4 (Figure A4. 1 et Figure A4. 2)

Une non linéarité sur l'ensemble des cinétiques est observée pour les représentations graphiques des modèles d'ordre zéro, Hixson-Crowell, et premier ordre (Tableau 5.5). Néanmoins, nous notons qu'avec le modèle de Higuchi une linéarité se dessine pour toute la durée du test de dissolution (Annexe 4, Figure A4. 2(b)), ce qui nous amène à conclure qu'une libération par de diffusion prévaut sur la totalité de l'expérience.

Tableau 5.4. Images MEB des cristaux synthétisés avec et sans le pré-mélangeur Roughton

Images 20 µm ——— (1600x)	**Images 20 µm ——— (6400x)**
Avec mélangeur (Roughton)	
	
R, sans US	
	
R, avec US	
	
GG, sans US	
	
GG, avec US	
	

Cinétiques de dissolution : **GG sans US > R sans US > R avec US > GG avec US**

Selon le modèle du film décrit dans le Chapitre 1, la dissolution se décompose en deux étapes : désintégration des unités de croissance au réseau cristallin et transfert de matière de celles-ci vers l'interface cristal/solution (Garcia 2000; Mersmann 2001). Dans notre cas, la désintégration des unités de croissance est liée à la structure des agglomérats.

Plus les agglomérats sont compacts, plus la diffusion des unités désintégrées du réseau cristallin dans les pores de l'agglomérat est lente et plus lente est la dissolution, ce qui implique une diffusion limitante.

Tableau 5.5. Linéarisation des profils de dissolution avec le coefficient de corrélation (R^2)

Essai	Zéro ordre		Premier ordre		Hixon-Crowell		Higuchi	
	Ko	R^2	K_1	R^2	K_{HC}	R^2	K_H	R^2
LASSBio-294	1,5015	0,8694	0,0563	0,9949	0,005	0,8694	14,325	**0,9725**
Avec mélangeur Roughton	0,2976	0,7712	0,0044	0,8412	0,001	0,7712	4,0471	**0,9332**
R sans US	0,4383	0,9314	0,0076	0,9833	0,0015	0,9314	5,6132	**0,9991**
R avec US	0,347	0,9337	0,0051	0,9715	0,0012	0,9337	4,4359	**0,9979**
GG sans US	0,5033	0,9213	0,0101	0,9877	0,0017	0,9213	6,472	**0,9967**
GG avec US	0,3037	0,9409	0,0042	0,9716	0,0010	0,9409	3,8677	**0,9984**

** R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Paramètres: Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI 12,5 (avec pré-mélangeur) et Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). Conditions de dissolution (Test 1)

5.1.1.4 Influence du mode de séchage sur les propriétés de dissolution des cristaux synthétisés

5.1.1.4.1.1 Données expérimentales

En vue de réduire l'état d'agglomération et mieux contrôler la structure des agglomérats, nous avons modifié le mode de séchage des cristaux fraîchement formés.

Selon notre premier protocole expérimental, en fin de procédé de synthèse les cristaux étaient lavés (avec l'eau) et puis séchés en étuve comme cela est décrit en dans le Chapitre 4. Nous avons modifié le mode de séchage des cristaux humides : passage d'un séchage en étuve au séchage par atomisation ("*spray drying*"). Nous évaluons quelles en sont les conséquences en termes de dissolution.

La Figure 5.3 réunit l'ensemble des profils de dissolution obtenus pour les cristaux séchés par atomisation. Les facteurs *f1* et *f2* calculés pour ces courbes, confirment qu'elles sont statistiquement différentes du profil du produit de référence (Annexe 3, Tableau A3. 2).

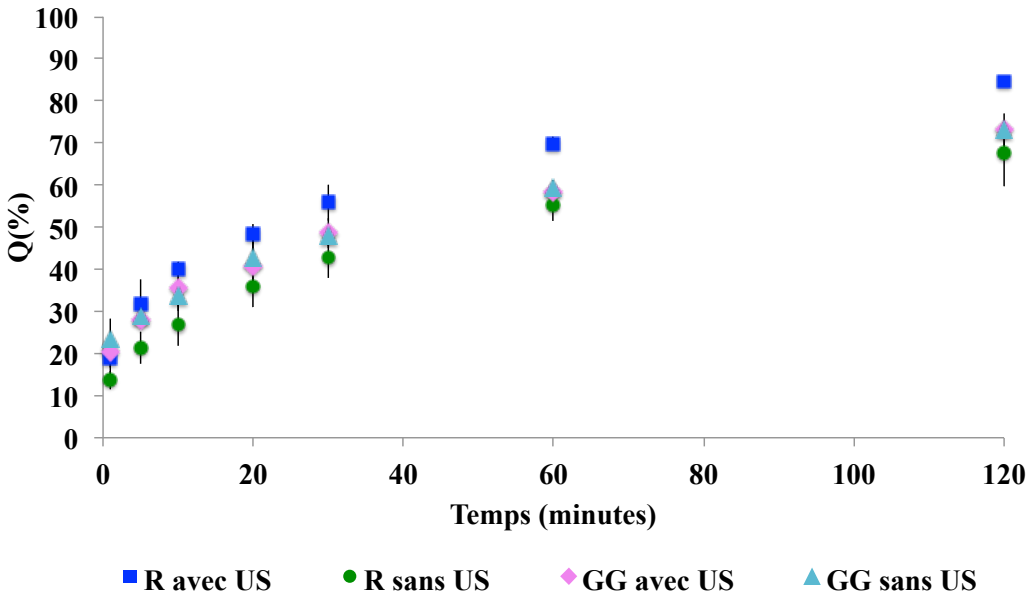


Figure 5.3. Profils de dissolution (solution de LSS 0,5%, pH 7,4) du LASSBio-294 recristallisée en mode d'addition rapide et goutte-à-goutte avec séchage par atomisation.
(Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte. Conditions de dissolution (Test 1).

Le Tableau 5.6 rassemble quelques données extraites des courbes de dissolution présentées dans la Figure 5.3, dans le souci d'en faciliter la comparaison avec les courbes équivalentes obtenues pour des cristaux séchés en étuve. Quand on compare les taux de dissolution, par exemple à 5 minutes puis à 30 minutes lors d'un essai de dissolution, on remarque que les cristaux séchés par atomisation peuvent se dissoudre plus rapidement que ceux séchés en étuve. Le séchage par atomisation semble favoriser la formation d'agglomérats plus petits qui se dés-agglomèrent plus facilement quand ils sont dispersés dans le milieu de dissolution, ce qui ne semble pas être une hypothèse déraisonnable.

Tableau 5.6. Pourcentage de la molécule Qt (%) dissous après 5 et 30 minutes pour les cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant

Essai	*Séchage par étuve*		*Séchage par atomisation*	
	Qt (%)		*Qt (%)*	
	5 minutes	*30 minutes*	*5 minutes*	*30 minutes*
R, Sans US	16,14 ± 6,45	34,32 ± 3,52	21,24 ± 3,76	42,74 ± 4,95
R, Avec US	10,66 ± 1,98	26,77 ± 2,77	31,62 ± 5,85	55,79 ± 4,23
GG, Sans US	18,04 ± 4,14	41,15 ± 3,17	29,03 ± 2,14	47,98 ± 2,45
GG, Avec US	9,23 ± 2,26	23,12 ± 0,88	27,97 ± 1,24	48,56 ± 3,51

R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_r = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). Conditions de dissolution (Test 1).

5.1.1.4.1.2 Traitement mathématique

Le modèle mathématique d'Higuchi a été appliqué aux cinétiques de libération obtenues pour le LASSBio-294 synthétisés et séchés par atomisation. Les représentations graphiques des cinétiques de dissolution selon ce modèle sont données dans l'Annexe 4 (Figure A4. 3) et les paramètres du modèle dans le Tableau 5.7. Malgré l'accélération de la dissolution, le phénomène de diffusion est toujours le mécanisme limitant de cette cinétique.

Tableau 5.7. Linéarisation des profils de dissolution avec le coefficient de corrélation (R^2) pour les cristaux obtenus par séchage par atomisation

Essai	*Higuchi*	
	K_H	R^2
R sans US	5,5442	0,9876
R avec US	6,5076	0,9800
GG sans US	5,1109	0,9956
GG avec US	5,2646	0,9907

5.1.2 *Partie 2 : Proposition d'une formulation gastro-résistante pour les cristaux de LASSBio-294 synthétisés*

5.1.2.1 Méthodes

5.1.2.1.1 Protocole de production de la formulation

En vue d'améliorer la stabilité du LASSBio-294 dans des milieux acides, l'Eudragit S100 est utilisé comme polymère gastro-entérique en association avec nos cristaux.

De nouveaux essais de cristallisation ont été menés selon les conditions expérimentales que nous avons identifié comme étant les plus favorables à la dissolution. Celles-ci sont les suivantes :

- R avec US avec séchage par atomisation,
- Ci = LASSBio-294 de 57 mg/g solution,
- Ra eau/LI de 4,7,
- Vitesse d'agitation de 800 tours/min,
- Anti-solvant l'eau,
- Temps d'essai de 30 minutes.

Les cristaux une fois formés, selon la procédure ci-dessus, ont été suspendus dans une solution aqueuse contenant du bicarbonate d'ammonium (1 %) pH 7,4 et 2 % de polymère Eudragit S100 préalablement dissous. La suspension formée est ensuite atomisée selon le même protocole de séchage utilisé auparavant (Chapitre 4, 4.8.1). Puis, les poudres obtenues ont été maintenues dans une étuve à 70 °C pendant 3 h pour éliminer un éventuel résidu d'ammonium.

Le paramètre de cette étude a été la proportion massique entre les cristaux de LASSBio-294 et le polymère choisi. Quatre proportions massiques ont été testées : Cristaux humides : ES100 = (1:10); (1:5); (5:1) et (10:1).

5.1.2.1.2 Test de stabilité de la formulation gastro-résistante de LASSBio-294 en milieu acide

La stabilité de ces différentes formulations (LASSBio-294 : Eudragit S100) est mesurée par la méthode suivante : une quantité de solide en excès est ajoutée dans une solution aqueuse de HCl 0,1% (pH 1,2). Les échantillons sont maintenus sous agitation pendant 2 h dans des flacons hermétiques plongés dans un bain thermostaté à 37 °C et à pression atmosphérique. Après 2 h, des prélèvements sont effectués, les suspensions sont filtrées (GHP Acrodisc, taille des pores 0,2 μm, Millipore, Bedford, MA, États-Unis) et les solutions sont analysées par HPLC conformément au protocole décrit dans le Chapitre 2 (2.3.2.1).

5.1.2.1.3 Etude de la dissolution des formulations gastro-résistantes de LASSBio-294

Les cinétiques de dissolution des formulations gastro-résistantes de LASSBio-294 sont réalisées selon le protocole décrit dans la partie 5.1.1.1 (conditions du test 2).

5.1.2.2 Résultats et discussion

5.1.2.2.1 Test de stabilité de la formulation gastro-résistante de LASSBio-294 en milieu acide

Les polymères de l'Eudragit sont des copolymères dérivés d'esters d'acide acrylique et d'acide méthacrylique, dont les propriétés physico-chimiques sont déterminées par des groupes fonctionnels (Joshi 2013).

Il existe différents types de polymères d'Eudragit : les poly(méta)acrylates solubles et insolubles. Les premiers sont solubles dans les fluides digestifs. Les seconds sont insolubles, mais perméables à travers des membranes biologiques. Parmi les polymères solubles, les formes de l'Eudragit L, S, FS ou E, avec des groupes dépendants du pH acide ou basique, permettent la libération de la molécule contrôlée par le pH. Les applications pour ces types d'Eudragit vont du simple masquage du goût/odeur à la résistance gastrique dans le but d'offrir de meilleures performances pour la libération entérique (Kararli et al. 1995; Freire et al. 2006 ; Joshi 2013). Pour la protection des molécules actives dans le fluide gastrique les

polymères d'Eudragit L et S sont les plus utilisés (Kararli et al. 1995; Akhgari et al. 2005 ;(Joshi 2013). Dans cette étude, nous avons choisi l'Eudragit S100 comme polymère pour la protection du LASSBio-294 dans des milieux acides (en vue d'une administration par voie orale).

L'Eudragit S100 est un copolymère anionique formé par un mélange d'acide méthacrylique et méthyl méthacrylate, avec un ratio entre les groups carboxyliques et les groupes ester de 1:2 (Figure 5.4). Dû à sa nature acide, il est très peu soluble dans l'eau et dans des milieux acides, mais se dissout au-delà d'un pH neutre (pH > 7,0). Sa dissolution se produit par le changement structurel associé à l'ionisation des groupes fonctionnels d'acide carboxylique (Alhnan et al. 2011). Lorsque le pH du milieu aqueux est augmenté, ce polymère commence à se dissoudre avec l'ionisation du groupe fonctionnel carboxylique.

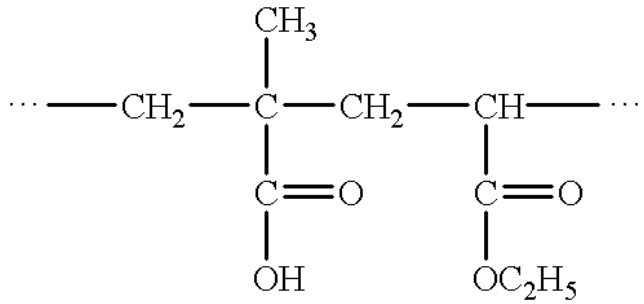


Figure 5.4. Formule développé de l'Eudragit S100.
Source : http://www.google.com/patents/US6372255

Dans notre système, l'Eudragit S100 est ionisé dans la solution de bicarbonate d'ammonium pour rendre le polymère soluble (Réaction 1). Pendant le processus de dissolution, l'acide carboxylique est dégradé en eau et dioxyde de carbone (Réaction 2). Après le processus de séchage par atomisation, la chaleur induit le transfert des protons d'ammonium sur le groupe carboxylique du polymère conduisant à la restauration de la forme acide du polymère et l'évaporation d'ammonium (Réaction 3). Cette méthode de dissolution a été décrite dans la littérature (Alhnan et al. 2011).

Réaction 1 : $R - COOH + NH_4HCO_3 \rightleftarrows R - COO^-NH_4^+ + H_2CO_3$

Réaction 2 : $H_2CO_3 \rightleftarrows H_2O + CO_2$

Réaction 3 : $R - COO^-NH_4^+ \overset{(\Delta)}{\rightleftarrows} NH_3 + R - COOH$

La Figure 5.5 présente les concentrations du LASSBio-294 en solution mesurées lors du test de stabilité de la formulation gastro-résistante en milieu acide. Nous pouvons voir que lorsque la quantité d'Eudragit S100 dans la formulation augmente, la concentration du LASSBio-294 en solution diminue. Pour les formulations contenant une proportion LASSBio-294 : Eudragit S100 de (1:10) ou (1:5) la concentration du LASSBio-294 en solution après 2 h d'exposition en milieu acide est de 6-7 µg/g solution, tandis que pour les formulations avec des proportions de (5:1) et (10:1) la quantité de molécule dissoute est de 14-15 µg/g solution. Pour ces dernières, la quantité de molécule dissoute s'approche de celle obtenue avec la molécule initiale (16 µg/g solution). Nous pouvons donc conclure que l'Eudragit S100 est capable de protéger, même partiellement, le LASSBio-294 de son hydrolyse en milieu acide.

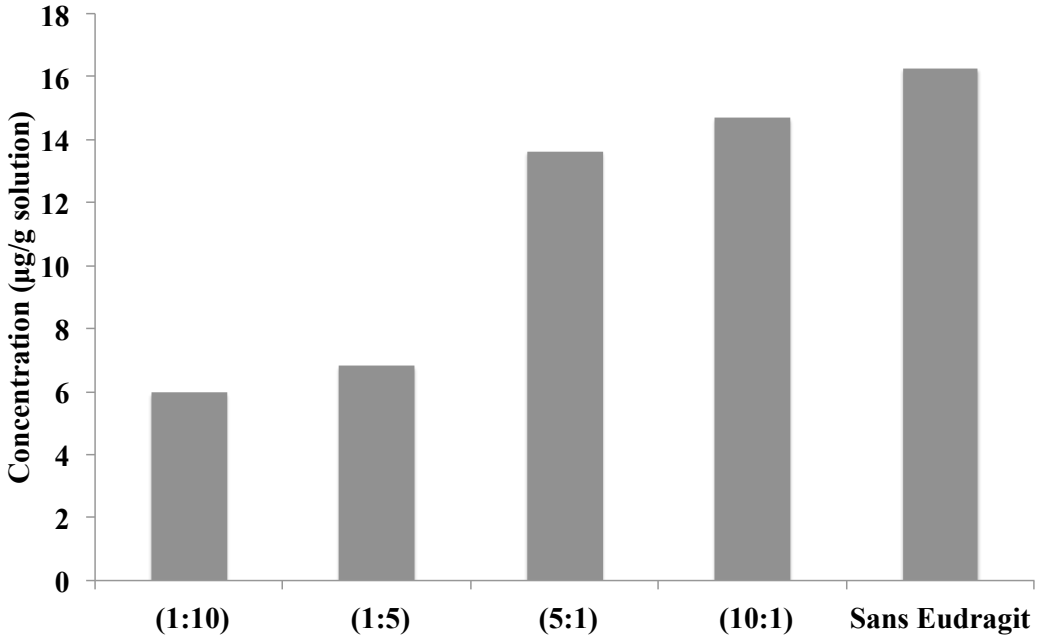


Figure 5.5. Concentration du LASSBio-294 en solution lors de l'étude de stabilité pendant 2 h dans HCl 0,1 % (pH 1,2) à 37 °C. Paramètre de l'étude : proportion massique LASSBio-204 : Eudragit S100.

Le Tableau 5.8 et le Tableau 5.9 regroupent les images MEB de ces formulations avec 2 grossissements différents, 1600x et 6400x, respectivement. Elles montrent des différences notables entre les solides obtenus, dont la morphologie varie avec la concentration du polymère associé aux cristaux. A fur et à mesure que la concentration du polymère augmente les particules solides deviennent plus arrondies et les cristaux de LASSBio-294 deviennent moins visibles sur les micrographies. Nous supposons que ces cristaux sont enrobés par un

film polymère formé autour des cristaux lors du séchage de la suspension. Des petites particules plus sphériques sont également observées, celles-ci probablement constituées que du polymère.

L'effet de ce changement physique sera évalué par la suite sur les cinétiques de dissolution de deux de ces formulations.

5.1.2.2.2 Étude de la dissolution des formulations gastro-résistantes de LASSBio-294

Des essais de dissolution ont été réalisés pour les formulations préparées avec des proportions LASSBio-294 : Eudragit S100 de (1:10) et (10:1). L'objectif est d'évaluer l'effet de la présence et de la concentration du polymère sur les cinétiques de dissolution des cristaux synthétisés selon les mêmes conditions opératoires.

La Figure 5.6 montre les profils de dissolutions des formulations gastro-résistantes en comparaison à celui du LASSBio-294 initial (Test 2) ainsi qu'à celui des cristaux synthétisés et séchés par atomisation sans Eudragit S100. Il est évident que des différences notables existent entre les cristaux purs et les cristaux formulés avec l'Eudragit S100 (des valeurs des facteurs *f1* et de *f2* entre 70,3 et 51,7 confirment statistiquement ces différences comme le montre l'Annexe 3 (Tableau A3. 3).

Ces résultats sont intéressants car ils apportent une double solution pour les cristaux synthétisés de LASSBio-294 :

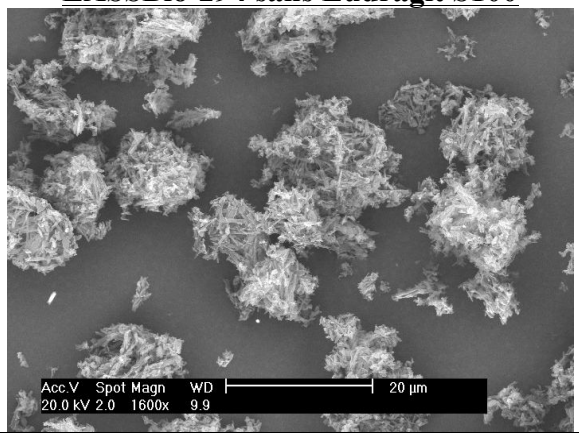
-Une protection, même partielle, contre l'hydrolyse de la molécule en milieu acide ;

-Des changements structuraux importants des agglomérats comme visualisé par microscopie électronique à balayage.

Tableau 5.8. Images MEB des particules obtenues à partir des formulations gastro-résistantes contenant différentes proportions LASSBio-294 : Eudragit S100 (1600x).

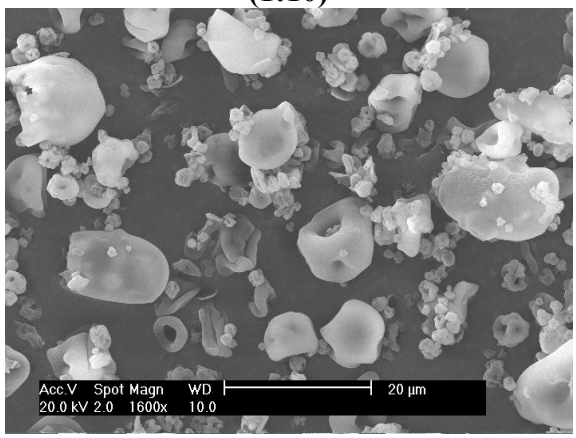
Images (1600x) 20 µm

LASSBio-294 sans Eudragit S100

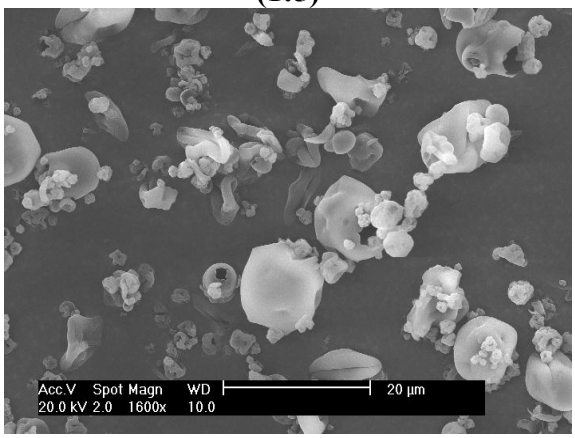


LASSBio-294 : Eudragit S100

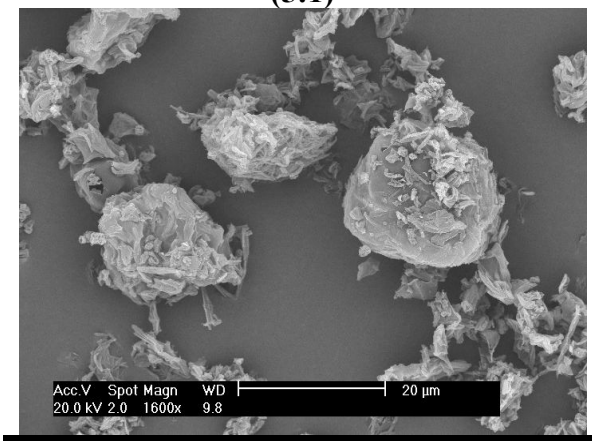
(1:10)



(1:5)



(5:1)



(10:1)

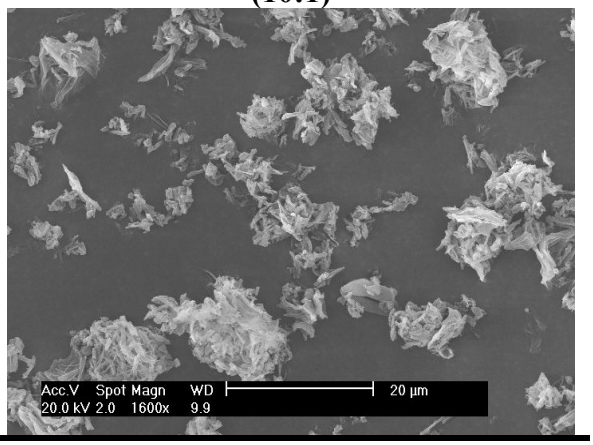
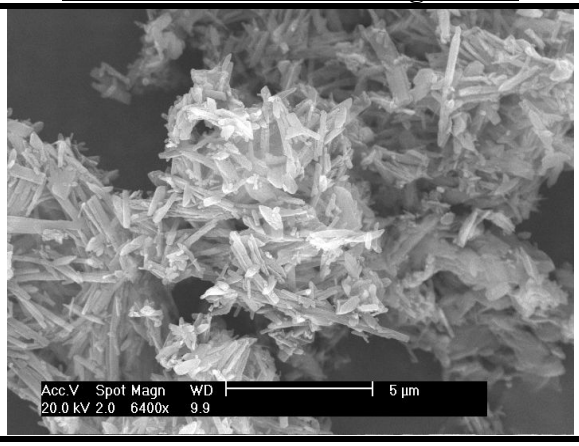


Tableau 5.9. Images MEB des particules obtenues à partir des formulations gastro-résistantes contenant différentes proportions LASSBio-294 : Eudragit S100 (6400x)

