

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie Industrielle

Intitulé du mémoire

**Interactions moléculaires au sein des formes
pharmaceutiques liquides : Etude de la
dégradation d'une association de parabènes
en présence du pidolate de magnésium**

Présenté par :

Amtsif Anis
Boulaïoune Abderrahmane

Encadrés par :

M^{me} Ait Mesbah Zohra
M^{me} Bouhannache Bouchra

Année universitaire 2019/2020

ملخص

الشراب الصيدلاني هو من المستحضرات الصيدلانية المستخدمة على نطاق واسع والتي تستخدم لسهولة الإعطاء والتحمل. ولإنها لا تتعرض لمشاكل التفكك أو الانحلال في الجهاز الهضمي. على الرغم من أن الاشربة الصيدلانية لها مزايا عديدة، إلا أنها بيئات مواتية لتكاثر الكائنات الحية الدقيقة. لعلاج هذه المشكلة، يوصى باستخدام المواد الحافظة المضادة للميكروبات مثل ميثيل- وبروبيل برابين، ولكن هذا المزيج قد يتفاعل، في ظل ظروف معينة، مع المكونات الاخرى للمستحضر. لهذا فإن التمكن الجيد من الصياغة بالإضافة إلى المعرفة الجيدة بالظواهر الفيزيائية والكيميائية يجعل من الممكن توقع أي عدم توافق بين المواد الاولية أثناء خطوة الصياغة المسبقة. اختبار الإجهاد هو الأداة الأساسية المستخدمة للتنبؤ بمشاكل الاستقرار، تطوير الطرق التحليلية وتحديد منتجات التحلل ومساره. سنذكر في هذه المذكرة الأشكال الصيدلانية السائلة الموجهة للشرب ونأخذ على سبيل المثال الاشربة الصيدلانية وكذلك حالات عدم التوافق الفيزيائية والكيميائية التي قد تحدث داخلها، ثم سنتحدث عن المواد الحافظة المستخدمة في هذه المستحضرات ودراسات التحلل القسري. في الجزء الثاني سنقترح بروتوكولاً تجريبياً لدراسة تحلل ميثيل- وبروبيل برابين الصوديوم في وجود مركب معدني (بيدولات المغنيسيوم) وفقاً لتوليف ببليوغرافي لدراسات مختلفة حول هذا الموضوع.

RESUME

Les sirops sont des préparations pharmaceutiques largement répandues et favorisées pour leur facilité d'administration et pour leur tolérance. Ainsi, ils ne présentent pas de problèmes de délitement ou de dissolution dans le tractus gastro-intestinal. Bien que les sirops présentent beaucoup d'avantages, ces derniers sont des milieux favorables à la prolifération des micro-organismes. Pour remédier à ce problème, l'utilisation des conservateurs antimicrobiens tels du méthyl- et du propylparabène est recommandée. Mais cette association peut, dans certaines conditions, interagir avec les autres composants de la préparation. Pour cela, une bonne maîtrise des paramètres de la formulation ainsi qu'une bonne connaissance des phénomènes physico-chimiques permet de prévoir d'éventuelles incompatibilités entre les matières premières pendant