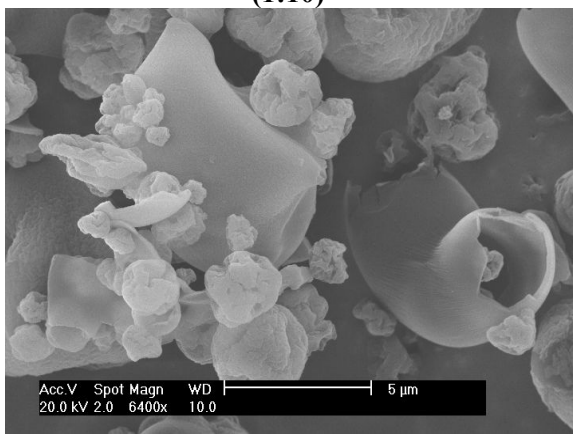
Images (6400x) 5 µm

LASSBio-294 sans Eudragit S100

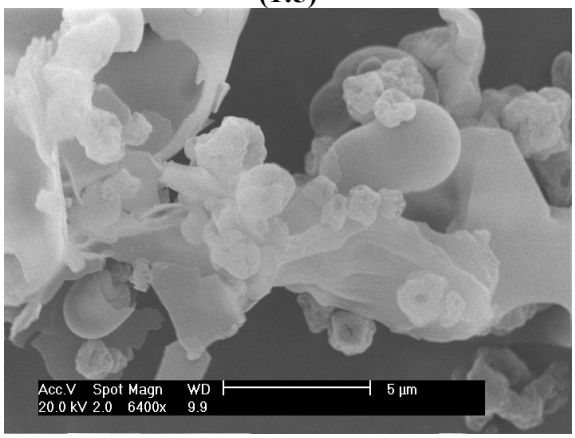


LASSBio-294 : Eudragit S100

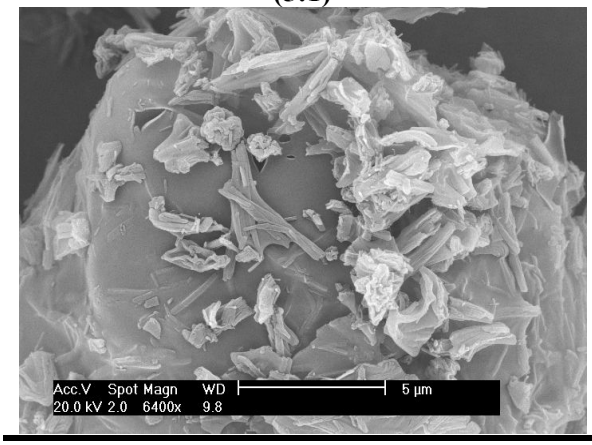
(1:10)



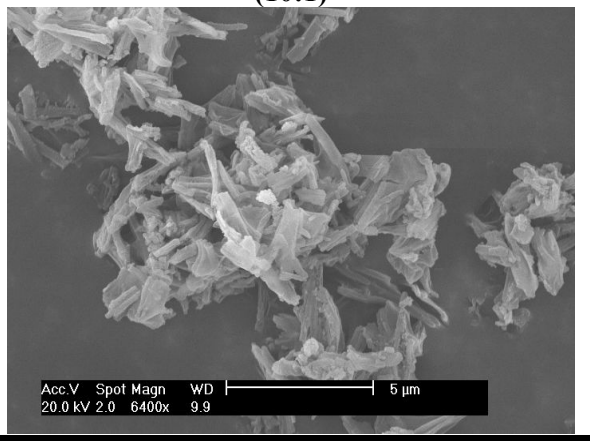
(1:5)



(5:1)



(10:1)



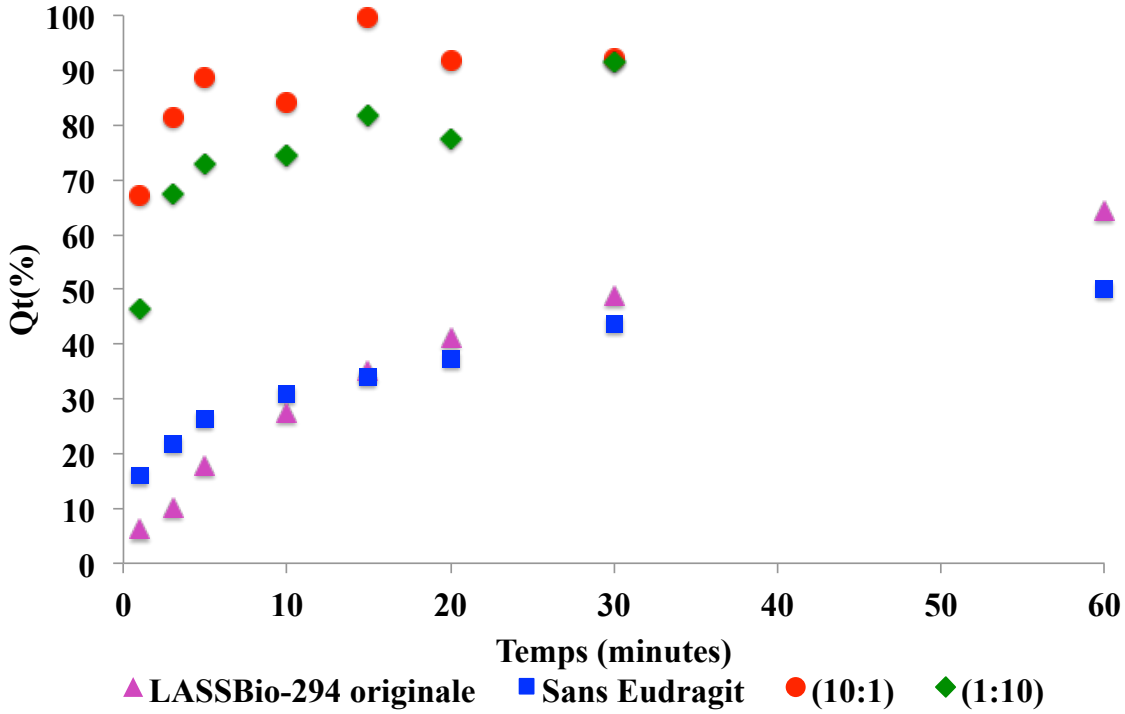


Figure 5.6. Profils de dissolution du LASSBio-295 sous forme originale et des cristaux obtenus par atomisation à partir d'une dispersion avec et sans Eudragit S100 dans une solution de LSS 0,5%, pH 7,4.
(Paramètres de cristallisation : Mode d'addition : R, avec US; Ci : 57 mg/g solution; Ra eau/LI 4,7; N_v : 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes, séchage par atomisation. Conditions de dissolution (Test 2).

5.1.2.2.2.1 Traitement mathématique

Les représentations graphiques du modèle d'Higuchi confirment que ce modèle ne peut pas décrire le processus de dissolution des cristaux en présence de l'Eudragit S100 (Tableau 5.10). En complément, la représentation graphique est donnée dans l'Annexe 4 (Figure A4. 4). Ceci dit, la diffusion semble ne plus être le mécanisme limitant du processus de dissolution des cristaux formulés. L'incorporation de l'Eudragit S100 dans les suspensions de cristaux a dû modifier la structuration du solide qui peut se dissoudre alors très rapidement comme le montre leurs profils de dissolution (Figure 5.6).

Tableau 5.10. Linéarisation des profils de dissolution avec le coefficient de corrélation (R^2).

Échantillon	***Higuchi***	
	K_H	R^2
LASSBio-294 initial	9,0076	**0,9858**
Sans Eudragit S100	5,0715	**0,9719**
(1:10)	7,9452	**0,8114**
(10:1)	5,04588	**0,5959**

5.2 Conclusions

Ce chapitre présente tout d'abord les propriétés de dissolution des certains cristaux de LASSBio-294 synthétisés tout au long de ce travail.

Des cristaux synthétisés selon les différents modes de mélange lors de la cristallisation ou de l'utilisation de différents modes de séchage après la synthèse ont été analysés et leurs profils de dissolution comparés.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'effet de la structure physique des agglomérats sur la dissolution : les agglomérats moins compacts ou plus petits, produits selon certaines conditions opératoires de cristallisation-séchage auront une cinétique plus rapide en comparaison à des agglomérats plus denses ou plus gros.

Nous pouvons conclure que la faible dissolution des cristaux synthétisés en comparaison à la dissolution des cristaux initiaux peuvent s'expliquer par le mécanisme limitant de ce processus qui semble changer avec la recristallisation : la diffusion des unités de croissance dans les agglomérats des cristaux synthétisés devient le mécanisme limitant de leur dissolution. Les résultats des dissolutions sont bien décrits par une cinétique obéissant à la loi d'Higuchi, ce qui permet la confirmation d'un mécanisme de diffusion limitant lors dissolution.

De plus, une formulation gastro-résistante est proposée en vue d'améliorer la stabilité du PA (LASSBio-294) face à l'hydrolyse dans les milieux acides. Le polymère de notre choix est l'Eudragit S100, un polymère pH-dépendant, insoluble dans les pH acides (pH < 6). La proportion massique LASSBio-294 : polymère a été le paramètre de cette étude. Les résultats montrent que l'Eudragit S100 est capable de protéger, partiellement, le LASSBio-294 en milieu acide.

Un autre résultat intéressant a été dégagé de cette étude : la présence du polymère en solution lors du séchage des cristaux synthétisés a un effet notable sur la structure des agglomérats formés qui peuvent se désagréger, se disperser et se dissoudre rapidement. Les courbes expérimentales n'obéissent plus à la loi d'Higuchi, ce qui confirme un changement de mécanisme limitant.

Conclusion générale et perspectives

Les molécules de faible biodisponibilité représentent une proportion croissante des nouvelles molécules pharmaceutiques. De nos jours, des facteurs comme une faible solubilité et une mauvaise cinétique de dissolution constituent des causes d'échec dans le développement d'un médicament.

La molécule pharmaceutique, à laquelle nous nous sommes intéressés, le 3,4-méthylènedioxybenzoyl-2-thiénylhydrazone (LASSBio-294), est une nouvelle molécule pour une action cardiotonique. Cependant elle rentre dans cette catégorie de molécules faiblement solubles. Une amélioration de sa biodisponibilité peut avoir pour conséquence de réduire considérablement la dose du médicament à administrer oralement.

Afin de répondre à cette problématique (amélioration de sa biodisponibilité orale), nous avons mis en place une opération de cristallisation par effet anti-solvant pour la recristalliser et modifier certaines de ses propriétés (taille des cristaux, cinétique de dissolution). La recristallisation a été effectuée en utilisant un liquide ionique comme solvant et l'eau comme anti-solvant. Nous savions que la réalisation de ce travail était un challenge car peu de travaux scientifiques ont été publiés sur ce sujet. De plus, cette molécule est nouvelle et donc méconnue.

Dans un premier temps, nous avons mis au point des méthodes pour la caractérisation de cette molécule (solubilité, stabilité, pKa, …) et des systèmes contenant des LIs. La caractérisation physico-chimique du LASSBio-294 initial a permis d'identifier qu'il s'agit d'un produit cristallin dont les cristaux ont une taille micrométrique et une forme allongée.

L'étude expérimentale de la solubilité du LASSBio-294 dans les milieux aqueux avec différents pH a confirmé sa faible solubilité dans ce type de milieux et a permis d'estimer son pKa. Lors de cette étude, nous avons également identifié que cette molécule peut être hydrolysée dans des milieux aqueux et que la cinétique d'hydrolyse dépend du pH du milieu et de la teneur en solide. Dans un milieu acide (pH 1,2) cette hydrolyse est catalysée. Sur cette base, lors du développement des formes pharmaceutiques pour l'administration orale du LASSBio-294, des stratégies pour la protection contre l'hydrolyse sont fortement recommandées, par exemple, l'utilisation des systèmes de libération entérique.

Pour des pH 6,8 et 7,4 la dégradation est observée après 24 h en présence ou en absence d'additifs. Ceci indique que des milieux à pH 6,8 ou 7,4 peuvent être utilisés pour évaluer les cinétiques de dissolution sans risque de dégradation de la molécule pendant le temps d'essai (normalement inférieur à 3 h). Des analyses RX et MEB ont montré que dans certains cas, la structure cristalline et le faciès de cristaux des solides récupérés ne sont pas identiques à celui du LASSBio-294 initial.

L'étude expérimentale de solubilité dans des LIs a permis d'identifier plusieurs LIs capables de solubiliser le LASSBio-294. Cette solubilité semble augmenter en fonction de la température. Les données expérimentales soulignent également l'importance de la prise en compte de la nature du cation et de l'anion du liquide ionique, qui est sans doute un paramètre non négligeable dans l'explication des mécanismes de solubilisation. Nous pensons apporter ici les premiers éléments de réponse aux questions ouvertes exposées en début de thèse ***(Q1. Comment choisir le bon liquide ionique 'candidat à solvant' pour une molécule donnée?) :*** des interactions telles que des liaisons hydrogène, des forces de van der Waals et des interactions du type π-π entre soluté-solvant ont été suggérées pour expliquer la capacité des cinq LIs à solubiliser le LASSBio-294.

Dans un second temps, la cristallisation par effet anti-solvant du LASSBio-294 en utilisant le [emim][CH_3O)(H)PO_2] comme solvant et l'eau comme anti-solvant a été menée. Cela a permis d'étudier les effets du type de mélange/efficacité de mélange sur les propriétés des cristaux formés. D'autres paramètres opératoires tels, le rapport anti-solvant/solvant, la concentration initiale et la présence d'additifs sur les propriétés de cristaux ont été également étudiés. A notre connaissance, l'influence de paramètres opératoires lors de la cristallisation d'une molécule pharmaceutique en présence de LI n'a jamais été étudiée dans les travaux publiés.

Ce travail a permis d'apporter certains éléments de réponse aux questions 2 et 3 énoncées initialement ***(Q2. Quels sont les avantages/limitations du procédé de cristallisation par effet anti-solvant où le solvant est un liquide ionique ? Q3. Comment quantifier le solvant résiduel dans le solide ? Quel est l'effet du solvant résiduel ?***). Nous avons obtenu des tendances très claires, hautement qualitatives.

De façon générale, la recristallisation par effet anti-solvant a permis d'obtenir des cristaux plus petits de même structure cristalline que le solide initial. Cependant ces cristaux sont très agglomérés et leurs distributions de taille présentent au moins deux populations. L'estimation des temps de mélange et temps d'induction par des corrélations montre que les conditions hydrodynamiques du mélange contrôlent la formation des cristaux.

Pour chaque paramètre opératoire, un mécanisme de formation des cristaux a été proposé. Un phénomène de "gélation" est observé pour des sursaturations élevées. En effet le système semble se figer. Dans ces cas là, des structures sans arêtes définies et riches en LI sont observées.

En utilisant un pré-mélangeur, des agglomérats plus petits sont formés avec une vitesse d'agitation plus élevée, ou une concentration plus faible en soluté ou un rapport massique eau/LI plus élevé : augmentation de la sursaturation. En présence d'additifs, des agglomérats plus petits sont créés en présence de Tween 20. Ce dernier pourrait former des liaisons hydrogène avec les groupements fonctionnels de la surface des particules du LASSBio-294 ou une barrière mécanique qui favoriserait la diminution du taux d'agglomération.

Sans le pré-mélangeur, des essais en mode addition goutte-à-goutte (GG) et addition rapide (R) sont conduits avec et sans ultrasons. Le mode GG en mode silencieux conduit à des cristaux de taille plus importante. L'influence de la concentration de la phase organique, et des ultrasons est étudiée. A concentration moyenne (57 mg/g), les cristaux obtenus en présence d'ultrasons sont plus petits et plus homogènes en terme de faciès que sans ultrasons. La teneur en LI est aussi plus faible en présence d'ultrasons. A concentration plus élevée (159 mg/g), les ultrasons ne semblent plus avoir d'effet ni sur la taille, ni sur la teneur en LI. On peut conclure qu'avec ultrasons ou sans ultrasons mais, à concentration élevée, la formation du solide est contrôlée par le mélange. Les ultrasons ont un effet promoteur sur le mélange (dispersion de la solution organique dans l'eau) et sur la nucléation et un effet inhibiteur sur la croissance et l'agglomération. Une puissance minimale de 20 W semble cependant nécessaire.

L'agglomération observée dans tous les cas a deux origines : la synthèse dans la cuve agitée et le séchage en étuve. Lors du séchage en étuve, l'agglomération des « agglomérats » issus de la cristallisation implique que les tailles moyennes du solide sec ne varient pas entre tous les essais. Le séchage par atomisation a permis de réduire cette deuxième agglomération.

Ces résultats sont en accord avec l'approche de description de la cristallisation par effet anti-solvant et mettent bien en évidence l'existence de plusieurs mécanismes concomitants responsables de la formation de la structure granulaire du solide. De plus, nous montrons que la teneur en LI dans le solide peut être diminuée en modifiant les conditions de lavage. Les structures riches en LI lavées avec une quantité plus importante d'eau se transforment en agglomérats de particules mieux définies. Les structures gélifiées seraient donc constituées de cristaux et d'un gel riche en LI et en soluté.

Dans un troisième temps, les propriétés de dissolution du LASSBio-294 recristallisé ont été déterminées. L'effet de la structure physique des agglomérats sur la cinétique de dissolution est évident et la diffusion est le mécanisme limitant de ce processus. Le mode de séchage des cristaux humides est une opération importante pour le contrôle de la structure des agglomérats formés et de la vitesse de dissolution, ce que nous avons confirmé en modifiant cette étape du procédé (séchage en étuve versus séchage par atomisation).

Dans la dernière partie de ce travail, une formulation gastro-résistante avec l'Eudragit S100 est proposée en vue d'améliorer la stabilité du PA (LASSBio-294) face à l'hydrolyse dans les milieux acides. La proportion massique LASSBio-294 / polymère a été le paramètre de cette étude. Les résultats montrent que l'Eudragit S100 est capable de protéger, partiellement, le LASSBio-294 en milieu acide. De plus, la présence du polymère en solution lors du séchage des cristaux synthétisés a un effet notable sur la structure des agglomérats formés qui peuvent se désagréger et se disperser accélérant ainsi la dissolution du solide ! La diffusion n'est plus le mécanisme limitant pendant le processus de dissolution.

Pour conclure et résumer ce qui peut être une ébauche de réponse aux questions ouvertes :

Il est possible d'utiliser des LIs comme solvants alternatifs dans un procédé de cristallisation par effet anti-solvant, ce qui peut ouvrir des nouvelles perspectives pour d'autres molécules pharmaceutiques peu solubles dans l'eau mais également peu solubles dans des solvants organiques telle que la molécule LASSBio-294. La limite de l'utilisation de ce procédé réside à deux niveaux :

- La première limite est la définition des bonnes conditions du mélange (le mélange peut être difficile à optimiser en raison d'une viscosité élevée des LIs et des mélanges LIs/soluté) ;

- Une seconde limite est l'élimination du LI et sa récupération du mélange LI-eau. après la formation des cristaux. Contrairement aux solvants organiques, l'élimination du LI dans le processus de cristallisation est difficile en raison de sa faible tension de vapeur.

- Nous avons montré qu'une teneur élevée de LI résiduel peut modifier le faciès des cristaux et leur point de fusion. Pour cela, la teneur résiduelle dans le solide a été quantifiée par chromatographie ionique.

En envisageant de poursuivre cette étude, il serait intéressant :

- D'utiliser des modèles thermodynamiques pour prédire la solubilité du LASSBio-294 dans les LIs et des mélanges LIs-eau ;
- D'utiliser d'autres LIs qui ont également solubilisé la molécule LASSBio-294 dans le procédé de cristallisation. Nous supposons qu'un changement des interactions moléculaires soluté-solvant peut avoir un impact sur l'état d'agglomération des cristaux formés (changement des forces de cohésion soluté-LI résiduel) ;
- D'identifier des systèmes de mélange de la phase organique et de la phase aqueuse adapté au viscosité de nos mélanges LI/soluté ;
- De déterminer les cinétiques de cristallisation (nucléation, croissance, et agglomération) en mode d'addition rapide et goutte à goutte par un suivi in situ de la concentration et de la taille ;
- De mesurer d'autres propriétés des agglomérats comme par exemple la porosité pour la relier à leur cinétique de déassaglomération.

Références Bibliographiques

Abbott AP, Ryder KS, König U. Electrofinishing of metals using eutectic based ionic liquids. Transactions of the Institute of Metal Finishing. 2008;86(4):196-204.

Abraham MH, Ibrahim A, Zissimos AM, Zhao YH, Comer J, Reynolds DP. Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design. Drug Discovery Today. 2002;7(20):1056-1063.

Akhgari A, Afrasiabi Garekani H, Sadeghi F, Azimaie M. Statistical optimization of indomethacin pellets coated with pH-dependent methacrylic polymers for possible colonic drug delivery. International Journal Pharmaceutics. 2005;305(1-2):22-30.

Aki SNVK, Mellein BR, Saurer EM, Brennecke JF. High-Pressure Phase Behavior of Carbon Dioxide with Imidazolium-Based Ionic Liquids. Journal Physical Chemistry B. 2004;108(52):20355-20365.

Ålander EM, Rasmuson ÅC. Agglomeration and adhesion free energy of paracetamol crystals in organic solvents. AIChE Journal. 2007;53(10):2590 - 2605.

Alhnan MA, Kidia E, Basit AW. Spray-drying enteric polymers from aqueous solutions: A novel, economic, and environmentally friendly approach to produce pH-responsive microparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011;79(2):432-439.

Ali HSM, York P, Ali AMA, Blagden N. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. Journal of Controlled Release. 2011;149(2):175-181.

Alonzo DE, Gao Y, Zhou D, Mo H, Zhang GGZ, Taylor LS. Dissolution and precipitation behavior of amorphous solid dispersions. Journal Pharmaceutical Sciences. 2011;100(8):3316-3331.

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharmaceutical Research. 1995;12(3):413-420.

An JH, Kim JM, Chang SM, Kim WS. Application of Ionic Liquid to Polymorphic Design of Pharmaceutical Ingredients. Crystal Growth & Design. 2010;10(7):3044-3050.

Arsic J, Reynhout IC, van Enckevort WJP, Vlieg E. Growth and characterization of cesium halides with cubic morphologies. Journal of Crystal Growth. 2003;253(1–4):472-480.

Ashar Sultan M, Fonte CP, Dias MM, Lopes JCB, Santos RJ. Experimental study of flow regime and mixing in T-jets mixers. Chemical Engineering Science. 2012;73:388-399.

Aulton ME. Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design. 2 edition. Churchill Livingstone; 2002.

Azevedo AMO, Ribeiro DMG, Pinto PCAG, Lúcio M, Reis S, Saraiva MLMFS. Imidazolium ionic liquids as solvents of pharmaceuticals: Influence on HSA binding and partition coefficient of nimesulide. International Journal of Pharmaceutics. 2013;443(1–2):273-278.

Babu NJ, Nangia A. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. Crystal Growth & Design. 2011;11(7):2662-2679.

Barreiro EJ. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos : a descoberta de novo agente cardioativo. Quimica Nova. 2002;25(6B):1172-1180.

Basak AK, Raw AS, Al Hakim AH, Furness S, Samaan NI, Gill DS, et al. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 2007;59(1):64-72.

Beck C, Dalvi SV, Dave RN. Controlled liquid antisolvent precipitation using a rapid mixing device. Chemical Engineering Science. 2010;65(21):5669-5675.

Bellayer S, Viau L, Tebby Z, Toupance T, Bideau JL, Vioux A. Immobilization of ionic liquids in translucent tin dioxide monoliths by sol–gel processing. Dalton Transactions. 2009;(8):1307-13.

Bideau JL, Gaveau P, Bellayer S, Néouze M-A, Vioux A. Effect of confinement on ionic liquids dynamics in monolithic silica ionogels: 1H NMR study. Physical Chemistry Chemical Physics. 2007;9(40):5419-5422.

Bonhôte P, Dias A-P, Papageorgiou N, Kalyanasundaram K, Grätzel M. Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. Inorganic Chemistry. 1996;35(5):1168-1178.

Braga RC, Tôrres ACB, Persiano CB, Alves RO, Fraga CAM, Barreiro EJ, et al. Determination of the cardioactive prototype LASSBio-294 and its metabolites in dog plasma by LC–MS/MS: Application for a pharmacokinetic study. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011;55(5):1024-1030.

Brandt A, Hallett JP, Leak DJ, Murphy RJ, Welton T. The effect of the ionic liquid anion in the pretreatment of pine wood chips. Green Chemistry. 2010;12(4):672-679.

Brown C, Chokshi H, Nickerson B, Reed R, Rohrs B, Shah P. Acceptable Analytical Practices for Dissolution testing of poorly soluble compounds. Pharmaceutical Technology. 2004:56-65.

Cammarata L, Kazarian SG, Salter PA, Welton T. Molecular states of water in room temperature ionic liquids. Physical Chemistry Chemical Physics. 2001;3(23):5192-5200.

Carneiro EO, Andrade CH, Braga RC, Tôrres ACB, Alves RO, Lião LM, et al. Structure-based prediction and biosynthesis of the major mammalian metabolite of the cardioactive prototype LASSBio-294. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2010;20(12):3734-3736.

Carrera G, Aires-de-Sousa J. Estimation of melting points of pyridinium bromide ionic liquids with decision trees and neural networks. Green Chemistry. 2005;7(1):20-27.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. AAPS PharmSciTech. 2005;6(2):E329-E357.

Chaudhary A, Nagaich U, Gulati N, Sharma VK, Khosa RL. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research. 2012;2:32-67.

Chen A-Z, Zhao Z, Wang S-B, Li Y, Zhao C, Liu Y-G. A continuous RESS process to prepare PLA–PEG–PLA microparticles. The Journal of Supercritical Fluids. 2011;59:92-97.

Chen J, Sarma B, Evans JMB, Myerson AS. Pharmaceutical Crystallization. Crystal Growth & Design. 2011;11(4):887-895.

Chokshi RJ, Zia H, Sandhu HK, Shah NH, Malick WA. Improving the dissolution rate of poorly water soluble drug by solid dispersion and solid solution: pros and cons. Drug Delivery. 2007;14(1):33-45.

Christov M, Dohrn R. High-pressure fluid phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1994–1999). Fluid Phase Equilibria. 2002;202(1):153-218.

Coelho C, Trincão J, João Romão M. The use of ionic liquids as crystallization additives allowed to overcome nanodrop scaling up problems: A success case for producing diffraction-quality crystals of a nitrate reductase. Journal of Crystal Growth. 2010;312(5):714-719.

Constantinides PP. Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects. Pharmaceutical Research. 1995;12(11):1561-1572.

Costa DG, da Silva JS, Kümmerle AE, Sudo RT, Landgraf SS, Caruso-Neves C, et al. LASSBio-294, A compound with inotropic and lusitropic activity, decreases cardiac remodeling and improves $Ca^{2}(+)$ influx into sarcoplasmic reticulum after myocardial infarction. American Journal Hypertension. 2010;23(11):1220-1227.

Costa FN, Ferreira FF, da Silva TF, Barreiro EJ, Lima LM, Braz D, et al. Structure Re-determination of LASSBio-294 – a cardioactive compound of the N-acylhydrazone class – using X-ray powder diffraction data. Powder Diffraction. 2013;28(Supplement S2):S491-S509.

Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. European Journal Pharmaceutical Sciences. 2001;13(2):123-133.

Dalvi SV, Dave RN. Analysis of nucleation kinetics of poorly water-soluble drugs in presence of ultrasound and hydroxypropyl methyl cellulose during antisolvent precipitation. International Journal of Pharmaceutics. 2010;387(1–2):172-179.

Dalvi SV, Dave RN. Controlling Particle Size of a Poorly Water-Soluble Drug Using Ultrasound and Stabilizers in Antisolvent Precipitation. Industrial & Engineering Chemistry Research. 2009;48(16):7581-7593.

Date AA, Nagarsenker MS. Parenteral microemulsions: An overview. International Journal of Pharmaceutics. 2008;355(1–2):19-30.

David R, Espitalier F, Cameirão A. Developments in the understanding and modelling of agglomeration of suspended crystals in crystallization from solutions. KONA Powder and Particle. 2003;(21):40-63.

David R, Villermaux J. Interpretation of Micromixing Effects on Fast Consecutive-Competing Reactions in Semi-Batch Stirred Tanks by a Simple Interaction Model. Chemical Engineering Communications. 1987;54(1-6):333-352.

De Paiva Lacerda S. Improvement of dissolution rate of a new antiretroviral drug using an anti-solvent crystallization technology. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 2013.

De Zordi N, Moneghini M, Kikic I, Grassi M, Del Rio Castillo AE, Solinas D, et al. Applications of supercritical fluids to enhance the dissolution behaviors of Furosemide by generation of microparticles and solid dispersions. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2012;81(1):131-141.

Dean PM, Turanjanin J, Yoshizawa-Fujita M, MacFarlane DR, Scott JL. Exploring an Anti-Crystal Engineering Approach to the Preparation of Pharmaceutically Active Ionic Liquids. Crystal Growth & Design. 2009;9(2):1137-1145.

Del Pópolo MG, Lynden-Bell RM, Kohanoff J. Ab Initio Molecular Dynamics Simulation of a Room Temperature Ionic Liquid. Journal Physical Chemistry B. 2005;109(12):5895-902.

Deng J, Huang L, Liu F. Understanding the structure and stability of paclitaxel nanocrystals. International Journal of Pharmaceutics. 2010;390(2):242-249.

Dhumal RS, Biradar SV, Paradkar AR, York P. Particle engineering using sonocrystallization: Salbutamol sulphate for pulmonary delivery. International Journal of Pharmaceutics. 2009;368(1–2):129-137.

Dhumal RS, Biradar SV, Yamamura S, Paradkar AR, York P. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by sonoprecipitation for enhancement of bioavailability. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008;70(1):109-115.

DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. Journal Health Economics. 2003;22(2):151-185.

Dodds J, Espitalier F, Louisnard O, Grossier R, David R, Hassoun M, et al. The Effect of Ultrasound on Crystallisation-Precipitation Processes: Some Examples and a New Segregation Model. Particle and Particle Systems Characterization. 2007;24(1):18 - 28.

Dohrn R, Peper S, Fonseca JMS. High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (2000–2004). Fluid Phase Equilibria. 2010;288(1–2):1-54.

Dong K, Zhou G, Liu X, Yao X, Zhang S, Lyubartsev A. Structural Evidence for the Ordered Crystallites of Ionic Liquid in Confined Carbon Nanotubes. Journal Physical Chemistry C. 2009;113(23):10013-10020.

Dong Y, Ng WK, Shen S, Kim S, Tan RBH. Controlled antisolvent precipitation of spironolactone nanoparticles by impingement mixing. International Journal Pharmaceutics. 2011;410(1-2):175-179.

Dong Y, Ng WK, Shen S, Kim S, Tan RBH. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. International Journal of Pharmaceutics. 2009;375(1-2):84-88.

Dos Santos AD, Morais ARC, Melo C, Bogel-Łukasik R, Bogel-Łukasik E. Solubility of pharmaceutical compounds in ionic liquids. Fluid Phase Equilibria. 2013;356:18-29.

Douroumis D, Fahr A. Stable carbamazepine colloidal systems using the cosolvent technique. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007;30(5):367-374.

Du Z, Guan Y-X, Yao S-J, Zhu Z-Q. Supercritical fluid assisted atomization introduced by an enhanced mixer for micronization of lysozyme: Particle morphology, size and protein stability. International Journal of Pharmaceutics. 2011;421(2):258-268.

Eastoe J, Gold S, Rogers SE, Paul A, Welton T, Heenan RK, et al. Ionic liquid-in-oil microemulsions. Journal of the American Chemical Society. 2005;127(20):7302-7303.

Elimelech M, Gregory J, Jia X, Williams R. Particle Deposition & Aggregation. Butterworth-Heinemann; 1995.

EMEA EMA. Note for Guidance on the investigation of biovailability and bioequivalence. 2001.

Endres F, Bukowski M, Hempelmann R, Natter H. Electrodeposition of Nanocrystalline Metals and Alloys from Ionic Liquids. Angewandte Chemie International Edition. 2003;42(29):3428-3430.

Endres F. Ionic Liquids: Solvents for the Electrodeposition of Metals and Semiconductors. Chemical Physics and Physical Chemistry. 2002;3(2):144-154.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. 1997.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for industry; Waiver of in vivo bioavailibility and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Rockville; 2000.

Feng L, Chen Z. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. Journal of Molecular Liquids. 2008;142(1–3):1-5.

Ferreira AGM, Lobo LQ. Nitrous oxide: Saturation properties and the phase diagram. The Journal of Chemical Thermodynamics. 2009;41(12):1394-1399.

Flanner H, Moore J. Mathematical comparison of curves with an emphasis on in-vitro dissolution profiles. Pharmaceutical Technology. 1996;20(6):64-74.

Florence S, Konstantin S. Nanotechnology in concrete – A review. Construction and Building Materials. 2010;(11):2060-2071.

Forte A, Melo CI, Bogel-Łukasik R, Bogel-Łukasik E. A favourable solubility of isoniazid, an antitubercular antibiotic drug, in alternative solvents. Fluid Phase Equilibria. 2012;318(0):89-95.

Fraga AGM, da Silva LL, Fraga CAM, Barreiro EJ. CYP1A2-mediated biotransformation of cardioactive 2-thienylidene-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine (LASSBio-294) by rat liver microsomes and human recombinant CYP enzymes. European Journal of Medicinal Chemistry. 2011;46(1):349-355.

Fraga AGM. Avaliaçao do perfil metabolico in silico/in vitro de novo prototipo acilidrazonico cardioativo. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

Fredlake CP, Crosthwaite JM, Hert DG, Aki SNVK, Brennecke JF. Thermophysical Properties of Imidazolium-Based Ionic Liquids. Journal Chemical & Engineering Data. 2004;49(4):954-964.

Freire AC, Podczeck F, Sousa J, Veiga F. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II - Tipos de sistemas utilizados. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2006;42(3):337-355.

Freire MG, Santos LMNBF, Fernandes AM, Coutinho JAP, Marrucho IM. An overview of the mutual solubilities of water–imidazolium-based ionic liquids systems. Fluid Phase Equilibria. 2007;261(1–2):449-454.

Fröba AP, Kremer H, Leipertz A. Density, Refractive Index, Interfacial Tension, and Viscosity of Ionic Liquids [EMIM][EtSO4], [EMIM][NTf2], [EMIM][N(CN)2], and [OMA][NTf2] in Dependence on Temperature at Atmospheric Pressure. Journal Physical Chemistry B. 2008;112(39):12420-12430.

Fujita K, MacFarlane DR, Forsyth M. Protein solubilising and stabilising ionic liquids. Chemical Communications. 2005;(38):4804-4806.

Gao H, Li J, Han B, Chen W, Zhang J, Zhang R, et al. Microemulsions with ionic liquid polar domains. Physical Chemistry Chemical Physics. 2004;6(11):2914-2916.

Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. Journal Nanoparticle Research. 2008;10(5):845-862.

Gao W, Yu H, Zhou S. Determination of Imidazolium Ionic Liquid Cations by Ion-Pair Chromatography Using a Monolithic Column and Direct Conductivity Detection. Chromatographia. 2010;71(5-6):475-479.

Gao Y, Li N, Zheng L, Bai X, Yu L, Zhao X, et al. Role of solubilized water in the reverse ionic liquid microemulsion of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate/TX-100/benzene. Journal Physical Chemistry B. 2007;111(10):2506-2513.

Gao Y, Zhang J, Xu H, Zhao X, Zheng L, Li X, et al. Structural Studies of 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate/TX-100/ p-Xylene Ionic Liquid Microemulsions. ChemPhyChem. 2006;7(7):1554-1561.

Garcia E. Etude de la dissolution et la croissance de principes actifs. Thèse Doctorat. Université de Droit, Déconomie et des Sciences D'Aix-Marseille III, France, 2000.

Garekani HA, Sadeghi F, Badiee A, Mostafa SA, Rajabi-Siahboomi AR. Crystal habit modifications of ibuprofen and their physicomechanical characteristics. Drug Devevelopment Industrial Pharmacy. 2001;27(8):803-809.

Gatumel C. Précipitation du sulfate de baryum sous ultrasons :effets sur le micromélange et sur la nucléation. Thèse Doctorat. L'Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 1997.

Göbel R, Hesemann P, Weber J, Möller E, Friedrich A, Beuermann S, et al. Surprisingly high, bulk liquid-like mobility of silica-confined ionic liquids. Physical Chemistry Chemical Physics. 2009;11(19):3653-3662.

Gonfa G, Bustam M, Man Z, Abdul Mutalib M. Unique structure and solute-solvent interaction in imidazolium based ionic liquids: review. Asian Transactions on Engineering. 2011;24-34.

Gonzalez-Serratos H, Chang R, Pereira EFR, Castro NG, Aracava Y, Melo PA, et al. A Novel Thienylhydrazone, (2-Thienylidene)3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine, Increases Inotropism and Decreases Fatigue of Skeletal Muscle. Journal Pharmacology Expimental Therapeutics. 2001;299(2):558-566.

Good DJ, Rodríguez-Hornedo N. Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. Crystal Growth & Design. 2009;9(5):2252-2264.

Gowthamarajan K, Singh. Dissolution Testing for Poorly Soluble Drugs: A Continuing Perspective. Dissolution Technologies. 2010;24-32.

Greaves TL, Drummond CJ. Protic ionic liquids: properties and applications. Chemical Reviews. 2008;108(1):206-237.

Grodowska K, Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. Acta Poloniae Pharmaceutica. 2010;67(1):3-12.

Grossier R, Louisnard O, Vargas Y. Mixture segregation by an inertial cavitation bubble. Ultrason Sonochem. 2007;14(4):431-437.

Guo Z, Zhang M, Li H, Wang J, Kougoulos E. Effect of ultrasound on anti-solvent crystallization process. Journal of Crystal Growth. 2005;273(3–4):555-563.

Hao F, Haddad PR, Ruther T. IC Determination of Halide Impurities in Ionic Liquids. Chromatographia. 2008;67(5-6):495-498.

Hapiot P, Lagrost C. Electrochemical Reactivity in Room-Temperature Ionic Liquids. Chemical Reviews. 2008;108(7):2238-2264.

Hardacre C, Holbrey JD, Nieuwenhuyzen M, Youngs TGA. Structure and Solvation in Ionic Liquids. Accounts of Chemical Research. 2007;40(11):1146-1155.

Hasse B, Lehmann J, Assenbaum D, Wasserscheid P, Leipertz A, Fröba AP. Viscosity, Interfacial Tension, Density, and Refractive Index of Ionic Liquids [EMIM][MeSO3], [EMIM][MeOHPO2], [EMIM][OcSO4], and [BBIM][NTf2] in Dependence on Temperature at Atmospheric Pressure†. Journal of Chemical & Engineering Data. 2009;54(9):2576-2583.

Hawley M, Morozowich W. Modifying the Diffusion Layer of Soluble Salts of Poorly Soluble Basic Drugs To Improve Dissolution Performance. Molecular Pharmaceutics. 2010;7(5):1441-1449.

Hekmat D, Hebel D, Schmid H, Weuster-Botz D. Crystallization of lysozyme: From vapor diffusion experiments to batch crystallization in agitated ml-scale vessels. Process Biochemistry. 2007;42(12):1649-54.

Holbrey J, Seddon K. The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. Journal of The Chemical Society-Dalton Transactions. 1999;2133-2139.

Holbrey JD, Reichert WM, Nieuwenhuyzen M, Sheppard O, Hardacre C, Rogers RD. Liquid clathrate formation in ionic liquid–aromatic mixtures. Chemical Communications. 2003;(4):476-477.

Hough WL, Rogers RD. Ionic Liquids Then and Now: From Solvents to Materials to Active Pharmaceutical Ingredients. Bulletin Chemical Society Japan. 2007;80(12):2262-2269.

Hough WL, Smiglak M, Rodríguez H, Swatloski RP, Spear SK, Daly DT, et al. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. New Journal Chemistry. 2007;31(8):1429-1436.

Hough-Troutman WL, Smiglak M, Griffin S, Matthew Reichert W, Mirska I, Jodynis-Liebert J, et al. Ionic liquids with dual biological function: sweet and anti-microbial, hydrophobic quaternary ammonium-based salts. New Journal Chemistry. 2009;33(1):26-33.

Houlton S. Drug design-breaking the rules. Chemistry World. 2008;5:58-62.

Hu J, Ng WK, Dong Y, Shen S, Tan RBH. Continuous and scalable process for water-redispersible nanoformulation of poorly aqueous soluble APIs by antisolvent precipitation and spray-drying. International Journal Pharmaceutics. 2011;404(1-2):198-204.

Huang X, Yu H, Dong YJ. Rapid and simultaneous determination of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations by ion-pair chromatography using a monolithic column. Chinese Chemical Letters. 2012;23(7):843-846.

Huddleston JG, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. Green Chemistry. 2001;3(4):156-64.

Hulse WL, Grimsey IM, De Matas M. The impact of low-level inorganic impurities on key physicochemical properties of paracetamol. International journal of pharmaceutics. 2008;349(1-2):61-5.

Hurley FH, WIer TP. The Electrodeposition of Aluminum from Nonaqueous Solutions at Room Temperature. Journal Electrochemical Society. 1951;98(5):207-212.

ICH International Conference on Harmonisation, Guideline Topic Q3C (R4). Impurities: Guideline for Residual Solvents. 2009.

ICH- International Conference on Harmonisation. Validation of Analythical Procedures: Methodology. 1996.

ICH, International Conference on Harmonisation, Guideline Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2006.

Jacquemin J, Husson P, Majer V, Gomes MFC. Low-pressure solubilities and thermodynamics of solvation of eight gases in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. Fluid Phase Equilibria. 2006;240(1):87-95.

Jaitely V, Karatas A, Florence AT. Water-immiscible room temperature ionic liquids (RTILs) as drug reservoirs for controlled release. International Journal of Pharmaceutics. 2008;354(1–2):168-173.

Jastorff B, Störmann R, Ranke J, Mölter K, Stock F, Oberheitmann B, et al. How hazardous are ionic liquids? Structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. Green Chemistry. 2003;5(2):136-142.

Jaubert J-N, Mutelet F. VLE predictions with the Peng–Robinson equation of state and temperature dependent kij calculated through a group contribution method. Fluid Phase Equilibria. 2004;224(2):285-304.

Johnson BK, Prud'homme RK. Chemical processing and micromixing in confined impinging jets. AIChE journal. 2003;49(9):2264-2282.

Joshi M. Role of Eudragit in targeted drug delivery. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2013;5(2):58-62.

Judge RA, Takahashi S, Longenecker KL, Fry EH, Abad-Zapatero C, Chiu ML. The Effect of Ionic Liquids on Protein Crystallization and X-ray Diffraction Resolution. Crystal Growth & Design. 2009;9(8):3463-3469.

Kalia J, Raines RT. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. Angewandte Chemie International Edition. 2008;47(39):7523-7526.

Kararli TT, Kirchhoff CF, Truelove JE. Ionic strength dependence of dissolution for Eudragit S-100 coated pellets. Pharmaceutical Research. 1995;12(11):1813-1816.

Kawakami K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. Advanced Drug Delivery Reviews. 2012;64(6):480-495.

Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics. 2006;62(1):3-16.

Khoo S-M, Porter CJH, Charman WN. The formulation of Halofantrine as either non-solubilising PEG 6000 or solubilising lipid based solid dispersions: Physical stability and absolute bioavailability assessment. International Journal of Pharmaceutics. 2000;205(1–2):65-78.

Klein J-P, Boistelle R, Dugua J. Cristallisation industrielle - Aspects pratiques. Techniques de l'Ingénieur. 1994;1-32.

Kokot Z, Zmidzińska H. Solubility and dissolution rate of ibuprofen in ionic and non-ionic micellar systems. Acta Poloniae Pharmaceutica. 2001;58(2):117-120.

Kompella UB. Drug delivery applications of supercritical fluid technology. IDrugs. 1999;2(1):33-34.

Kosan B, Schwikal K, Meister F. Solution states of cellulose in selected direct dissolution agents. Cellulose. 2010;17(3):495-506.

Kroon MC, Shariati A, Costantini M, van Spronsen J, Witkamp G-J, Sheldon RA, et al. High-Pressure Phase Behavior of Systems with Ionic Liquids: Part V. The Binary System Carbon Dioxide + 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate. Journal Chemical & Engineering Data. 2005;50(1):173-176.

Kumar V, Malhotra SV. Synthesis of nucleoside-based antiviral drugs in ionic liquids. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008;18(20):5640-5642.

Kumar V, Wang L, Riebe M, Tung H-H, Prud'homme RK. Formulation and stability of itraconazole and odanacatib nanoparticles: governing physical parameters. Molecular Pharmaceutics. 2009;6(4):1118-1124.

Kümmerle AE, Raimundo JM, Leal CM, da Silva GS, Balliano TL, Pereira MA, et al. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene

N-acylhydrazone derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 2009;44(10):4004-4009.

Lahav M, Leiserowitz L. The effect of solvent on crystal growth and morphology. Chemical Engineering Science. 2001;56(7):2245-2253.

Lahiani-Skiba M, Barbot C, Bounoure F, Joudieh S, Skiba M. Solubility and dissolution rate of progesterone-cyclodextrin-polymer systems. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2006;32(9):1043-1058.

Lai F, Sinico C, Ennas G, Marongiu F, Marongiu G, Fadda AM. Diclofenac nanosuspensions: Influence of preparation procedure and crystal form on drug dissolution behaviour. International Journal of Pharmaceutics. 2009;373(1-2):124-132.

Le Y, Ji H, Chen J-F, Shen Z, Yun J, Pu M. Nanosized bicalutamide and its molecular structure in solvents. International Journal Pharmaceutics. 2009;370(1-2):175-180.

Lebret T, Giuliano F, Soria JC, Neuzillet Y. La vie d'une molécule, des essais à l'enregistrement : spécificité de l'oncologie. Progrès en Urologie. 2010;20:S1-S4.

Li X-S, Wang J-X, Shen Z-G, Zhang P-Y, Chen J-F, Yun J. Preparation of uniform prednisolone microcrystals by a controlled microprecipitation method. International Journal Pharmaceutics. 2007;342(1-2):26-32.

Lima PC, Lima LM, da Silva KCM, Léda PHO, de Miranda ALP, Fraga CAM, et al. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. European Journal of Medicinal Chemistry. 2000;35(2):187-203.

Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. A comparative study for nanoparticle production with passive mixers via solvent-displacement: Use of CFD models for optimization and design. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 2011;50(4):356-368.

Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Smart mixers and reactors for the production of pharmaceutical nanoparticles: Proof of concept. Chemical Engineering Research and Design. 2009;87(4):543-549.

Lindenberg C, Mazzotti M. Effect of temperature on the nucleation kinetics of α l-glutamic acid. Journal of Crystal Growth. 2009;311(4):1178-1184.

Lindenberg C, Schöll J, Vicum L, Mazzotti M, Brozio J. Experimental characterization and multi-scale modeling of mixing in static mixers. Chemical Engineering Science. 2008;63(16):4135-4149.

Lindenberg C. Optimizing the precipitation of organic compounds. Phd Thesis. Swiss Federal Institute of Technologie Zurich, Switzerland, 2009.

Lipsky MS, Sharp LK. From idea to market: the drug approval process. Journal of the American Board of Family Medicine. 2001;14(5):362-367.

Liu L, Bauduin P, Zemb T, Eastoe J, Hao J. Ionic Liquid Tunes Microemulsion Curvature. Langmuir. 2009;25(4):2055-2059.

Liu Y, Cheng C, Liu Y, Prud'homme RK, Fox RO. Mixing in a multi-inlet vortex mixer (MIVM) for flash nano-precipitation. Chemical Engineering Science. 2008;63(11):2829-2842.

Liu Z, Huang Y, Jin Y, Cheng Y. Mixing intensification by chaotic advection inside droplets for controlled nanoparticle preparation. Microfluid Nanofluid. 2010;9(4-5):773-786.

Lombardino JG, Lowe JA 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. Nature Reviews Drug Discovery. 2004;3(10):853-862.

Lourenço C, Melo CI, Bogel-Łukasik R, Bogel-Łukasik E. Solubility Advantage of Pyrazine-2-carboxamide: Application of Alternative Solvents on the Way to the Future Pharmaceutical Development. Journal Chemical & Engineering Data. 2012;57(5):1525-1533.

Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). Ultrasonics Sonochemistry. 2007;14(6):717-724.

Mahajan AJ, Kirwan DJ. Micromixing effects in a two-impinging-jets precipitator. AIChE Journal. 1996;42(7):1801-1814.

Manic MS, Najdanovic-Visak V. Solubility of erythromycin in ionic liquids. The Journal of Chemical Thermodynamics. 2012;44(1):102-106.

Markuszewski MJ, Stepnowski P, Marszałł MP. Capillary electrophoretic separation of cationic constituents of imidazolium ionic liquids. Electrophoresis. 2004;25(20):3450-3454.

Marsh KN, Boxall JA, Lichtenthaler R. Room temperature ionic liquids and their mixtures--a review. Fluid Phase Equilibria. 2004;219(1):93-98.

Mathieu C. Le CO2 supercritique : Un fluide prometteur dans la formulation pharmaceutique. Thèse Doctorat. Université Henri Poincare, Nancy 1, France, 2012.

Matzke M, Stolte S, Thiele K, Juffernholz T, Arning J, Ranke J, et al. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. Green Chemistry. 2007;9(11):1198-1207.

Maximiano FP, de Paula LM, Figueiredo VP, de Andrade IM, Talvani A, Sá-Barreto LC, et al. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011;78(3):377-384.

McClements DJ. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. Advances in Colloid and Interface Science. 2012;174(0):1-30.

McCrary PD, Beasley PA, Cojocaru OA, Schneider S, Hawkins TW, Perez JPL, et al. Hypergolic ionic liquids to mill, suspend, and ignite boron nanoparticles. Chemical Communications. 2012;48(36):4311-4313.

Melo CI, Bogel-Łukasik R, Nunes da Ponte M, Bogel-Łukasik E. Ammonium ionic liquids as green solvents for drugs. Fluid Phase Equilibria. 2013;338:209-216.

Meng X, Chen Y, Chowdhury SR, Yang D, Mitra S. Stabilizing dispersions of hydrophobic drug molecules using cellulose ethers during anti-solvent synthesis of micro-particulates. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2009;70(1):7-14.

Mersmann A. Crystallization Technology Handbook Hardcover. 2e éd. New York: Marcel Dekker; 2001.

Metha S, Khushwinder K. Ionic liquid microemulsions and their technological applications. Indian Journal of Chemistry. 2010;49A:662-684.

Miranda ALP, Lima PC, Tributino JLM, Melo PA, Fernandes PD, Cintra WM, et al. Abstracts du 6eme Congrès Annuel de la Sociéte Française de Pharmacologie. Rennes, France; 2002.

Mizuuchi H, Jaitely V, Murdan S, Florence AT. Room temperature ionic liquids and their mixtures: Potential pharmaceutical solvents. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;33(4-5):326-331.

Molíková M, Studzińska S, Kosobucki P, Jandera P, Buszewski B. Determination of Imidazolium and Pyridinium Ionic Liquid Cations by Ion Chromatography. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2009;33(2):225-238.

Moniruzzaman M, Goto M. Ionic Liquids : Future Solvents and Reagents for Pharmaceuticals. Journal of Chemical Engineering of Japan. 2011;44(4):370-381.

Moniruzzaman M, Kamiya N, Goto M. Ionic liquid based microemulsion with pharmaceutically accepted components: Formulation and potential applications. Journal Colloid and Interface Science. 2010c;352(1):136-142.

Moniruzzaman M, Tahara Y, Tamura M, Kamiya N, Goto M. Ionic liquid-assisted transdermal delivery of sparingly soluble drugs. Chemical Communications. 2010a;(46):1452-1454.

Moniruzzaman M, Tamura M, Tahara Y, Kamiya N, Goto M. Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation. International Journal of Pharmaceutics. 2010;400(1-2):243-250.

Moniruzzaman M, Tamura M, Tahara Y, Kamiya N, Goto M. Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: characterization and cytotoxicity evaluation. International Journal of Pharmaceutics. 2010b;400(1-2):243-250.

Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011;78(1):1-9.

Munto M, Ventosa N. Solubility behaviors of ibuprofen and naproxen drugs in liquid CO2-organic solvent mixtures. 2008;47:147-153.

Narducci O, Jones AG, Kougoulos E. An Assessment of the Use of Ultrasound in the Particle Engineering of Micrometer-Scale Adipic Acid Crystals. Crystal Growth & Design. 2011;11(5):1742-1749.

Ngo HL, LeCompte K, Hargens L, McEwen AB. Thermal properties of imidazolium ionic liquids. Thermochimica Acta. 2000;357–358:97-102.

Nielsen FS, Petersen KB, Müllertz A. Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: influence of droplet size and dietary state. European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008;69(2):553-562.

Olivier-Bourbigou H, Magna L, Morvan D. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. Applied Catalysis A: General. 2010;373(1–2):1-56.

Pardeike J, Strohmeier DM, Schrödl N, Voura C, Gruber M, Khinast JG, et al. Nanosuspensions as advanced printing ink for accurate dosing of poorly soluble drugs in personalized medicines. International Journal of Pharmaceutics. 2011;420(1):93-100.

Patel SR, Murthy ZVP. Effect of process parameters on crystal size and morphology of lactose in ultrasound-assisted crystallization. Crystal Research and Technology. 2011;46(3):243-248.

Patomchaiviwat V, Paeratakul O, Kulvanich P. Formation of Inhalable Rifampicin–Poly(l-lactide) Microparticles by Supercritical Anti-solvent Process. AAPS PharmSciTech. 2008;9(4):1119-1129.

Paulino AS, Rauber G, Campos CEM, Maurício MHP, de Avillez RR, Capobianco G, et al. Dissolution enhancement of Deflazacort using hollow crystals prepared by antisolvent crystallization process. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;49(2):294-301.

Pérez-Ramírez J, Kapteijn F, Schöffel K, Moulijn J. Formation and control of N2O in nitric acid production: Where do we stand today? Applied Catalysis B: Environmental. 2003;(2):117-151.

Pinkert A, Marsh KN, Pang S. Reflections on the Solubility of Cellulose. Industrial & Engineering Chemistry Research. 2010;49(22):11121-11130.

Poole CF, Poole SK. Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. Journal Chromatography A. 2010;1217(16):2268-2286.

Pringle JM, Golding J, Baranyai K, Forsyth CM, Deacon GB, Scott JL, et al. The effect of anion fluorination in ionic liquids—physical properties of a range of bis(methanesulfonyl)amide salts. New Journal Chemistry. 2003;27(10):1504-1510.

Pusey ML, Paley MS, Turner MB, Rogers RD. Protein Crystallization Using Room Temperature Ionic Liquids. Crystal Growth & Design. 2007;7(4):787-793.

Qin W, Wei H, Li SFY. Separation of ionic liquid cations and related imidazole derivatives by α-cyclodextrin modified capillary zone electrophoresis. Analyst. 2002;127(4):490-493.

Qin Y, Lu X, Sun N, Rogers RD. Dissolution or extraction of crustacean shells using ionic liquids to obtain high molecular weight purified chitin and direct production of chitin films and fibers. Green Chemistry. 2010;12(6):968-971.

Rasenack N, Müller BW. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. Pharmaceutical. Research. 2002;19(12):1894-1900.

Rasenack N, Steckel H, Müller BW. Micronization of anti-inflammatory drugs for pulmonary delivery by a controlled crystallization process. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003;92(1):35-44.

Remsing RC, Hernandez G, Swatloski RP, Massefski WW, Rogers RD, Moyna G. Solvation of Carbohydrates in N,N′-Dialkylimidazolium Ionic Liquids: A Multinuclear NMR Spectroscopy Study. The Journal of Physical Chemistry B. 2008;112(35):11071-11078.

Remsing RC, Swatloski RP, Rogers RD, Moyna G. Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: a 13C and 35/37Cl NMR relaxation study on model systems. Chem. Commun. (Camb.). 2006;(12):1271-1273.

Rohrs B. Dissolution method development for poorly soluble compounds. Dissolution Technologies. 2001;1-5.

Rojas O, Tiersch B, Rabe C, Stehle R, Hoell A, Arlt B, et al. Nonaqueous Microemulsions Based on N,N′-Alkylimidazolium Alkylsulfate Ionic Liquids. Langmuir. 2013;29(23):6833-6839.

Rollas S, Küçükgüzel S. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. Molecules. 2007;12(8):1910-1939.

Romero A, Santos A, Tojo J, Rodríguez A. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. Journal Hazardous Materials. 2008;151(1):268-273.

Roustan M, Pharamond J-C, Line A. Agitation. Mélange - Concepts théoriques de base. Techniques de l'Ingénieur. 1999;1-22.

Ruecroft G, Hipkiss D, Ly T, Maxted N, Cains PW. Sonocrystallization : The use of ultrasound for improved industrial crystallization. Organic process research & development. 2005;9(6):923-932.

Saadeh SM, Yasseen Z, Sharif FA, Abu Shawish HM. New room temperature ionic liquids with interesting ecotoxicological and antimicrobial properties. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2009;72(6):1805-1809.

Salazar J, Ghanem A, Müller RH, Möschwitzer JP. Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2012;81(1):82-90.

Schöll J, Vicum L, Müller M, Mazzotti M. Precipitation of L-Glutamic Acid: Determination of Nucleation Kinetics. Chemical Engineering & Technology. 2006;29(2):257-264.

Seddon KR, Stark A, Torres M-J. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. Pure and Applied Chemistry. 2000;(72):2275-2287.

Seedher N, Bhatia S. Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems. AAPS PharmSciTech. 2003;4(3):36-44.

Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. Advanced drug delivery reviews. 2007;59(7):603-616.

Shaabani A, Soleimani E, Maleki A. Ionic liquid promoted one-pot synthesis of 3-aminoimidazo[1,2- a]pyridines. Tetrahedron Letters. 2006;47(18):3031-3034.

Silva AG, Zapata-Sudo G, Kummerle AE, Fraga CAM, Barreiro EJ, Sudo RT. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2005;13(10):3431-3437.

Silva CLM, Noël F, Barreiro EJ. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio 294 in rat aorta. British Journal of Pharmacology. 2002;135(1):293-298.

Silva RL da, Volpato NM. Media for nimesulide tablet dissolution: surfactant action. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2002;38(2):163-172.

Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. International Journal of Pharmaceutics. 2013;453(1):126-141.

Siódmiak T, Marszałł MP, Proszowska A. Ionic liquids: a new strategy in pharmaceutical synthesis. Mini-Reviews in Organic Chemistry. 2012;9(2):203-208.

Slavtchev S, Mendes MA. Marangoni instability in binary liquid–liquid systems. International Journal of Heat and Mass Transfer. 2004;47(14):3269-3278.

Smith KB, Bridson RH, Leeke GA. Crystallisation of APIs from Ionic Liquids. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2010;62:1412-1413.

Smith KB, Bridson RH, Leeke GA. Solubilities of Pharmaceutical Compounds in Ionic Liquids. Journal of Chemical & Engineering Data. 2011;56(5):2039-2043.

Söhnel O, Garside J. Precipitation: basic principles and industrial applications. Butterworth-Heinemann; 1992, Oxford, UK.

Stepnowski P, Mrozik W. Analysis of selected ionic liquid cations by ion exchange chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Separation Science. 2005;28(2):149-154.

Sudo RT, Albuquerque EX, Barreiro EJ, Aracava Y, Cintra WM, Melo PA, et al. Thienylhydrazon with digitalis-like properties (positive inotropic effects). University of Maryland; 2006, *US Patent* 7,091,238B1.

Sudo RT, Zapata-Sudo G, Barreiro EJ. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. British Journal of Pharmacology. 2001;134(3):603-613.

Sun P, Armstrong DW. Ionic liquids in analytical chemistry. Analytica Chimica Acta. 2010;661(1):1-16.

Thorat AA, Dalvi SV. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. Chemical Engineering Journal. 2012;181–182:1-34.

Thuy Pham TP, Cho C-W, Yun Y-S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. Water Research. 2010;44(2):352-372.

Tomaszewska I, Karki S, Shur J, Price R, Fotaki N. Pharmaceutical characterisation and evaluation of cocrystals: Importance of in vitro dissolution conditions and type of coformer. International Journal of Pharmaceutics. 2013;453(2):380-388.

Trambouze P, Euzen J-P. Les Réacteurs chimiques : De la conception à la mise en oeuvre. 2002, Paris.

United States Pharmacopeia: National Formulary 2005.

Uusi-Penttilä MS, Rasmuson ÅC. Experimental Study for Agglomeration Behaviour of Paracetamol in Acetone–Toluene–Water Systems. Chemical Engineering Research and Design. 200381(4):489-495.

Uzagare MC, Sanghvi YS, Salunkhe MM. Application of ionic liquid 1-methoxyethyl-3-methyl imidazolium methanesulfonate in nucleoside chemistry. Green Chemistry. 2003;5(4):370-372.

Valderrama JO, Rojas RE. Critical Properties of Ionic Liquids. Revisited. Industrial Engineering & Chemistry Research. 2009;48(14):6890-6900.

Valderrama JO, Sanga WW, Lazzus JA. Critical Properties, Normal Boiling Temperature, and Acentric Factor of Another 200 Ionic Liquids. Industrial Engineering & Chemistry Research. 2008;47(4):1318-30.

van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? Nature Reviews Drug Discovery. 2003;2(3):192-204.

Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. International Journal of Pharmaceutics. 2008;364(1):64-75.

Veesler S, Mangin D, Puel F. Cristallisation - Aspects théoriques. Techniques de l'Ingénieur. 2005;1-16.

Venkatesh S, Li J, Xu Y, Vishnuvajjala R, Anderson BD. Intrinsic solubility estimation and pH-solubility behavior of cosalane (NSC 658586), an extremely hydrophobic diprotic acid. Pharmaceutical Research. 1996;13(10):1453-1459.

Verma S, Gokhale R, Burgess DJ. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. International Journal of Pharmaceutics. 2009;380(1-2):216-222.

Viçosa A, Letourneau J-J, Espitalier F, Inês Ré M. An innovative antisolvent precipitation process as a promising technique to prepare ultrafine rifampicin particles. Journal of Crystal Growth. 2012;342(1):80-87.

Villagrán C, Deetlefs M, Pitner WR, Hardacre C. Quantification of Halide in Ionic Liquids Using Ion Chromatography. Analytical Chemistry. 2004;76(7):2118-2123.

Virone C, Kramer HJM, van Rosmalen GM, Stoop AH, Bakker TW. Primary nucleation induced by ultrasonic cavitation. Journal of Crystal Growth. 2006;294(1):9-15.

Visser AE, Holbrey JD, Rogers RD. Hydrophobic ionic liquids incorporating N-alkylisoquinolinium cations and their utilization in liquid-liquid separations. Chemical Communications (Camb.). 2001;(23):2484-2485.

Vitu S, Privat R, Jaubert J-N, Mutelet F. Predicting the phase equilibria of CO2 + hydrocarbon systems with the PPR78 model (PR EOS and kij calculated through a group contribution method). The Journal of Supercritical Fluids. 2008;45(1):1-26.

Wade A, Weller PJ. Handbook of pharmaceutical excipients. 2nd edition, Washington : American Pharmaceutical association, London: pharmaceutical press, 1994.

Walden P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. St Petersbourg: Bulletin de l'Academie Imperiale des Sciences; 1914.

Wang Z, Chen J-F, Le Y, Shen Z-G, Yun J. Preparation of Ultrafine Beclomethasone Dipropionate Drug Powder by Antisolvent Precipitation. Industrial & Engineering Chemistry Research. 2007;46(14):4839-4845.

Wei L, Hervé M, Edouard P. Use of different rapid mixing devices for controlling the properties of magnetite nanoparticles produced by precipitation. Journal of Crystal Growth. 2012;342(1):21-27.

Welton T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. Chemical. Reviews. 1999;99(8):2071-2084.

Wilkes JS, Zaworotko MJ. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. Journal of the Chemical Society Chemical Communications. 1992;(13):965-967.

Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, et al. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. Pharmacology Reviews. 2013;65(1):315-499.

Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011;63(6):456-469.

Xia D, Quan P, Piao H, Piao H, Sun S, Yin Y, et al. Preparation of stable nitrendipine nanosuspensions using the precipitation-ultrasonication method for enhancement of dissolution and oral bioavailability. European Journal Pharmaceutical Sciences. 2010;40(4):325-334.

Xiong R, Lu W, Li J, Wang P, Xu R, Chen T. Preparation and characterization of intravenously injectable nimodipine nanosuspension. International Journal Pharmaceutics. 2008;350(1-2):338-343.

Yasuda T, Watanabe M. Protic ionic liquids: Fuel cell applications. MRS Bulletin. 2013;38(07):560-566.

Ye C, Shreeve JM. Rapid and Accurate Estimation of Densities of Room-Temperature Ionic Liquids and Salts. Journal Physical Chemistry A. 2007;111(8):1456-1461.

Yeo S-D, Lee J-C. Crystallization of sulfamethizole using the supercritical and liquid antisolvent processes. The Journal of supercritical fluids. 2004;30(3):315-323.

Zhang H, Hollis CP, Zhang Q, Li T. Preparation and antitumor study of camptothecin nanocrystals. International Journal of Pharmaceutics. 2011;415(1–2):293-300.

Zhang H, Wu J, Zhang J, He J. 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride Room Temperature Ionic Liquid: A New and Powerful Nonderivatizing Solvent for Cellulose. Macromolecules. 2005;38(20):8272-8277.

Zhang HX, Wang JX, Zhang ZB, Le Y, Shen ZG, Chen JF. Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. International Journal of Pharmaceutics. 2009;374(1-2):106-113.

Zhang J, Shen Z, Zhong J, Hu T, Chen J, Ma Z, et al. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants. International Journal of Pharmaceutics. 2006;323(1-2):153-160.

Zhang J, Wu L, Chan H-K, Watanabe W. Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011;63(6):441-455.

Zhang J, Zhang H, Wu J, Zhang J, He J, Xiang J. NMR spectroscopic studies of cellobiose solvation in EmimAc aimed to understand the dissolution mechanism of cellulose in ionic liquids. Physical Chemistry Chemical Physics. 2010;12(8):1941-1947.

Zhao H, Wang J-X, Wang Q-A, Chen J-F, Yun J. Controlled Liquid Antisolvent Precipitation of Hydrophobic Pharmaceutical Nanoparticles in a Microchannel Reactor. Industrial & Engineering Chemistry Research. 2007;46(24):8229-8235.

Zhu S, Wu Y, Chen Q, Yu Z, Wang C, Jin S, et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. Green Chemistry. 2006;8(4):325-327.

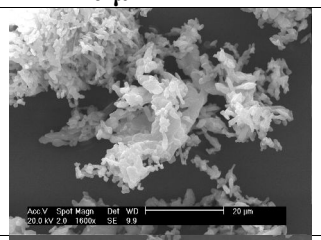
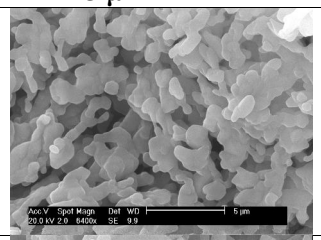
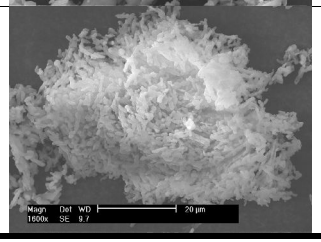
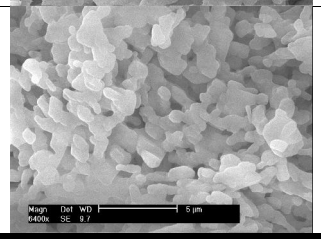
Annexes

Annexe 1

Dans cette annexe les résultats de la caractérisation des cristaux secs (diamètre moyen, faciès, rendement, pureté, teneur en LI) sont regroupés par type de paramètre étudié.

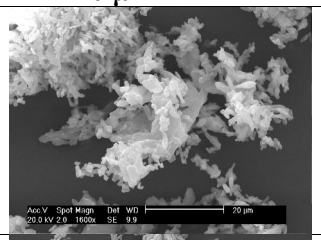
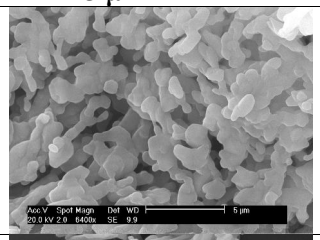
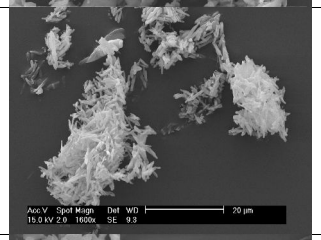
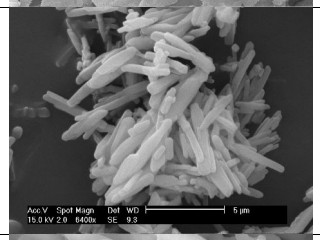
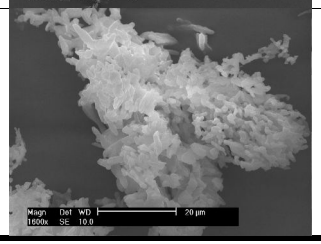
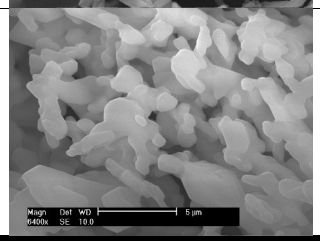
Essais avec pré-mélangeur

Tableau A1. 1. Influence du pré-mélangeur sur quelques propriétés de cristaux secs.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
Roughton (1)	D4,3 : 6,6 D3,2 : 3,0 Span : 2,6	8,82 ± 1,78 Adsorption rapide			93,0	100,32 ± 0,24	23644
Type T (2)	D4,3 : 7,2 D3,2 : 3,0 Span : 3,5	78,02 ± 3,41 Adsorption rapide			88,0	101,88 ± 0,49	19470

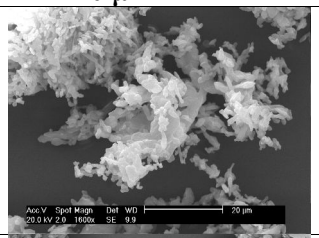
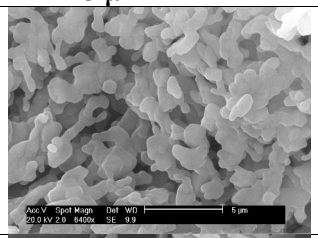
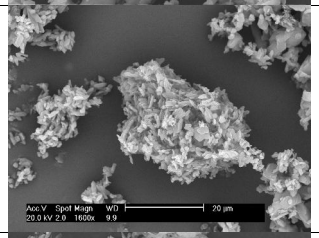
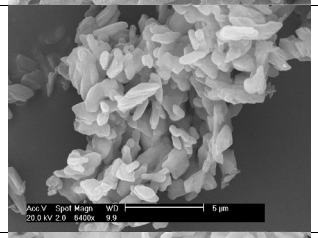
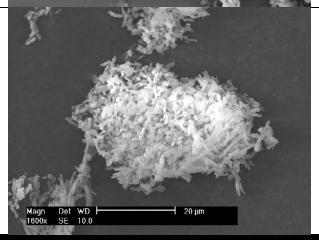
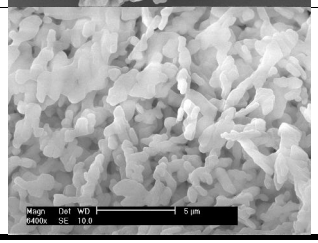
(Conditions opératoires : C_i =159 mg/g solution, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes et Ra eau/LI de 13,7; Séchage : étuve).

Tableau A1. 2. Influence de la vitesse d'agitation sur quelques propriétés de cristaux secs.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
800 tours/min (1)	D4,3 : 6,6 D3,2 : 3,0 Span : 2,6	8,82 ± 1,78 Adsorption rapide			93,0	100,32 ± 0,24	23644
600 tours/min (3)	D4,3 : 5,3 D3,2 : 3,0 Span : 2,0	123,29 ± 3,70			86,6	96,86 ± 0,54	2241
400 tours/min (4)	D4,3 : 8,6 D3,2 : 3,6 Span : 3,0	74,79 ± 2,88 Très chargé			91,4	94,36 ± 2,19	41878

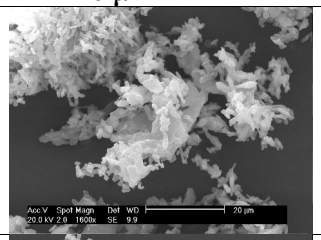
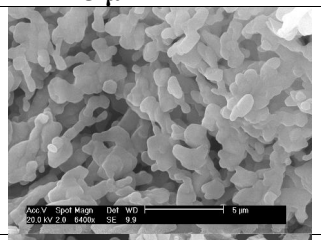
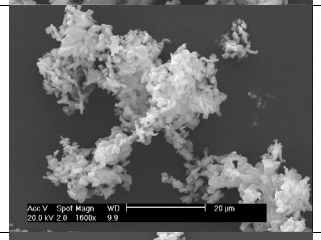
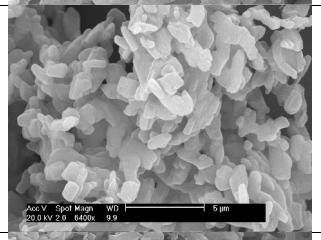
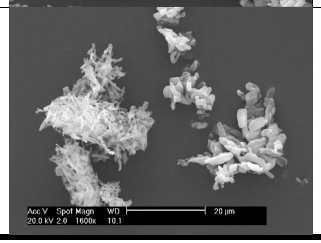
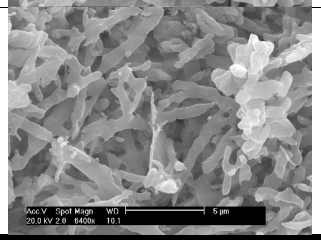
(Conditions opératoires : Pré-mélangeur : Roughton; Ci = 159 mg/g solution; Ra =13,7 pour N_v = 400 et 800 tours/min et Ra = 13,4 pour N_v = 600 tours/min, temps d'essai de 30 minutes; Séchage : étuve).

Tableau A1. 3. Influence de la concentration sur quelques propriétés de cristaux secs.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm))
159 mg/g solution (1)	D4,3 : 6,6 D3,2 : 3,0 Span : 2,6	8,82 ± 1,78 Adsorption rapide			93,0	100,32 ± 0,24	23644
91 mg/g solution (5)	D4,3 : 5,6 D3,2 : 2,8 Span : 2,4	105,35 ± 0,70 Adsorption rapide			95,3	104,47 ± 0,36	4291
57 mg/g solution (6)	D4,3 : 4,8 D3,2 : 2,4 Span : 2,6	120,45 ± 1,20 Adsorption rapide			85,1	100,60 ± 2,09	2708

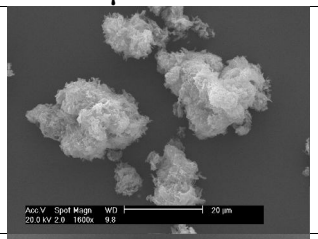
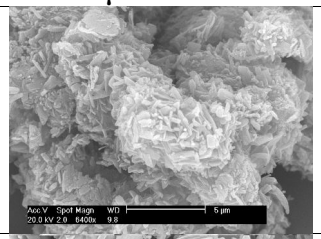
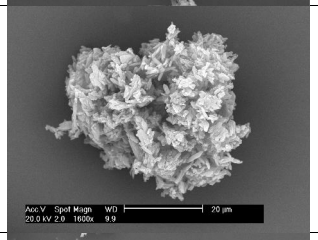
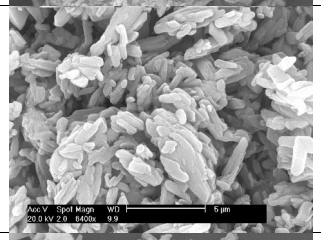
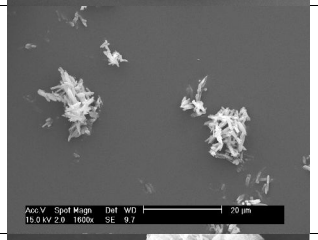
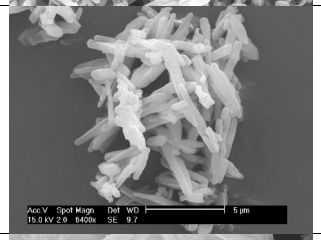
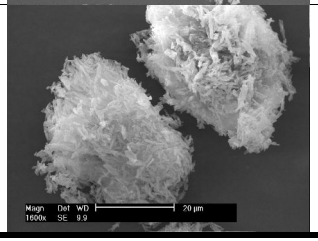
(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; N_v = 800 tours/min, Ra = 13 (91 mg/g solution), Ra =12,5 (57 mg/g solution) et Ra = 13,7 (159 mg/g solution), temps d'essai de 30 minutes; Séchage : étuve).

Tableau A1. 4. Influence du rapport massique eau/LI sur quelques propriétés de cristaux secs.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
Ra = 13,7 (1)	D4,3 : 6,6 D3,2 : 3,0 Span : 2,6	8,82 ± 1,78 Adsorption rapide			93,0	100,32 ± 0,24	23644
Ra = 9,5 (7)	D4,3 : 7,2 D3,2 : 3,6 Span : 2,3	99,97 ± 1,09 Adsorption rapide			94,5	96,14 ± 0,01	6642
Ra = 6,5 (8)	D4,3 : 8,6 D3,2 : 3,5 Span : 2,8	142,33!! Mauvais mouillage les particules recouvrent la goutte			92,7	83,97 ± 0,01	6000

(Conditions opératoires : Pré-mélangeur : Roughton; C_i =159 mg/g solution, N_v = 800 tours/min, temps d'essai de 30 minutes; Séchage : étuve).

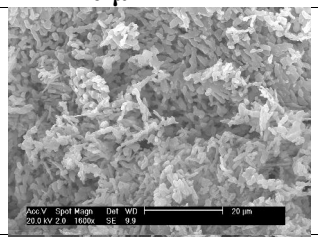
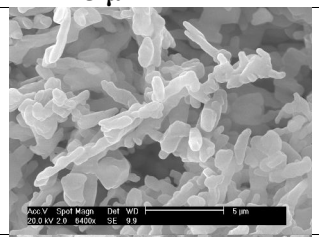
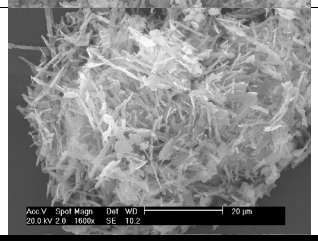
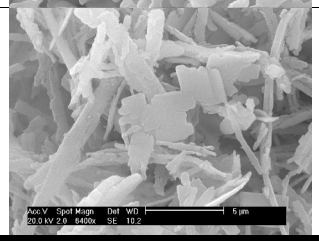
Tableau A1. 5. Influence du type d'additifs sur quelques propriétés de cristaux secs.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
HPMC 0,1% (9)	D4,3 : 38,2 D3,2 : 7,6 Span : 3,2	111,4 ± 1,27			88,4	81,84 ± 0,01	1783
Poloxamer 407 0,1% (10)	D4,3 : 11,4 D3,2 : 3,3 Span : 4,3	10,23 ± 0,25			93,0	85,13 ± 0,01	734
Tween 20 0,1% (11)	D4,3 : 9,9 D3,2 : 2,1 Span : 6,8	12,01 ± 0,01			88,9	-	965
Tween 20 0,5% (12)	D4,3 : 11,8 D3,2 : 2,0 Span : 5,7	7,91 ± 0,01 Adsorption rapide			91,7	86,50 ± 0,01	978

(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; C_i = 159 mg/g solution; N_v = 800 tours/min; temps d'essai de 30 minutes; Séchage : étuve).

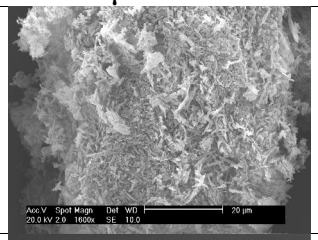
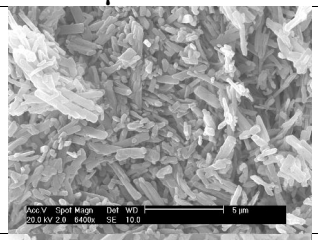
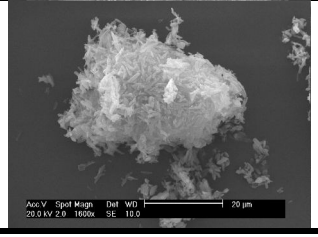
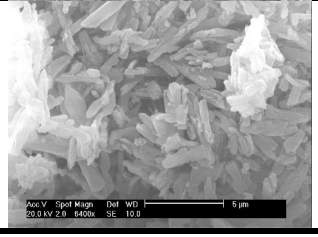
Essais sans pré-mélangeur

Tableau A1. 6. Effet du mode d'addition rapide sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus en absence d'ultrasons considérant une solution à 57 mg/$g_{solution}$.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
R, sans US (15)	D4,3 : 6,5 D3,2 : 2,7 Span : 3,0	81,12 ± 0,02 Mais recouvrement			77,2	97,76 ± 0,10	18240
GG, sans US (16)	D4,3 : 9,5 D3,2 : 3,1 Span : 4,5	146,80 ± 0,37			75,3	90,91 ± 0,99	1265

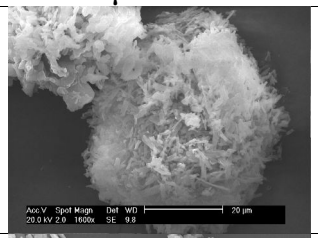
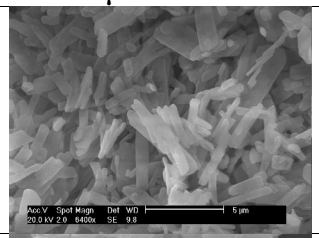
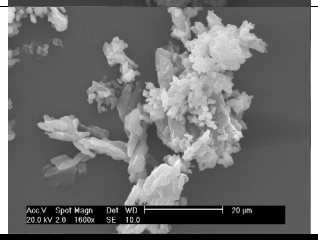
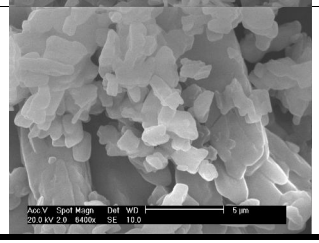
R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra = 4,7 (R) et Ra = 4,6 (GG), N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes; Séchage : étuve).

Tableau A1. 7. Effet du mode d'addition rapide sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus en présence d'ultrasons considérant une solution à 57 mg/$g_{solution}$.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
R, avec US (20)	D4,3 : 7,0 D3,2 : 2,1 Span : 4,5	137,50 ± 0,46			76,3	98,44 ± 0,06	1176
GG, avec US (22)	D4,3 : 11,0 D3,2 : 2,6 Span : 6,0	Pas de mouillage les particules se collent à la goutte			*	95,92 ± 0,64	935

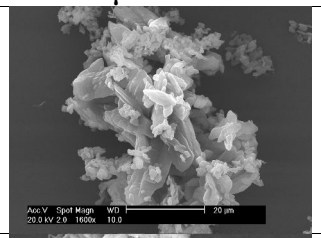
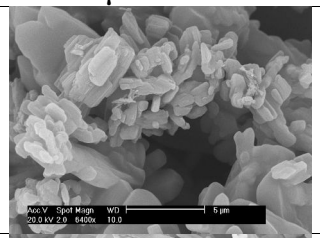
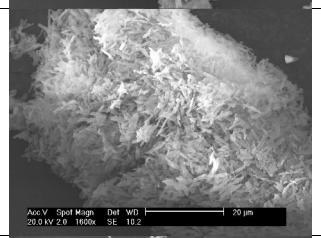
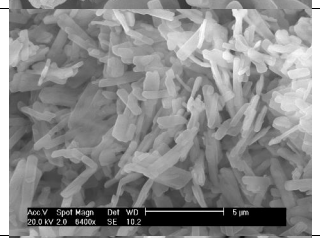
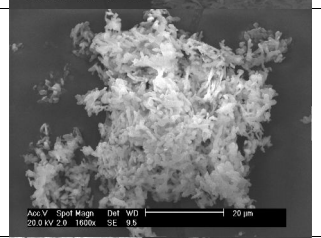
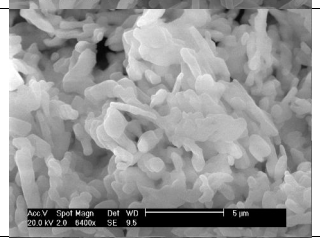
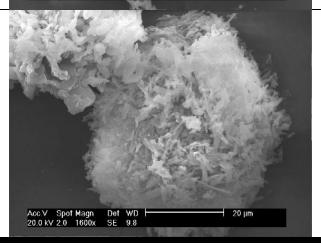
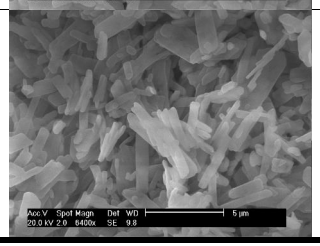
R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Conditions : Ra = 4,7 (R) et Ra = 4,6 (GG), N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes; Séchage : étuve). *Non mesuré.

Tableau A1. 8. Effet du mode d'addition sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus en absence des ultrasons considérant une solution à 159 mg/$g_{solution}$.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
R, avec US (19)	D4,3 : 6,1 D3,2 : 2,4 Span : 3,5	101,00 ± 0,61			*	92,25 ± 0,16	45674
GG, avec US (23)	D4,3 : 7,1 D3,2 : 3,2 Span : 2,6	107,39 ± 3,68			84,3	96,40 ± 1,02	13273

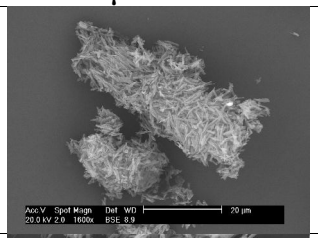
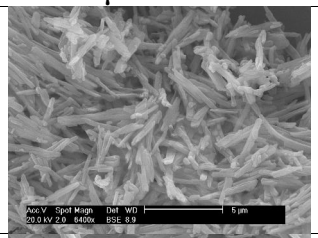
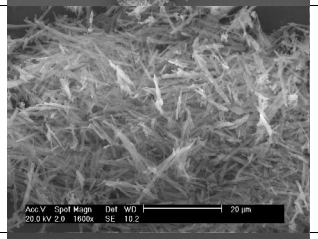
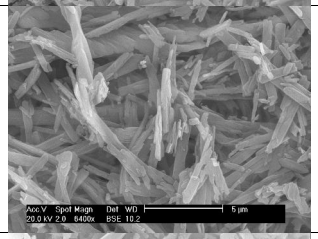
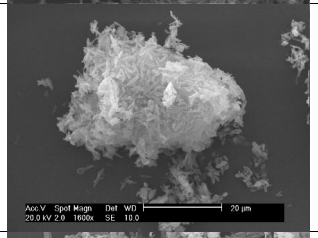
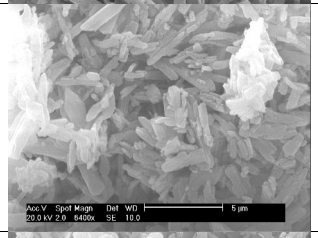
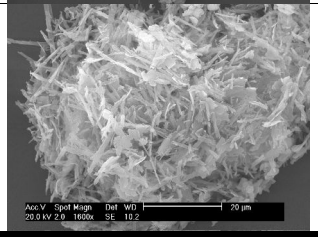
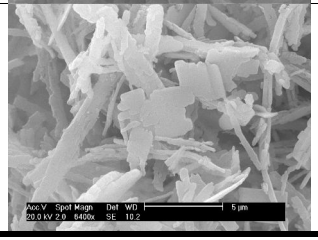
R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.
(Conditions : Ra eau/LI = 3,9 (R) et Ra eau/LI de 4,5 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, ultrasons 40 W, temps d'essai 30 minutes; Séchage : étuve). *Non mesuré.

Tableau A1. 9. Effet du mode d'addition rapide sur quelques propriétés de cristaux secs anti-solvant avec et sans ultrasons considérant différents rapport massique eau/LI.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
Sans US Ra =13,9 (13)	D4,3 : 6,4 D3,2 : 3,1 Span : 2,2	89,96 ± 2,6 Adsorption rapide			91,1	96,65 ± 0,08	6920
Avec US Ra =14,9 (18)	D4,3 : 7,3 D3,2 : 2,4 Span : 3,7	75,76 ± 3,41			98,0	96,10 ± 1,24	29904
Sans US Ra = 3,7 (14)	D4,3 : 7,1 D3,2 : 2,5 Span : 3,7	118,45 ± 2,46			86,3	97,04 ± 0,93	12055
Avec US Ra = 3,9 (19)	D4,3 : 6,1 D3,2 : 2,4 Span : 3,5	101,00 ± 0,61			*	92,25 ± 0,16	45674

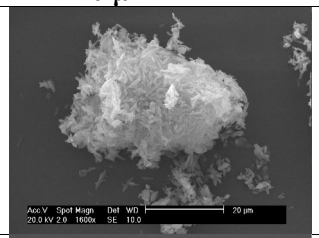
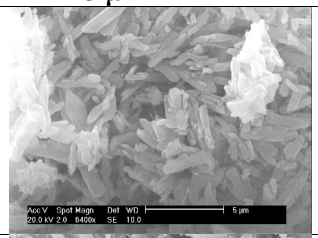
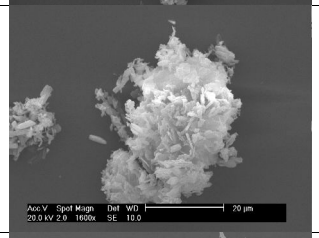
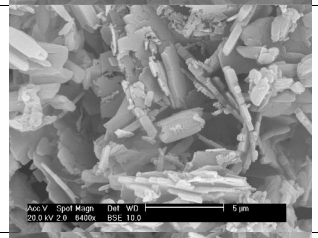
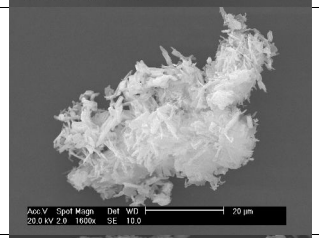
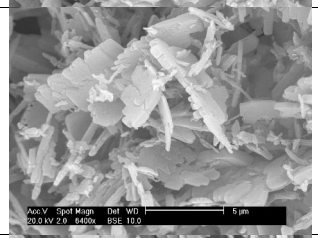
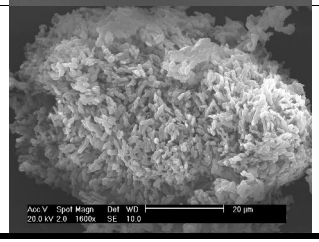
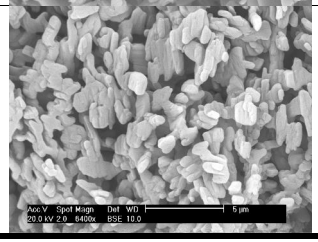
(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra eau/LI = 3,9 (R) et Ra eau/LI de 4,5 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes). *Non mesuré.

Tableau A1. 10. Effet du mode d'addition goutte-à-goutte sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus avec et sans ultrasons considérant différents rapport massique eau/LI.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
Avec US Ra = 13,1 (21)	D4,3 : 8,4 D3,2 : 1,8 Span : 8,4	137,50 ± 0,46			65,3	89,53 ± 0,28	933
Sans US Ra = 13,3 (17)	D4,3 : 7,7 D3,2 : 3,2 Span : 3,2	133,73 ± 0,86			83,1	97,69 ± 0,58	984
Avec US Ra = 4,6 (22)	D4,3 : 11,0 D3,2 : 2,6 Span : 6,0	Pas de mouillage les particules se collent à la goutte			*	95,92 ± 0,64	935
Sans US Ra = 4,6 (16)	D4,3 : 9,5 D3,2 : 3,1 Span : 4,5	146,80 ± 0,37			75,3	90,91 ± 0,99	1265

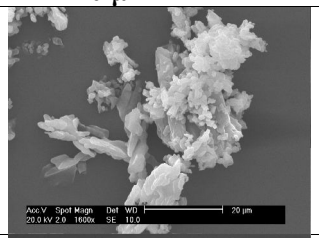
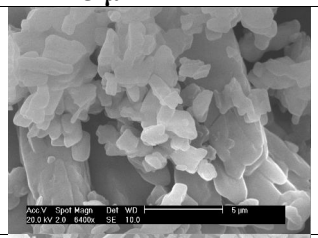
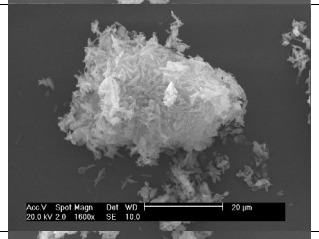
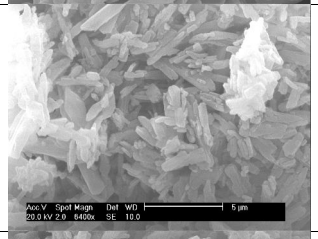
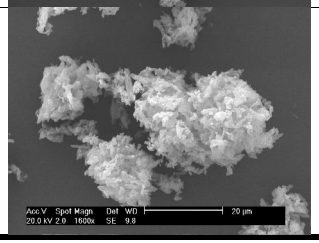
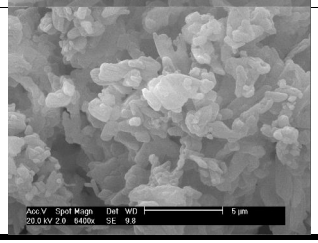
(Conditions opératoires : C_i = 57 mg/g solution; Ra eau/LI entre 4,6 et 13,3; N_v = 800 tours/min; ultrasons 40 W, temps d'essai : 30 minutes). *Non mesuré.

Tableau A1. 11. Effet de la puissance des US sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus en mode d'addition goutte-à-goutte.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
40 W (22)	D4,3 : 11,0 D3,2 : 2,6 Span : 6,0	Pas de mouillage les particules se collent à la goutte			*	95,92 ± 0,64	935
30 W (25)	D4,3 : 9,4 D3,2 : 2,7 Span : 5,0	140,43 ± 0,72			78,4	98,94 ± 0,15	904
20 W (26)	D4,3 : 8,1 D3,2 : 3,1 Span : 3,8	133,27 ± 0,47			86,4	104,32 ± 0,31	1414
10 W (27)	D4,3 : 5,8 D3,2 : 2,8 Span : 2,4	124,29 ± 0,87			87,7	85,43 ± 0,54	9517

(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI entre 4,6 à 4,9; N_v = 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes). *Non mesuré.

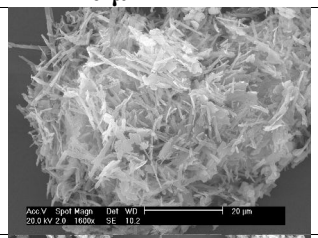
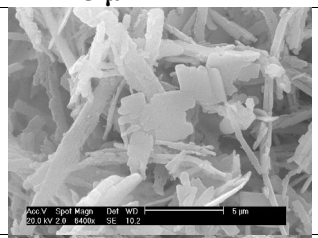
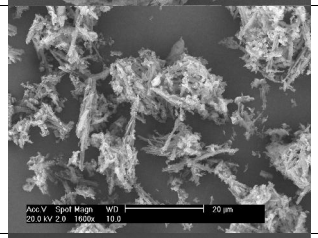
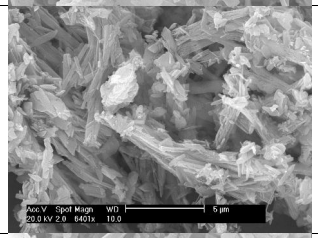
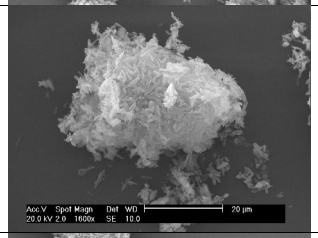
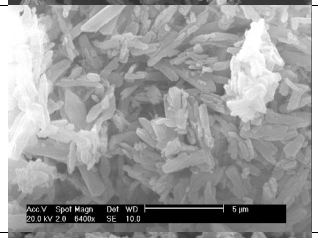
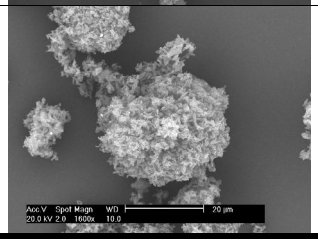
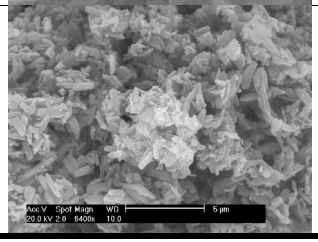
Tableau A1. 12. Effet de la concentration sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus en mode d'addition goutte-à-goutte.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
159 mg/g (23)	D4,3 : 7,1 D3,2 : 3,2 Span : 2,6	107,39 ± 3,68			84,3	96,40 ± 1,02	13273
57 mg/g (22)	D4,3 : 11,0 D3,2 : 2,6 Span : 6,0	Pas de mouillage les particules se collent à la goutte			*	95,92 ± 0,64	956
29 mg/g (24)	D4,3 : 16,2 D3,2 :3,8 Span : 3,8	133,71 ± 0,89			71,8	96,46 ± 0,95	887

(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra eau/LI entre 4,5 et 4,7; N_v = 800 tours/min; ultrasons 40 W, temps d'essai : 30 minutes). *Non mesuré.

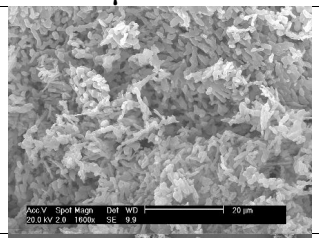
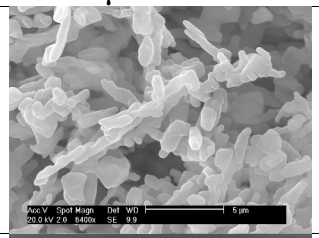
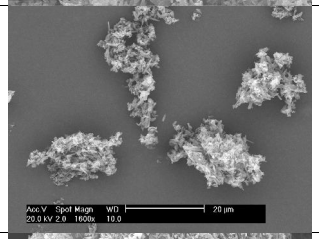
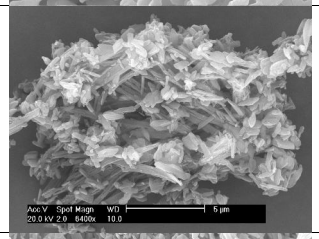
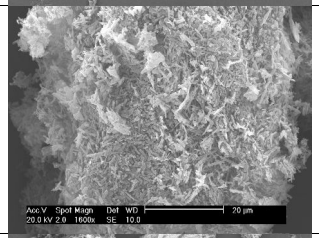
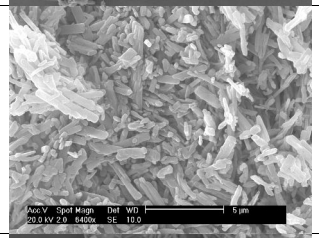
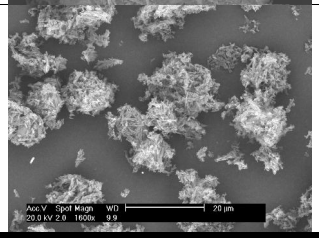
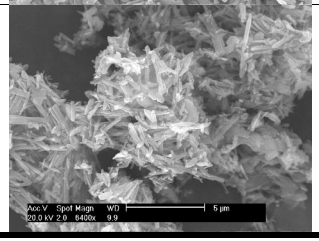
Essais sans pré-mélangeur – Mode de séchage

Tableau A1. 13. Effet du mode d'addition goutte-à-goutte sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus considérant le séchage par étuve et atomisation.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
Étuve, sans US (16)	D4,3 : 9,5 D3,2 : 3,1 Span : 4,5	146,80 ± 0,37			75,3	90,91 ± 0,99	1265
Atomisé, sans US (16)	D4,3 : 4,6 D3,2 : 1,7 Span : 4,1	*			*	89,7 ± 0,23	1100
Étuve, avec US (22)	D4,3 : 11,0 D3,2 : 2,6 Span : 6,0	Pas de mouillage les particules se collent à la goutte			*	95,92 ± 0,64	935
Atomisé, avec US (22)	D4,3 : 3,6 D3,2 : 1,4 Span : 4,3	*				97,08 ± 0,11	785

(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). *Non mesurés.

Tableau A1. 14. Effet du mode d'addition rapide sur quelques propriétés de cristaux secs obtenus considérant le séchage par étuve et atomisation.

Essai	Taille (µm)	Angle contact (°)	Images (1600x) 20 µm	Images (6400x) 5 µm	Rendement (%)	Pureté (%)	Teneur en LI (ppm)
Étuve, sans US (15)	D4,3 : 6,5 D3,2 : 2,7 Span : 3,0	81,12 ± 0,02 Mais recouvrement			77,2	97,76 ± 0,10	18240
Atomisé, sans US (15)	D4,3 : 4,8 D3,2 : 1,5 Span : 7,4	*			*	87,79 ± 0,13	1319
Étuve, avec US (20)	D4,3 : 7,0 D3,2 : 2,1 Span : 4,5	137,50 ± 0,46			76,3	98,44 ± 0,06	1176
Atomisé, avec US (20)	D4,3 : 4,2 D3,2 : 1,3 Span : 5,5	*			*	94,04 ± 0,20	1185

(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). *Non mesurés

Annexe 2

Dans cette annexe les résultats de la caractérisation par RX sont regroupés par type de paramètre étudié.

Essais avec pré-mélangeur

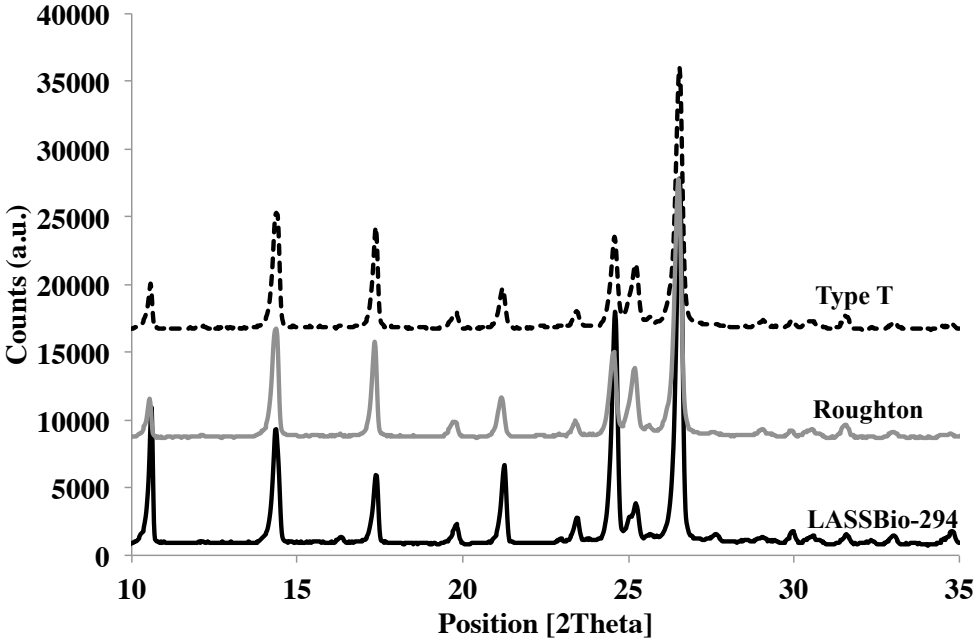


Figure A2. 1. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du type du mélangeur.
(Conditions opératoires : C_i =159 mg/g solution, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes et Ra eau/LI de 13,7; Séchage : étuve).

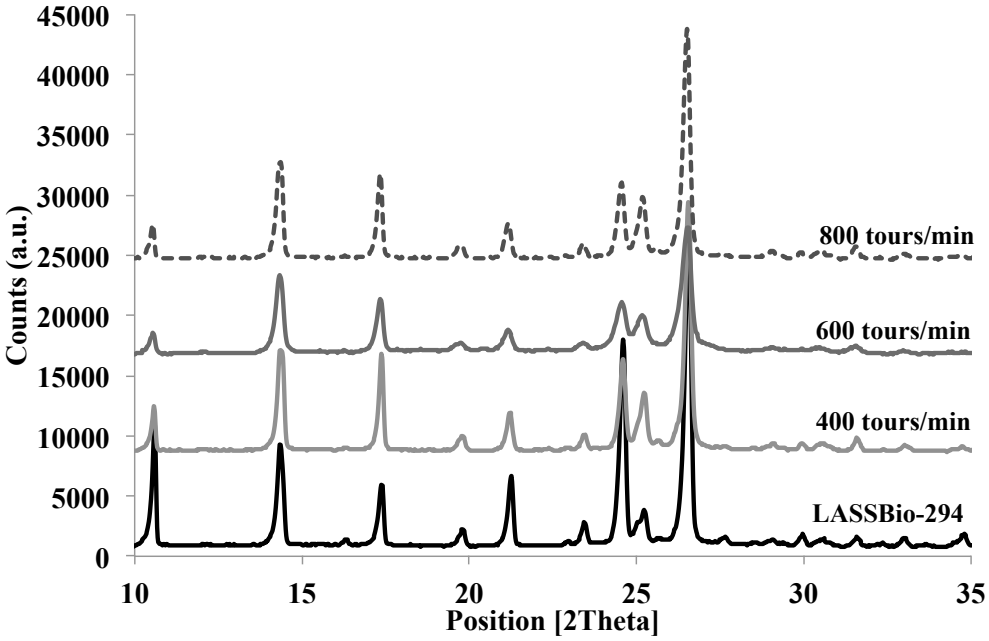


Figure A2. 2. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence de la vitesse d'agitation.
(Conditions opératoires : Pré-mélangeur : Roughton; Ci = 159 mg/g solution; Ra =13,7 pour N_v = 400 et 800 tours/min et Ra = 13,4 pour N_v = 600 tours/min, temps d'essai de 30 minutes; Séchage : étuve).

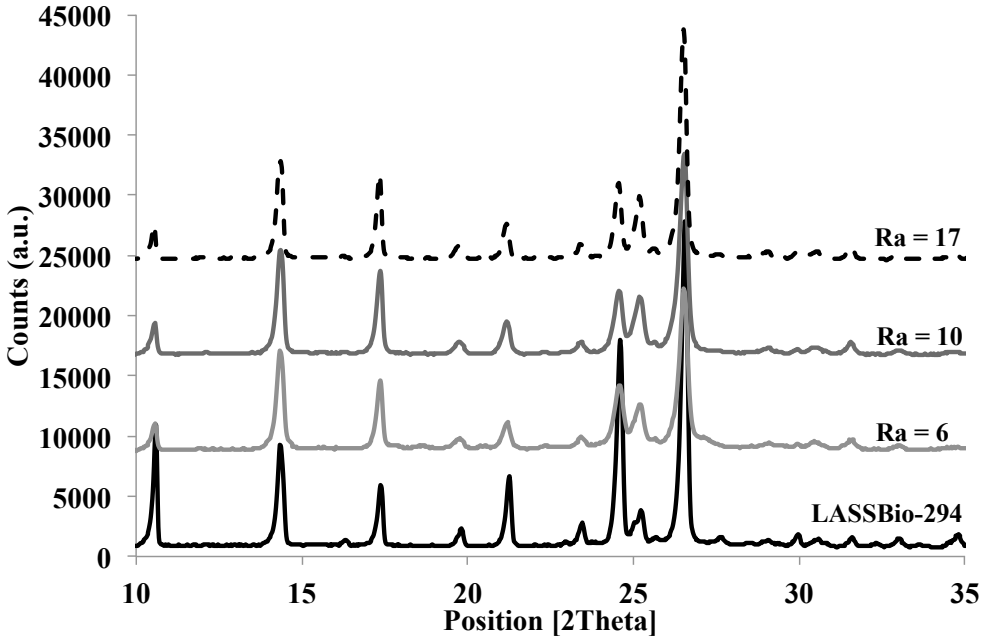


Figure A2. 3. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence Rapport massique eau/LI.
(Conditions opératoires : Pré-mélangeur : Roughton; C_i =159 mg/g solution, N_v = 800 tours/min, temps d'essai de 30 minutes; Séchage : étuve).

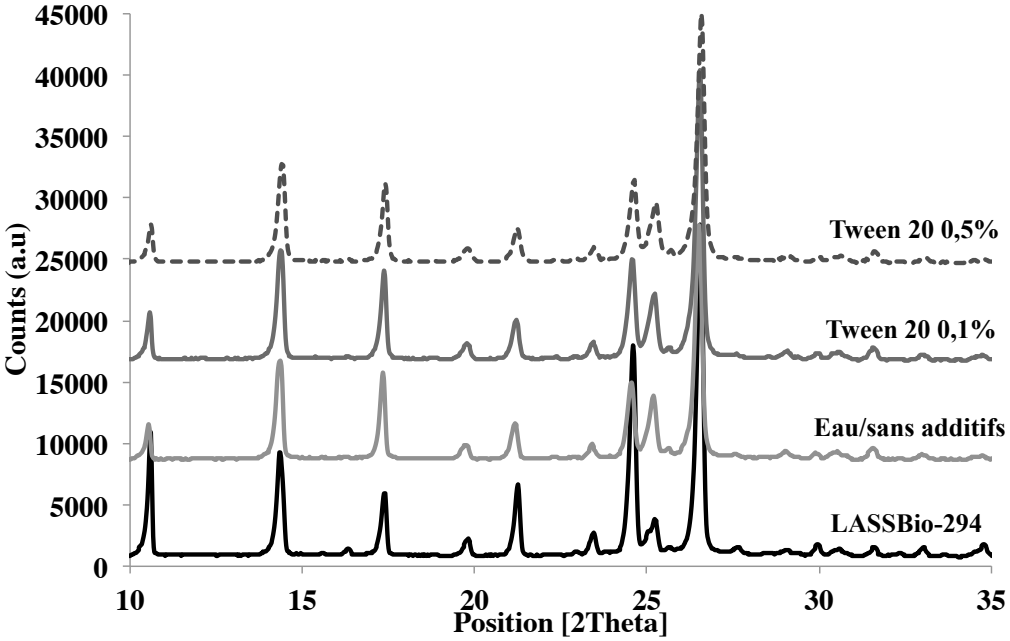


Figure A2. 4. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du type anti-solvant - Tween 20 à 0,1 et 0,5%.
(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; C_i = 159 mg/g solution; N_v = 800 tours/min; temps d'essai de 30 minutes, Séchage : étuve).

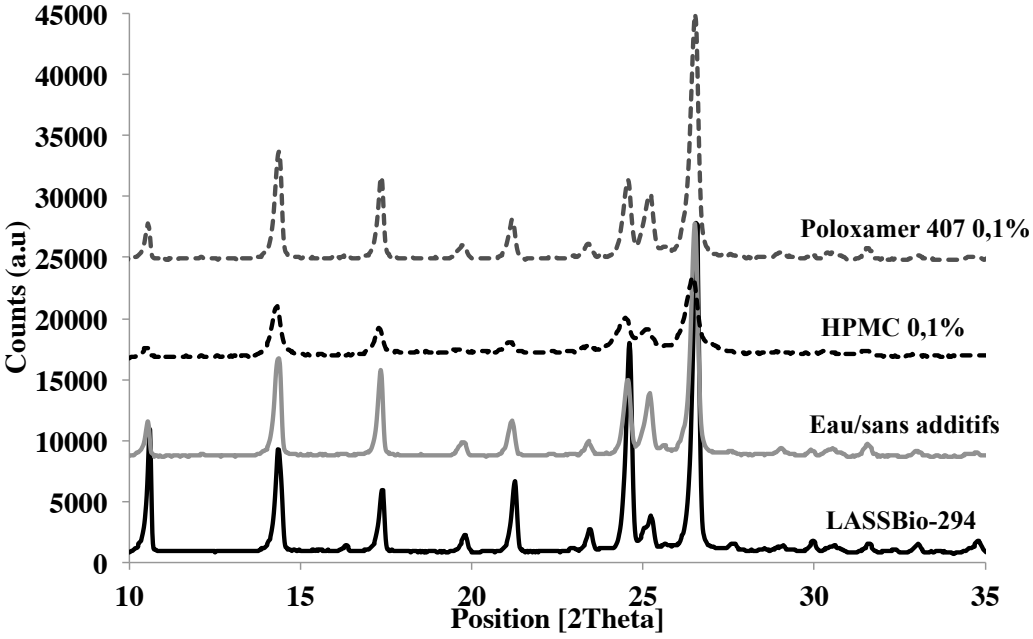


Figure A2. 5. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du type anti-solvant – Poloxamer 407 0,1% et HPMC 0,1.
(Conditions opératoires: Pré-mélangeur : Roughton; C_i = 159 mg/g solution; N_v = 800 tours/min; temps d'essai de 30 minutes, Séchage : étuve).

Essais sans pré-mélangeur

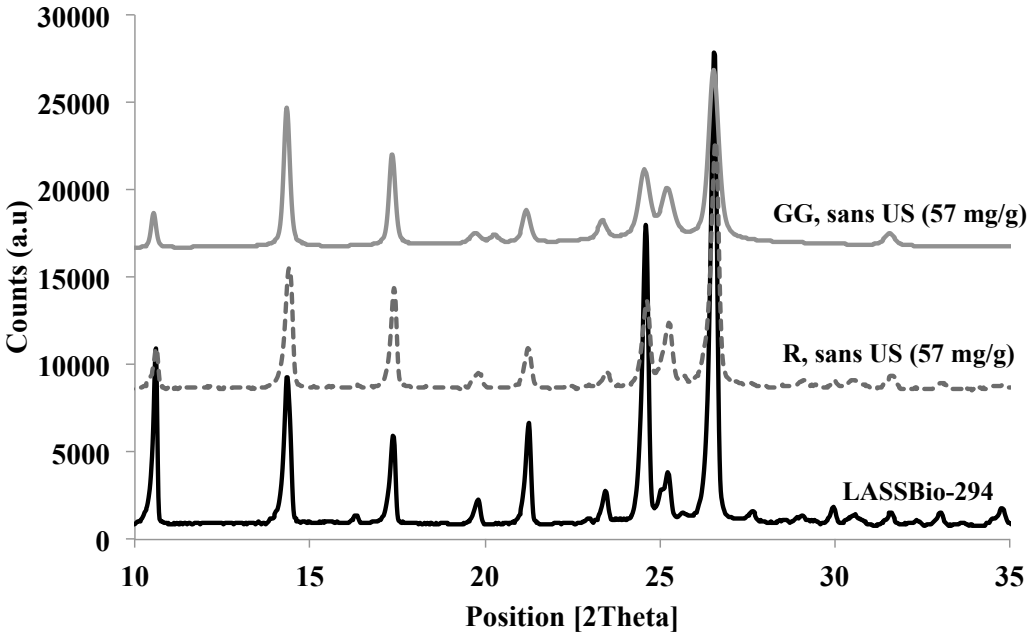


Figure A2. 6. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du mode d'addition (rapide et goutte-à-goutte) en absence d'ultrasons.
(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra = 4,7 (R) et Ra = 4,6 (GG), N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes, Séchage : étuve).

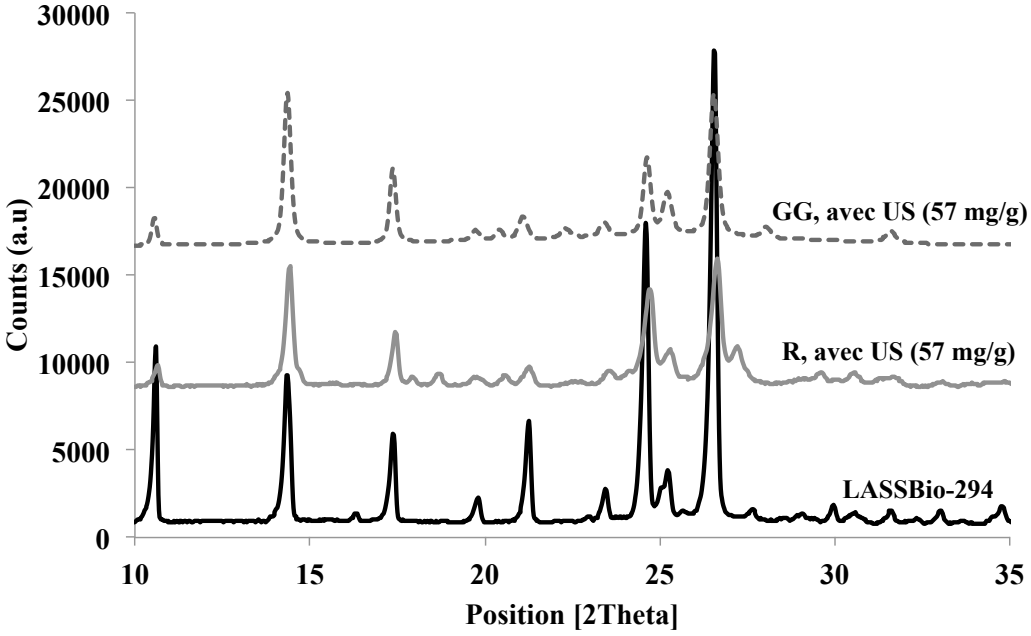


Figure A2. 7. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du mode d'addition (rapide et goutte-à-goutte) en présence d'ultrasons.
(Conditions : Ci = 57 mg/g solution, Ra = 4,7 (R) et Ra = 4,6 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes, Séchage : étuve).

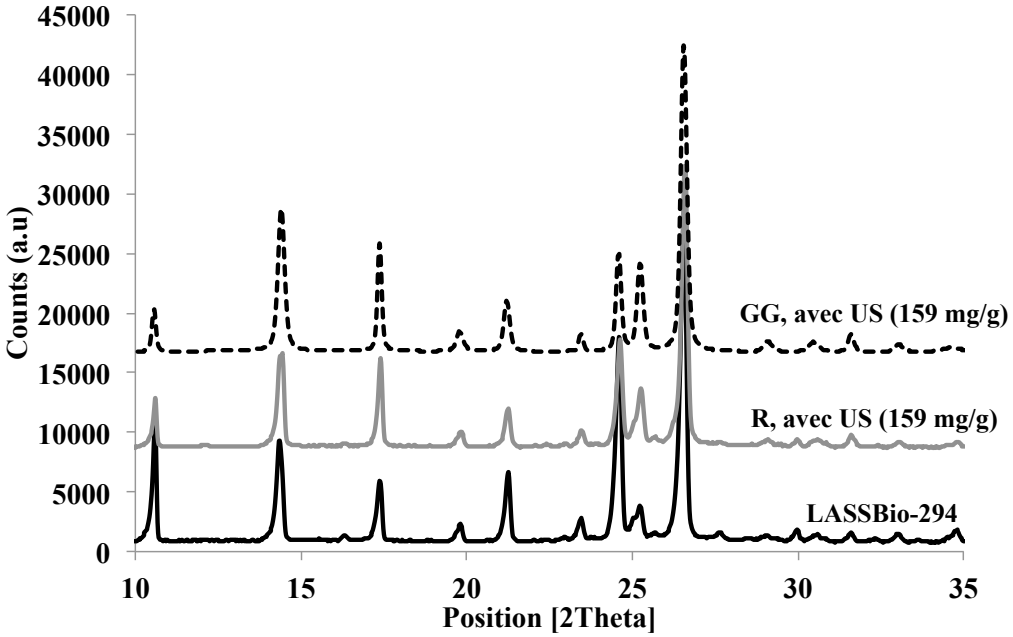


Figure A2. 8. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du mode d'addition (rapide et goutte-à-goutte) en présence d'ultrasons.

(Conditions : Ci = 159 mg/g solution, Ra eau/LI = 3,9 (R) et Ra eau/LI de 4,5 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes, Séchage : étuve).

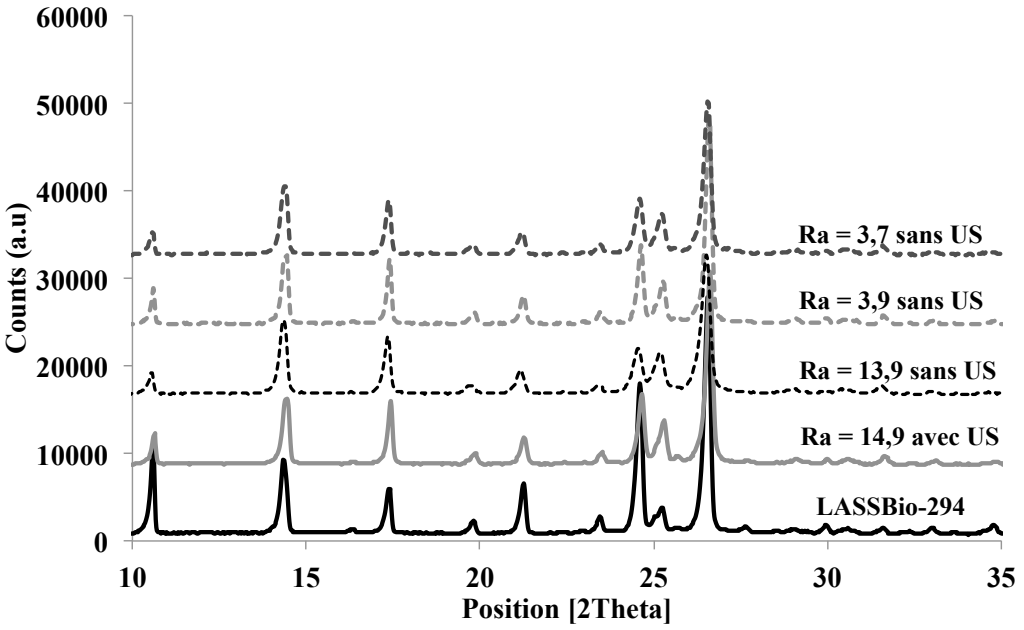


Figure A2. 9. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence des ultrasons en mode d'addition rapide avec différents rapports eau/LI.

(Conditions opératoires : C_i = 159 mg/g solution; Ra eau/LI entre 3,7 et 14,9; N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes, Séchage : étuve).

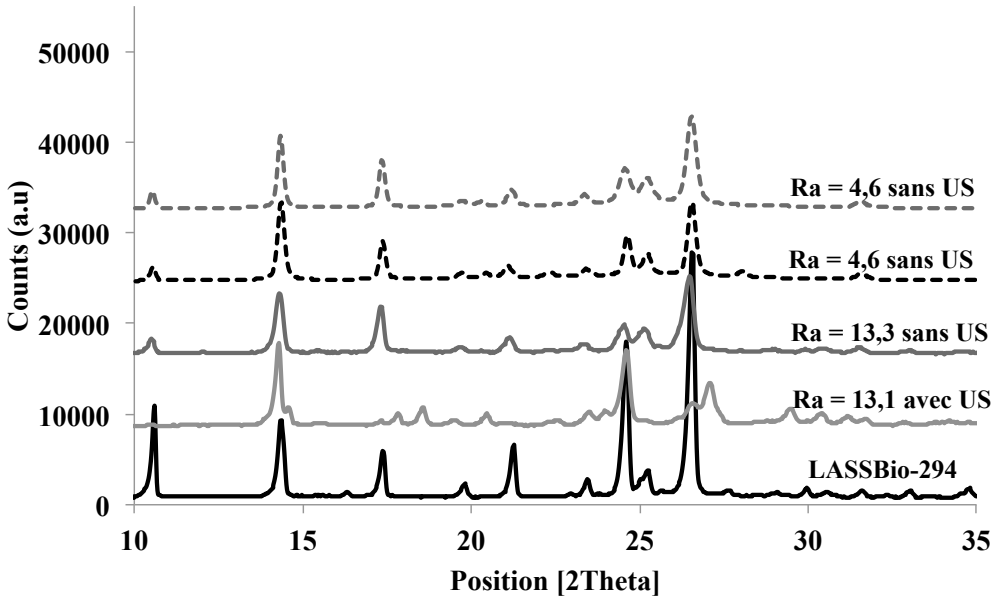


Figure A2. 10. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence des ultrasons en mode goutte-à-goutte avec différents rapports eau/LI.

(Conditions opératoires : C_i = 159 mg/g solution; Ra eau/LI entre 3,7 et 14,9; N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes, Séchage : étuve).

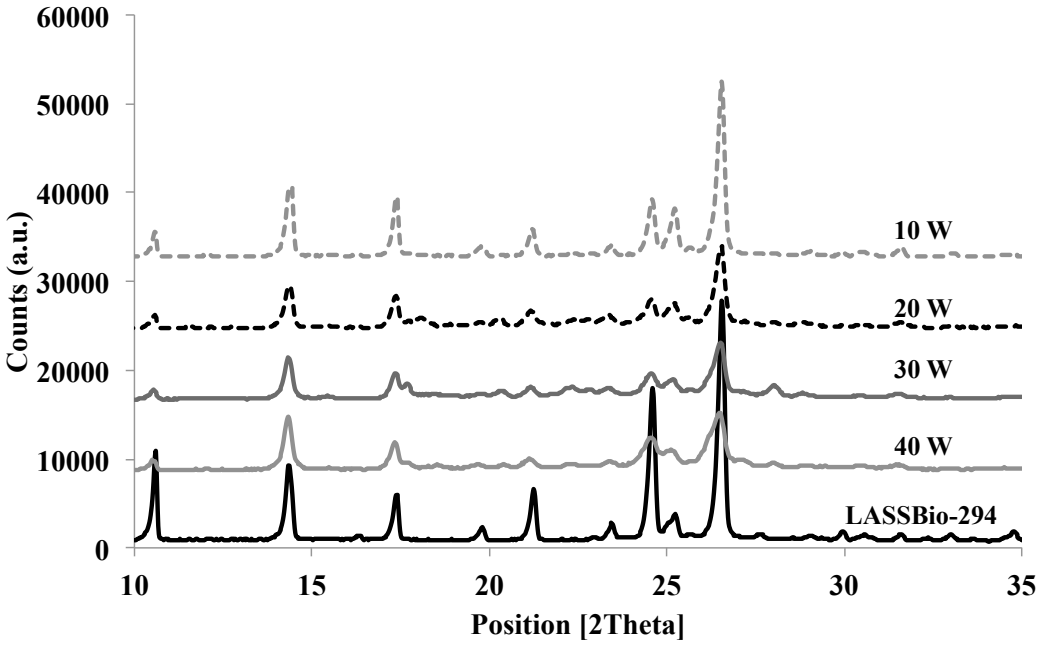


Figure A2. 11. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence de la puissance d'ultrasons en mode goutte-à-goutte.

(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI entre 4,6 à 4,9; N_v = 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes, Séchage : étuve).

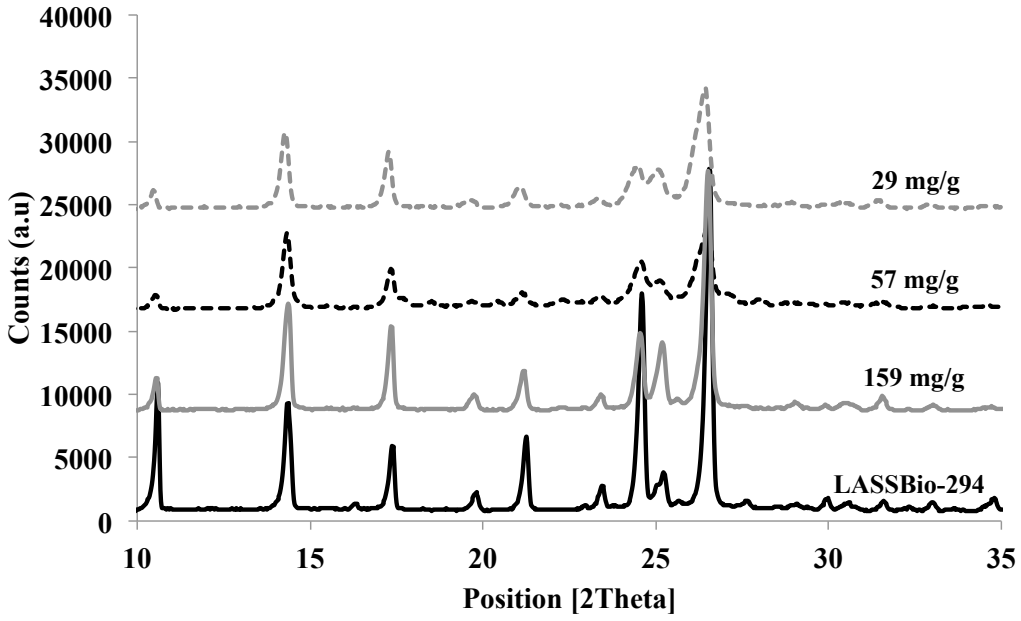


Figure A2. 12. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence de la concentration de la solution en mode goutte-à-goutte en présence d'ultrasons.
(Conditions opératoires : Ra eau/LI entre 4,5 et 4,7; N_v = 800 tours/min; temps d'essai : 30 minutes, Séchage : étuve).

Essais sans pré-mélangeur - Mode de séchage

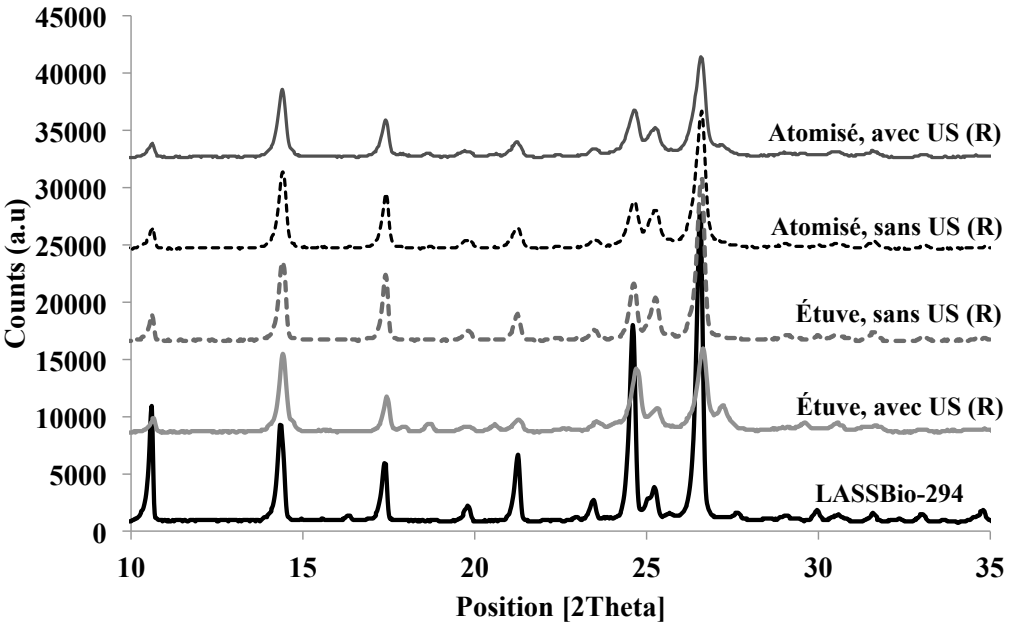


Figure A2. 13. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du processus de séchage pour des cristaux obtenus en mode d'addition rapide.
(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

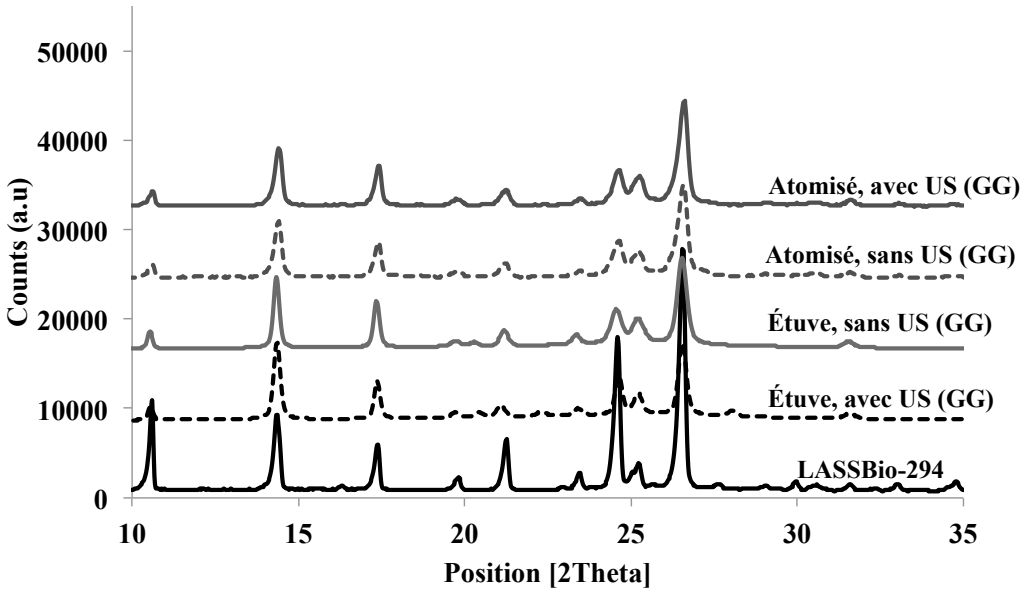


Figure A2. 14. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous ses formes originale et recristallisée : Influence du processus de séchage pour des cristaux obtenus en mode d'addition goutte-à-goutte.
(Conditions : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

Annexe 3

Partie 1 : Étude de la dissolution in vitro des cristaux de LASSBio-294 synthétisés

Tableau A3. 1. Facteurs de différence et de similarité, *f1* et *f2,* calculés pour les courbes de dissolution des cristaux obtenus avec et sans pré-mélangeur Roughton – séchage en étuve

Essai	Mode d'addition**	facteur de différence *f1**	facteur de similarité *f2**	Paramètres de cristallisation
2	Avec pré-mélangeur	102,0	29,4	Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI 12,5 (avec pré-mélangeur); Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). *Pour le calcul des facteurs *f1* et *f2* le produit de référence est le LASSBio-294 initial (Test 1 pour les conditions de dissolution)
15	R sans US	94,3	31,6	
20	R avec US	117,4	27,4	
16	GG sans US	81,4	35,2	
22	GG avec US	126,6	25,8	

**R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.

Tableau A3. 2. Facteurs de différence et de similarité, *f1* et *f2*, calculés pour les courbes de dissolution des cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant - séchage par atomisation.

Essai (Atomisés)	Mode d'addition**	facteur de différence *f1**	facteur de similarité *f2**	Paramètres de cristallisation
15	R sans US	88,1	34,5	Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); *N* = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes. *Pour le calcul des facteurs *f1* et *f2* le produit de référence est le LASSBio-294 initial (Test 1 pour les conditions de dissolution)
20	R avec US	69,5	40,8	
16	GG sans US	97,9	34,4	
22	GG avec US	96,1	34,6	

**R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.

Tableau A3. 3. Facteurs de différence et de similarité, *f1* et *f2,* calculés pour les courbes de dissolution des formulations gastro-résistantes (séchage par atomisation)

Essai	**Échantillons**	**facteur de différence *f1****	**facteur de similarité *f2****
(Cris 65)	Sans Eudragit S100	41,6	64,5
(Cris 72A)	(1:10)	70,3	49,4
(Cris 72E)	(10:1)	81,2	51,7

** Le LASSBio-294 initial (Test 2) est le produit de référence.*

Rappel

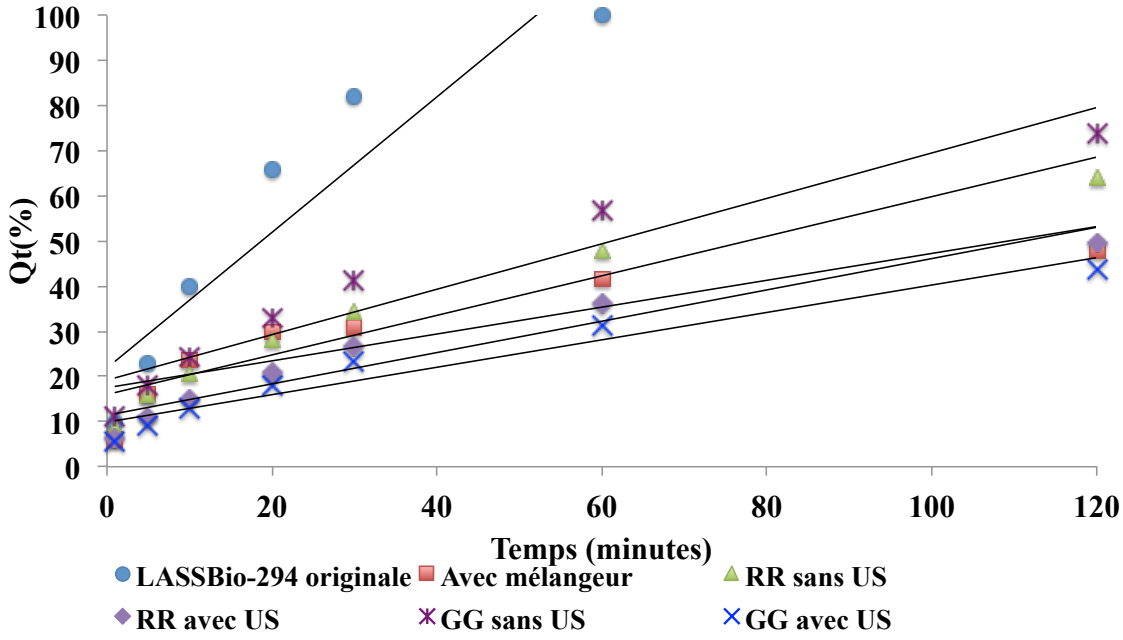
Limite de similarité entre deux profils réalisés dans les mêmes conditions :

$$\mathbf{0 \leq f1 \leq 15}$$

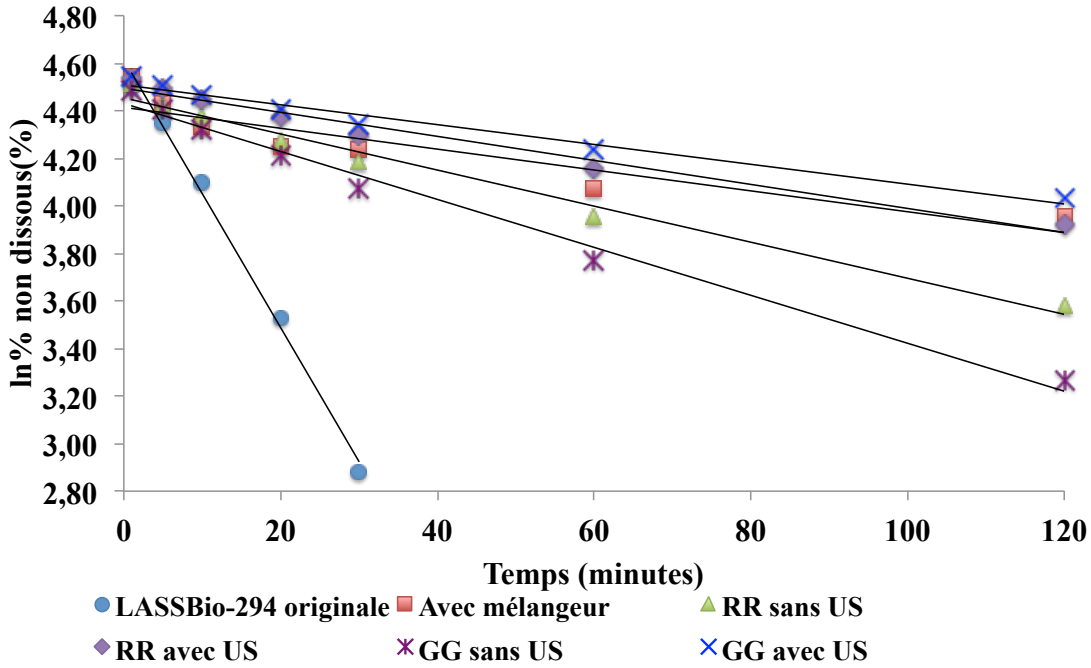
$$\mathbf{50 \leq f2 \leq 100}$$

Annexe 4

Partie 1 : Représentations graphiques des modèles mathématiques d'ordre zéro et de premier ordre pour les cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant - séchage en étuve



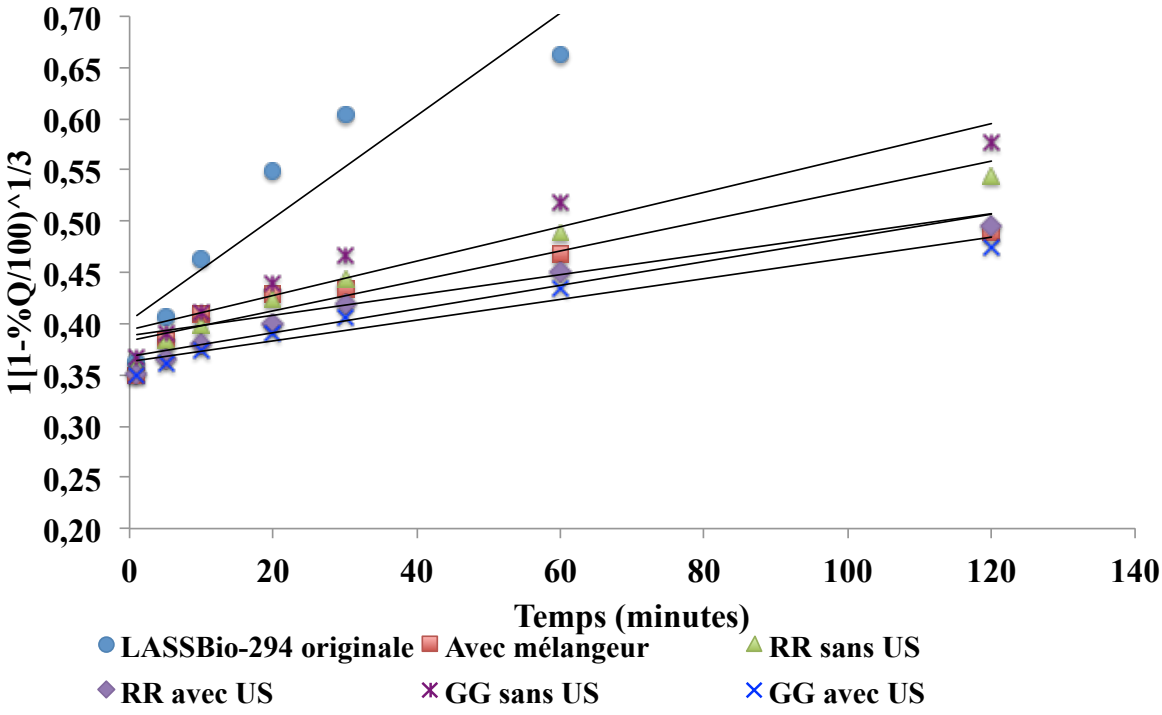
(a)



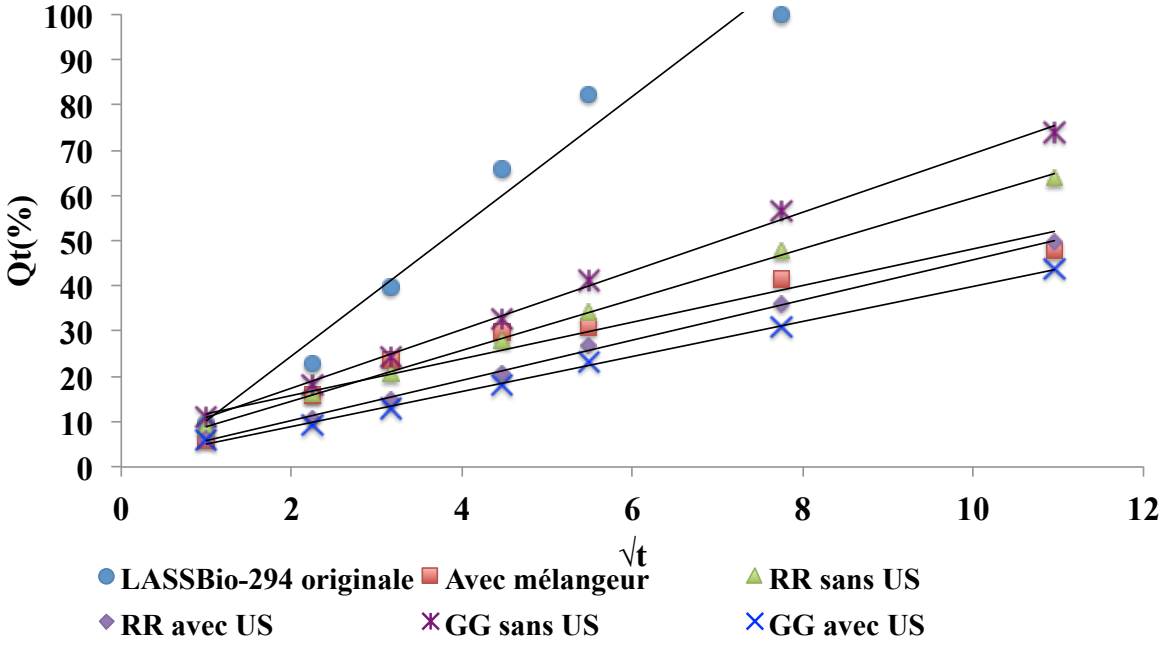
(b)

Figure A4. 1. Représentation graphique des cinétiques de libération selon les modèles d'ordre zéro (a) et de premier ordre (b).
(Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI 12,5 (avec pré-mélangeur) et Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

Partie 1 : Représentations graphiques des modèles mathématiques* de Hixson-Crowell et de Higuchi *pour les cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant - séchage en étuve



(a)



(b)

Figure A4. 2. Représentation graphique des cinétiques de libération selon les modèles de Hixson-Crowell (a) et de Higuchi (b).
(Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI 12,5 (avec pré-mélangeur) et Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N_v = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes).

Partie 1 : Représentations graphiques des modèles mathématiques de Higuchi pour les cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant - séchage par atomisation

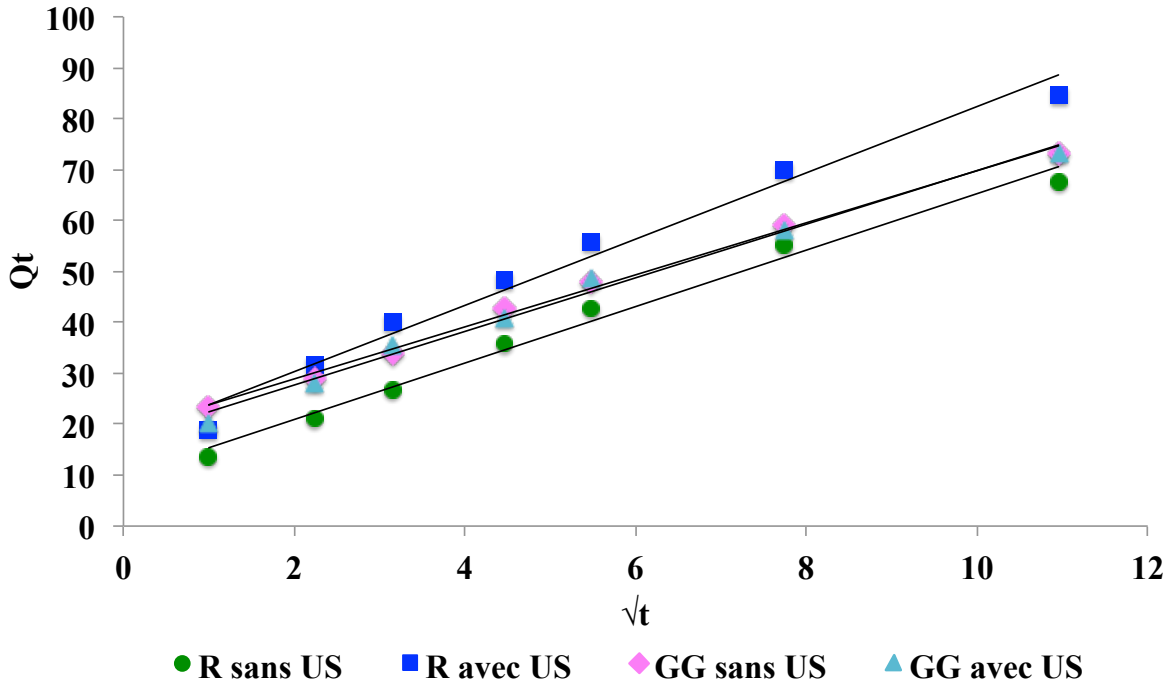


Figure A4. 3. Représentation graphique des cinétiques de libération selon le modèle de Higuchi pour les cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant - séchage par atomisation. Paramètres de cristallisation : Ci = 57 mg/g de solution; Ra eau/LI = 4,7 (R) et 4,6 (GG); N = 800 tours/min; temps d'essai = 30 minutes). R = mode d'addition rapide; GG = mode d'addition goutte-à-goutte.

Partie 2 : Représentation graphique des cinétiques de dissolution selon le modèle de Higuchi pour des formulations gastro-résistantes obtenues par atomisation à partir d'une dispersion des cristaux synthétisés

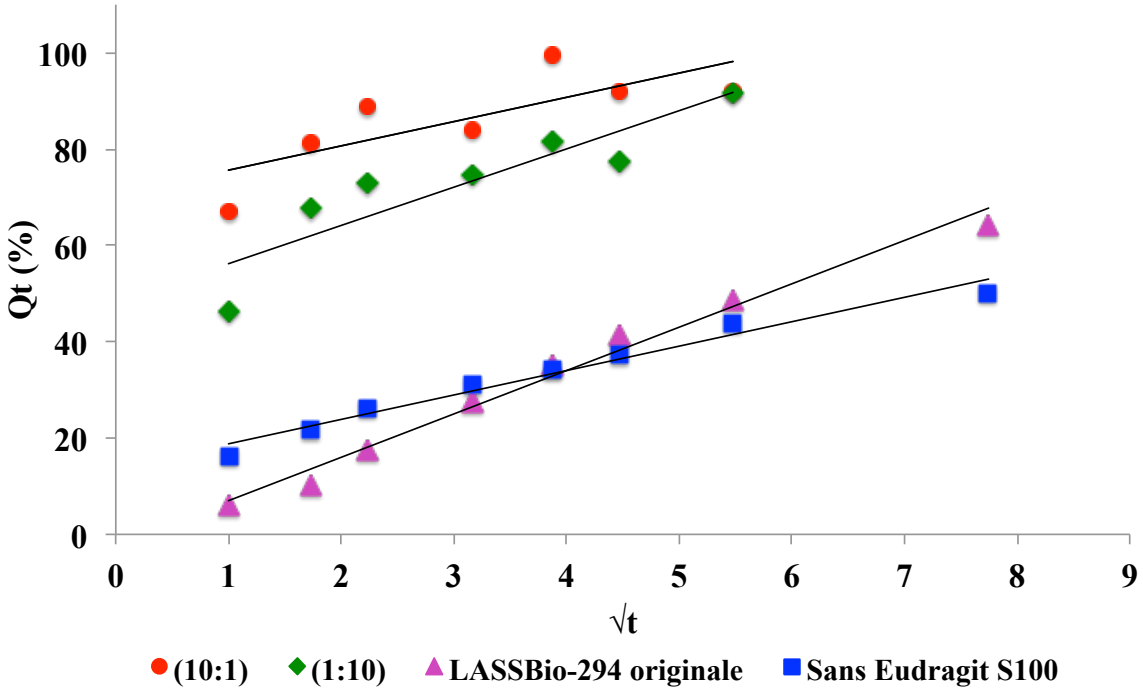


Figure A4. 4. Représentation graphique des cinétiques de dissolution (solution de LSS 0,5%, pH 7,4) selon le modèle de Higuchi pour les formulations gastro-résistantes des cristaux synthétisés. Comparaison avec les cristaux originaux et synthétisés sans Eudragit S100.
Paramètres de cristallisation : Mode d'addition : GG; Concentration : 57 mg/g solution; Ra eau/LI 4,7; N_v : 800 tours/min; Temps d'essai : 30 minutes.

Liste des symboles

Lettres latines

A	Surface de dissolution du solide	$[m^2]$
$Aire_{Échantillon}$	Aire d'échantillon contenant la poudre synthétisée	$[mAU.s^{-1}]$
$Aire_{LASSBio}$	Aire d'échantillon contenant la poudre originale	$[mAU.s^{-1}]$
C_i	Concentration en molécule dans le milieu	$[mol.m^{-3}]$
C_i^*	Concentration à la saturation du constituant *i*	$[mol.m^{-3}]$
C_i^{int}	Concentration du constituant *i* à l'interface des deux couches	$[mol.m^{-3}]$
$C_{mesurée}$	Concentration du constituant en solution mesurée par HPLC	$[\mu g.g^{-1}]$
$C_{théorique}$	Concentration du constituant en solution théorique	$[\mu g.g^{-1}]$
CV	Coefficient de variation	[%]
D	Diamètre d'agitateur	[m]
d	Distance entre les plans cristallins	[m]
$d_{3,2}$	Diamètre moyen en surface	[m]
$d_{4,3}$	Diamètre moyen en volume	[m]
d_{90}	Diamètre au pourcentage 90 de la distribution granulométrique cumulée	[m]
d_{10}	Diamètre au pourcentage 10 de la distribution granulométrique cumulée	[m]
d_{50}	Diamètre médian	[m]
D_{AB}	Coefficient de diffusion du soluté A dans B	$[m^2.s^{-1}]$
$D_{i,\ mélange}$	Coefficient de diffusion du constituant *i*	$[m^2.s^{-1}]$
d_j	Diamètre d'entrée dans le pré-mélangeur	[m]

d_m	Diamètre moléculaire ou ionique du soluté	[m]
f1	Facteur de différence	[-]
f2	Facteur de similarité	[-]
G	Énergie de Gibbs	[J]
H	Hauteur de liquide	[m]
h	Épaisseur de la couche limite autour de la particule	[m]
J	Vitesse de nucléation	$[m^{-3}.s^{-1}]$
J_i	Densité de flux molaire du constituant	$[mol.m^{-2}.s^{-1}]$
K_1	Constante du modèle cinétique du premier ordre	[-]
k_B	Constante de Boltzmann	$[J.K^{-1}]$
k_{bij}	Constante de vitesse de collision en régime péricinétique	$[m^3.s^{-1}]$
K_H	Constante du modèle cinétique de Higuchi	[-]
K_{HC}	Constante du modèle cinétique de Hixson-Crowell	[-]
k_{ij}	Constante d'agglomération	$[m^3.s^{-1}]$
k_{lij}	Constante de vitesse de collision en régime orthocinétique	$[m^3.s^{-1}]$
K_o	Constante du modèle cinétique d'ordre zéro	[-]
l_B	Taille à l'échelle de Batchelor	[m]
L_i et L_j	Taille de particule	[m]
l_k	Taille à l'échelle de Kolmogoroff	[m]
M_i	masse molaire du solide *i*	$[kg.mol^{-1}]$
$M_{LASSBio-294(initiale)}$	masse du LASSBio-294 initialement ajoutée	[kg]

$M_{LASSBio-294(t)}$	masse du LASSBio-294 au temps "*t*" du prélèvement	[kg]
n_p	Nombre de points de prélèvements au cours de la dissolution	[-]
N_A	Nombre d'Avogadro	[mol^{-1}]
N_i et N_j	Concentrations en nombre de particule par unité de volume	[$\#/m^3$]
N_p	Nombre de puissance	[-]
Q_0	Quantité initiale de la molécule dans la solution	[%]
Q_t	Quantité dissoute de la molécule au temps t	[%]
Q_t'	Quantité non dissoute de la molécule au temps t	[%]
R^2	Coefficient de corrélation	[-]
r	Rayon	[m]
r_c	Rayon du germe critique	[m]
Re	Nombre de Reynolds	[-]
r_{ij}	Nombre de collisions	[$m^{-3}.s^{-1}$]
S	Sursaturation	[-]
Sc	Nombre de Schmidt	[-]
$S_{spé}$	Surface spécifique	[m^2]
T_c	Diamètre de la cuve	[m]
T	Température	[K]
T_f	Température de fusion	[K]
t_G	Temps de croissance	[s]
T_g	Température de transition vitreuse	[K]

$t_{addition}$	Temps d'addition de la solution dans la cuve agitée	[s]
$t_{cuve\ agitée}$	Temps de maturation dans la cuve agitée	[s]
t_{ind}	Temps d'induction	[s]
$t_{macro,\ min}$	Temps de macromélange minimum	[s]
$t_{macro,\ turbulent}$	Temps de macromélange turbulent	[s]
$t_{mél}$	Temps de mélange	[s]
t_N	Temps de nucléation	[s]
u	Vitesse de rotation d'agitateur	[tours.s^{-1}]
u_j	Vitesse moyenne	[m.s^{-1}]
V	Volume du solvant	[m^3]
V_m	Volume moléculaire du solide	[m^3]
W	Fraction massique	[-]
W_0	Fraction massique à l'équilibre	[-]

Lettres grecques

ΔG	Énergie libre d'activation	[J.mol^{-1}]
ΔG_{crit}	Énergie libre de nucléation critique	[J.mol^{-1}]
ΔG_{crit}^{hom}	Énergie de nucléation critique homogène	[J.mol^{-1}]
$\Delta G_{crit}^{hét}$	Énergie de nucléation critique homogène	[J.mol^{-1}]
ΔC_p	Variation de capacités calorifiques à la température de transition vitreuse	[J.g^{-1}.K^{-1}]

ΔH_f	Enthalpie de fusion	[J.kg^{-1}]
θ	Angle du faisceau de diffraction	[°]
$\dot{\gamma}$	Vitesse d'écoulement	[s^{-1}]
δ	Épaisseur du film	[m]
ε'	Puissance dissipée par le mobile d'agitation	[W]
ε	Puissance moyenne dissipée	[W]
$\overline{\varepsilon}$	Puissance moyenne	[W]
γ_i	Coefficient d'activité du constituant dans la solution	[-]
γ_i^*	Coefficient d'activité du constituant dans la solution saturée	[-]
γ_{SL}	Énergie interfaciale entre le solide et le liquide	[J.m^{-2}]
λ	Longueur d'onde du faisceau incident	[nm]
μ	Viscosité dynamique	[Pa.s]
μ_i^L	Potentiel chimique du soluté *i*	[J.mol^{-1}]
$\mu_i^{L,*}$	Potentiel chimique du soluté *i* à l'équilibre	[J.mol^{-1}]
ν	Viscosité cinématique	[m^2.s^{-1}]
ρ	Masse volumique	[kg.m^{-3}]
τ	Contrainte de cisaillement	[Pa]

Liste des figures

Figure 1.1. Les grandes étapes du développement d'un médicament. 26

Figure 1.2. Grandes étapes du développement d'un nouveau médicament. 27

Figure 1.3. Le devenir du médicament dans l'organisme : de l'ingestion à la réponse pharmacologique 29

Figure 1.4. Illustration du processus de dissolution et ses quatre étapes 31

Figure 1.5. Modèle du film pour la dissolution d'un solide..... 32

Figure 1.6. Système de classification biopharmaceutique selon Amidon (1995). 34

Figure 1.7. Schéma des processus de formation de particules (micro ou nano) sur les modes d'opération *Top-down* et *Bottom-up*. 38

Figure 1.8. Types de nucléation. 43

Figure 1.9. Enthalpie libre d'activation de nucléation homogène en fonction du rayon du solide. 44

Figure 1.10. Profil de concentration autour d'un cristal dans le cas du modèle du film 48

Figure 1.11. Mécanisme d'agglomération de deux particules 49

Figure 1.12. Schéma du procédé de cristallisation. 53

Figure 1.13. Différents types de configurations pour le mélange de la solution avec l'anti-solvant. 55

Figure 1.14. Illustration des pré-mélangeurs. 56

Figure 1.15. Cations organiques les plus utilisés. 69

Figure 1.16. Évolution du nombre de références indexées dans la base de données Web of Science concernant l'utilisation des liquides ioniques dans le domaine pharmaceutique. Recherche effectuée sur les mots-clefs : liquide(s) ionique(s) + molécule(s) pharmaceutique(s), le 05 juillet de 2013. 74

Figure 1.17. Structure moléculaire de la molécule LASSBio-294. 81

Figure 1.18. Illustration du processus de simplification moléculaire pour la formation du LASSBio-294 82

Figure 1.19. Étapes du processus de développement du LASSBio-294 basé sur l'approche physiologique. 83

Figure 2.1. Distribution de taille en volume (%) de la poudre initiale. 91

Figure 2.2. Images MEB de la poudre originale du LASSBio-294. 92

Figure 2.3. Diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale. 94

Figure 2.4. Structure cristalline du LASSBio-294 avec les liaisons hydrogène (en bleu) (Costa et al. 2013). 95

Figure 2.5. (a) Représentation de la cellule unitaire du LASSBio-294 sur l'axe b e avec les liaison hydrogène, résultant à la formation d'un réseau d'agrégats moléculaires du LASSBio-294 sur l'axe c. (b) Possibles interactions du type "π-stacking" (en rose) entre les atomes de C(13)-C(21) et C(13)-O(17) 95

Figure 2.6. Thermogramme DSC du LASSBio-294 sous forme originale obtenu sous atmosphère d'azote (50 $mL.min^{-1}$) avec une programmation en température de 10 à 220 °C à 10 $°C.min^{-1}$. 96

Figure 2.7. Schéma du système chromatographique. 97

Figure 2.8. Courbe d'étalonnage pour la quantification du LASSBio-294 en solutions aqueuses. 99

Figure 2.9. Spécificité de la méthode. Chromatogramme du tampon phosphate pH 7,4 en absence de la molécule (a) et chromatogramme de la molécule dissous dans le tampon phosphate pH 7,4 et ACN (b). 100

Figure 2.10. Montage expérimental pour les essais de solubilité. 103

Figure 2.11. Schéma du système de chromatographie ionique. 108

Figure 2.12. Représentation schématique du processus de séparation par chromatographie ionique. Les ions d'échantillons sont présentés par A (analyte) et les ions de l'éluant par E. 108

Figure 2.13. Chromatogramme d'une solution contenant le [emim][$CH_3O(H)PO_2$] à 14 µg/g de solution (a) et chromatogramme d'une solution en absence du [emim][$CH_3O(H)PO_2$] et contentant le LASSBio-294 à 4000 µg/g de solution (b). 110

Figure 2.14. Rhéogrammes caractéristiques des différents comportements (1) Newtonien (2) Bingham (3) Rhéo-fluidifiant et (4) Rhéo-épaississant. 111

Figure 3.1. Chromatogramme du LASSBio-294 solubilisée dans (a) eau (b) HCl 0,1 N. Pic B : LASSBio-294 (T_R 14 minutes) et Pic A : "produit de dégradation" (T_R 4 minutes). 119

Figure 3.2. Profil solubilité-pH pour le LASSBio-294 considérant l'équilibre à 3h. 121

Figure 3.3. Spectre d'absorption pour le LASSBio-294 à partir de solutions diluées dans des milieux aqueux avec différents pH. 124

Figure 3.4. Diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale et des solides récupérés d'étude de solubilité pour les milieux pH 1,2 (HCl 0,1 N), tampon pH 6,8 et pH 7,4 et l'eau après 48h. 127

Figure 3.5. Diffractogramme du LASSBio-294 sous forme originale et des solides récupérés d'étude de solubilité pour les milieux pH 1,2 (HCl 0,1 N) pour plusieurs temps. 128

Figure 3.6. Schéma du processus de dissolution du LASSBio-294 et formation du produit de dégradation. 128

Figure 3.7. Illustration des possibles métabolites formés par l'hydrolyse de la fonction amide du LASSBio-294. 133

Figure 3.8. Illustration des possibles métabolites formés par l'hydrolyse de la fonction imide du LASSBio-294. 133

Figure 3.9. Représentation schématique des possibles types interactions entre les liquides ioniques à base du cation imidazolium et le LASSBio-294 135

Figure 3.10. Relation entre les anions (CH_3OO^-, NTf_2^- and BF_4^-) combinés avec le 1-butyl-3-méthylimidazolium [bmim] et le pouvoir solvant des LIs envers le LASSBio-294. 136

Figure 3.11. Relation entre les anions combinés avec le 1-éthyl-3-méthylimidazolium [emim] et le pouvoir solvant des LIs envers le LASSBio-294. 137

Figure 3.12. Relation entre le type de cation combiné avec l'anion CH_3OO^- et le pouvoir solvant des LIs vers le LASSBio-294. 138

Figure 3.13. Relation entre le type de cation combiné avec l'anion $CH_3O(H)PO_2^-$ et le pouvoir solvant des LIs vers le LASSBio-294. 138

Figure 3.14. Solubilité du LASSBio-294 à 25°C ± 0,5°C et pression atmosphérique en fonction de rapport massique eau/LI. 141

Figure 3.15. Rendements théoriques pour la cristallisation du LASSBio-294 en fonction du ratio massique eau/LI (25 ± 0,5 °C). 141

Figure 3.16. Rhéogramme caractéristique d'une solution de LASSBio-294 en LI ([emim][$CH_3O(H)PO_2$]) à 250 mg/g solvant pour différentes températures. 143

Figure 3.17. Courbes de viscosités des solutions de LI/LASSBio-294 à différentes concentrations de la molécule en fonction de la température. 143

Figure 3.18. Viscosité des différents mélanges Eau/LI à 25 °C. 144

Figure 4.1. Schéma du procédé de cristallisation du LASSBio-294 par effet anti-solvant. 149

Figure 4.2. Schéma des opérations de filtration et lavage de cristaux. 150

Figure 4.3. Schéma du montage expérimental pour la recristallisation du LASSBio-294 en utilisant un pré-mélangeur. 152

Figure 4.4. Illustration des pré-mélangeurs utilisés pour la cristallisation. 153

Figure 4.5. Illustration du procédé de cristallisation avec les étapes successives de mélange dans le pré-mélangeur et dans la cuve agitée. 155

Figure 4.6. Illustration du processus de diffusion dans le pré-mélangeur. 156

Figure 4.7. Illustration du processus de diffusion dans la cuve agitée. 157

Figure 4.8. Influence du type de pré-mélangeur sur la distribution de taille en volume (a) et en nombre (b) des cristaux humides après lavage. 160

Figure 4.9. Influence de la vitesse d'agitation sur la distribution de taille en volume (a) et en nombre (b) des cristaux humides après lavage. 161

Figure 4.10. Les états extrêmes du mélange : (a) macro-fluide ; (b) micro-fluide. 163

Figure 4.11. Illustration de l'influence de la vitesse d'agitation sur la formation de cristaux. 165

Figure 4.12. Influence de la concentration sur la distribution de taille en volume (a) et en nombre (b) des cristaux humides après lavage. 166

Figure 4.13. Illustration de l'influence de l'augmentation de la concentration sur la formation de cristaux. 168

Figure 4.14. Influence du rapport sur la distribution de taille en volume des cristaux humides après lavage. 170

Figure 4.15. Formule développée de l'HPMC 173

Figure 4.16. Formule développée du Poloxamer 407 173

Figure 4.17. Formule développée du Tween 20. 174

Figure 4.18. Influence du type d'additifs sur la distribution de taille en volume (a) des cristaux humides après lavage. 174

Figure 4.19. Illustration de la cristallisation dans la cuve agitée. 177

Figure 4.20. Illustration de la dispersion de cristaux dans la cuve agitée en présence et en absence d'ultrasons. 178

Figure 4.21. Influence du mode d'addition (rapide et goutte-à-goutte) sur la distribution de taille en volume des cristaux humides lavés. 181

Figure 4.22. Influence du mode d'addition sur la distribution de taille de cristaux humides après lavage obtenus en présence d'ultrasons. 183

Figure 4.23. Influence du mode d'addition sur la distribution de taille des cristaux humides après lavage obtenus avec solution à 159 mg/g de solution en présence d'ultrasons. (Conditions : Ra eau/LI = 3,9 (R) et Ra eau/LI de 4,5 (GG), ultrasons 40 W, N_v = 800 tours/min, temps d'essai 30 minutes)..... 184

Figure 4.24. Influence des ultrasons sur la distribution de taille en volume des cristaux humides lavés obtenus à la concentration de 159 mg/g solution. 186

Figure 4.25. Influence des ultrasons sur la distribution de taille en volume de cristaux humides lavés obtenus à la concentration de 57 mg/g solution. 188

Figure 4.26. Influence de la puissance des US sur la distribution de taille de cristaux humides après lavage. 190

Figure 4.27. Influence de la concentration sur la distribution de taille en volume (a) et nombre (b) des cristaux humides après lavage. 192

Figure 4.28. Diffractogrammes du LASSBio-294 sous sa forme initiale et recristallisé à partir de différentes concentrations initiales de la molécule dans la phase organique. 197

Figure 4.29. Diffractogrammes des cristaux considérant différentes méthodes de lavage. ... 200

Figure 4.30. Les principales étapes du processus de séchage par atomisation. 201

Figure 4.31 Illustration des facteurs qui affectant le processus de cristallisation. 204

Figure 5.1. Profil de dissolution du LASSBio-294 initial dans une solution de LSS 0,5 %, pH 7,4 (n = 3). Test 1 : 900 g de milieu de dissolution ; Test 2 : 350 g..... 214

Figure 5.2. Profils de dissolution (solution de LSS 0,5%, pH 7,4) du LASSBio-294 sous forme originale et recristallisé avec et sans pré-mélangeur (n=3). 215

Figure 5.3. Profils de dissolution (solution de LSS 0,5%, pH 7,4) du LASSBio-294 recristallisée en mode d'addition rapide et goutte-à-goutte avec séchage par atomisation. 219

Figure 5.4. Formule développé de l'Eudragit S100. 223

Figure 5.5. Concentration du LASSBio-294 en solution lors de l'étude de stabilité pendant 2 h dans HCl 0,1 % (pH 1,2) à 37 °C. 224

Figure 5.6. Profils de dissolution du LASSBio-295 sous forme originale et des cristaux obtenus par atomisation à partir d'une dispersion avec et sans Eudragit S100 dans une solution de LSS 0,5%, pH 7,4. 228

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Exemple de techniques d'amélioration de la solubilité et de la cinétique de dissolution de molécules hydrophobes. 39

Tableau 1.2. Types de solvants et anti-solvants utilisés lors de cristallisation anti-solvant de molécules pharmaceutiques. 67

Tableau 2.1. LIs utilisés dans cette étude. 90

Tableau 2.2. Répétabilité intra-jour de la méthode de quantification. 101

Tableau 2.3. Exactitude intra-jour de la méthode de quantification. 101

Tableau 2.4. Répétabilité de la méthode de quantification. 102

Tableau 2.5. Milieux utilisés pour détermination de la solubilité. 104

Tableau 3.1. Concentrations du LASSBio-294 en solution obtenues dans différents milieux aqueux sans additifs au cours du temps à 37 ± 0,5 °C. 118

Tableau 3.2. Moyennes des aires du pic du LASSBio-294 et du "produit de dégradation" obtenues par analyse HPLC après l'étude de solubilité dans les différents milieux sans additifs (3, 24 et 48h) à 37 ± 0,5 °C. 120

Tableau 3.3. Résultats de la détermination du pKa. 121

Tableau 3.4. Résultats de solubilité du LASSBio-294 dans les milieux avec additifs et dans l'eau, à 37 ± 0,5 °C. 122

Tableau 3.5. Moyenne des aires** des pics du LASSBio-294 et du "produit de dégradation" obtenues par analyse HPLC après dilution d'une solution mère avec différents milieux. 124

Tableau 3.6. Résultats de solubilité du LASSBio-294 à 37 ± 0,5 °C dans l'eau et dans les milieux pH 1,2, pH 6,8 et pH 7,4 avec 0,02 et 1 g de poudre. 125

Tableau 3.7. Images MEB de la molécule originale et des solides récupérés après l'étude de solubilité sur 48 h. 129

Tableau 3.8. Images MEB de la molécule originale et des solides récupérés après l'étude de solubilité dans HCl 0,1 N (pH 1,2) pour 48 et 72h. 130

Tableau 3.9. Résultats de solubilité à 37 ± 0,5 °C du LASSBio-294 dans l'eau avec 0,02, 0,5, 1 et 2 g de poudre. 130

Tableau 3.10. Structures des molécules étudiées par Kalia et Raines (2008). 131

Tableau 3.11. Valeurs de la $t_{1/2}$ pour l'hydrolyse publiées pour les acylhydrazones et l'oxime (Kalia & Raines 2008). 132

Tableau 3.12 Solubilité du LASSBio-294 dans différents LIs à 25 ± 0,5°C et pression atmosphérique. 134

Tableau 3.13. Effet de la température sur la solubilité du LASSBio-294 dans les LIs. 139

Tableau 3.14. Solubilité du LASSBio-294 à 25 ± 0,5°C et pression atmosphérique dans différents mélanges eau-LI. 140

Tableau 3.15. Solubilité du LASSBio-294 dans les mélanges LIs et l'eau à différentes températures (± 0,5 °C) et pression atmosphérique 142

Tableau 3.16. Équations obtenues à partir de donnés de viscosités des solutions de différentes concentrations de LASSBio-294 en LI en fonction de la température (25-50 °C). 144

Tableau 3.17. Équations obtenues à partir de donnés de viscosités à différentes température en fonction de la concentration de LASSBio-294 en LI (0-250 mg/g solvant). 144

Tableau 4.1. Liste des expériences réalisées pour l'étude de paramètres opératoires du procédé. 154

Tableau 4.2. Valeurs de t_{ind} et $t_{mél}$ dans le pré-mélangeur et dans la cuve agitée. 157

Tableau 4.3. Images MEB des cristaux obtenus avec les pré-mélangeurs Roughton et type T. 159

Tableau 4.4. Images MEB des cristaux obtenus avec différentes vitesses d'agitation. 164

Tableau 4.5. Influence de la concentration sur la constante d'agglomération en régime laminaire. 167

Tableau 4.6. Images MEB des cristaux et teneur en LI obtenus avec différentes concentrations initiales de la phase organique 169

Tableau 4.7. Influence du rapport eau/LI sur la constante d'agglomération en régime laminaire. 170

Tableau 4.8. Images MEB des cristaux obtenus avec différents Ra eau/LI. 171

Tableau 4.9. Images MEB et teneur en LI des cristaux obtenus avec et sans additifs. 176

Tableau 4.10. Liste des expériences réalisées pour l'étude du mode d'addition de la phase organique en absence d'ultrasons. 179

Tableau 4.11. Liste des essais réalisés pour l'étude de l'influence des ultrasons. 179

Tableau 4.12. Valeurs de t_{ind} et $t_{mél}$ dans la cuve agitée après l'addition de la phase organique en mode rapide (régime intermédiaire). 179

Tableau 4.13. Valeurs de tind et tmél dans la cuve agitée après l'addition en mode goutte-à-goutte de la solution à 57 mg/g de solution (Essai 16, Ra = 4,6). 180

Tableau 4.14. Images MEB des cristaux obtenus en mode d'addition R et GG de la solution à 57 mg/g solution en absence d'ultrasons. 182

Tableau 4.15. Images MEB des cristaux obtenus en mode d'addition R et GG de la solution à 57 mg/g solution en présence d'ultrasons. 184

Tableau 4.16. Images MEB des cristaux obtenus avec différents modes d'addition de la solution à 159 mg/g solution en présence d'ultrasons. 185

Tableau 4.17. Influence de l'augmentation du Ra eau/LI sur les cinétiques de cristallisation 186

Tableau 4.18. Influence d'augmentation du Ra eau/LI sur la constante d'agglomération dans la cuve agitée en régime laminaire sans ultrasons. 187

Tableau 4.19. Images MEB des cristaux obtenus en rapide de la solution à 159 mg/g solution avec et sans ultrasons. 187

Tableau 4.20. Images MEB des cristaux obtenus en mode goutte-à-goutte de la solution à 57 mg/g de solution avec et sans ultrasons 189

Tableau 4.21. Images MEB des cristaux obtenus en mode goutte-à-goutte avec différentes puissances d'ultrasons (Ra eau/LI de 4,6 à 4,9)..... 191

Tableau 4.22. Images MEB des cristaux obtenus en mode goutte-à-goutte en présence d'ultrasons avec différentes concentrations (Ra eau/LI de 4,5 à 4,7). 193

Tableau 4.23. Résultats de mesures d'angle de contact et concentration de LI (ppm) pour les échantillons obtenus en utilisant un pré-mélangeur. 195

Tableau 4.24. Résultats de mesures d'angle de contact et concentration de LI (ppm) pour les échantillons obtenus sans pré-mélangeur et sans ultrasons. 196

Tableau 4.25. Résultats de mesures d'angle de contact et concentration de LI (ppm) pour les échantillons obtenus sans pré-mélangeur et avec ultrasons. 196

Tableau 4.26. Images MEB des cristaux considérant différentes méthodes de lavage. 199

Tableau 4.27. Résultats DSC des cristaux considérant différentes méthodes de lavage. 199

Tableau 4.28. Effet su mode de séchage (étuve et atomisation) sur les images MEB des cristaux obtenus en mode R. 202

Tableau 4.29. Effet su mode de séchage (étuve et atomisation) sur les images MEB des cristaux obtenus en mode GG. 203

Tableau 4.30. Caractéristiques des cristaux secs obtenus avec le séchage par atomisation et étuve. 203

Tableau 5.1. Conditions expérimentales pour l'étude de dissolution 210

Tableau 5.2. Modèles mathématiques régissant les mécanismes de cinétique de libération . 212

Tableau 5.3. Caractéristiques des cristaux secs obtenus avec et sans pré-mélangeur..... 216

Tableau 5.4. Images MEB des cristaux synthétisés avec et sans le pré-mélangeur Roughton 217

Tableau 5.5. Linéarisation des profils de dissolution avec le coefficient de corrélation (R^2) 218

Tableau 5.6. Pourcentage de la molécule Qt (%) dissous après 5 et 30 minutes pour les cristaux obtenus par cristallisation anti-solvant 220

Tableau 5.7. Linéarisation des profils de dissolution avec le coefficient de corrélation (R^2) pour les cristaux obtenus par séchage par atomisation 220

Tableau 5.8. Images MEB des particules obtenues à partir des formulations gastro-résistantes contenant différentes proportions LASSBio-294 : Eudragit S100 (1600x). 226

Tableau 5.9. Images MEB des particules obtenues à partir des formulations gastro-résistantes contenant différentes proportions LASSBio-294 : Eudragit S100 (6400x) 227

Tableau 5.10. Linéarisation des profils de dissolution avec le coefficient de corrélation (R^2). 228

Résumé : Etude de la cristallisation d'une nouvelle molécule à efficacité cardiotonique dans un mélange liquide ionique-eau

La cristallisation par effet anti-solvant, comme technique de production de micro/nanoparticules, présente certains inconvénients. En effet, pour des molécules nouvellement synthétisées ou découvertes, comme le LASSBio-294, les solubilités dans l'eau et dans les solvants organiques sont faibles ce qui limite l'application de cette opération. L'utilisation de solvants alternatifs ouvre de nouvelles perspectives de recristallisation de ce type de molécules. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la cristallisation du LASSBio-294 en utilisant un liquide ionique comme solvant. Ce sont des sels organiques fondus à température ambiante, qui ont la particularité d'avoir une tension de vapeur nulle. Ils constituent une nouvelle classe de solvants non volatiles et ininflammables qui présentent des propriétés originales. Dans un premier temps, des liquides ioniques (LIs) dérivés du cation imidazolium ont été utilisés comme solvant alternatif. La solubilité a été mesurée dans 5 LIs, dans l'eau et dans des mélanges eau/LI. Dans l'eau pure la solubilité est très faible (5 ppm). En revanche, dans certains LIs, elle est supérieure à 200 mg/g solution. Les résultats de solubilité dans des mélanges eau/LI ont permis de choisir le rapport eau/LI pour l'obtention d'un bon rendement en solide. En complément, une étude de la stabilité du solide en suspension a été menée dans différents systèmes aqueux. Cette étude a montré sa possible hydrolyse. Dans un deuxième temps, la recristallisation a été réalisée avec le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthyl phosphonate [emim][$CH_3O(H)PO_2$] comme solvant et l'eau comme anti-solvant. Deux approches sont présentées en vue de favoriser le mélange : l'utilisation de dispositifs de mélange et l'introduction des ultrasons pendant le processus de cristallisation. L'influence de paramètres tels que le rapport anti-solvant/solvant, la concentration initiale et la présence d'additifs a été étudiée. Les solides formés puis séchés en étuve ont été caractérisés par granulométrie laser, microscopie électronique à balayage, diffractométrie de rayons X, calorimétrie différentielle à balayage et test de dissolution. Malgré une diminution de la taille des particules élémentaires, l'état d'agglomération des cristaux obtenus n'a pas permis une augmentation de la vitesse de dissolution. En modifiant le mode de séchage (séchage par atomisation), cette agglomération est réduite et la dissolution améliorée. De plus, la présence d'un polymère entérique en solution lors du séchage par atomisation des cristaux synthétisés a eu un effet notable sur la structure des agglomérats formés. Ces derniers peuvent se désagréger, se disperser et se dissoudre rapidement.

Mots clés : Molécule hydrophobe, Cristallisation, Liquide ionique, Solubilité, Atomisation

Abstract : Crystallization study of a new cardiotonic drug in an ionic liquid-water mixture

The anti-solvent crystallization allows obtaining micro/nanoparticles, but it presents some disadvantages. In the case of new pharmaceutical molecules, as the LASSBio-294, the solubility in water or organic solvents is very low limiting the application of this operation. The use of Ionic Liquids (ILs) as alternative solvents opens new perspectives in pharmaceutical processing through anti-solvent crystallization process. Unlike conventional solvents, ILs are entirely composed of ions. ILs are organic salts, usually liquid at room temperature, and which are composed of a relatively large asymmetric organic cation and of an inorganic or organic anion. ILs derived from imidazolium cation are used as alternative solvents for this drug, water being used as anti-solvent. First, the solubility is measured in 5 ILs, in water and in water/IL mixtures. In pure water, the solubility is very low (5 ppm). However, for some ILs, it is greater than 200 mg/g solution. The results of solubility in water/IL mixtures permit to choose a water/IL ratio leading to a good solid theoretical yield. Then recrystallization is performed with 1-ethyl-3-methylimidazolium methyl phosphonate [emim][$CH_3O(H)PO_2$] as the preferred solvent. Anti-solvent crystallization represents a class of process characterized by the mixing between a solution and an anti-solvent to produce solid particles. The influence of solvent/anti-solvent ratio, initial concentration, and additives is studied. The solids formed and dried in an oven are characterized by laser granulometry, scanning electron microscopy, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and dissolution test. Despite the decrease of elementary particles size, the agglomeration state of particles does not permit to improve the dissolution rate. The agglomeration is reduced and the dissolution improved by modifying the drying process (spray drying). Moreover, the presence of an enteric polymer during the spray drying process has a significant impact on the structure of the formed agglomerates. These are disaggregated, dispersed and dissolved very quickly.

Keywords: Poor water-soluble drug, Crystallization, Ionic liquid, Solubility, Spray-drying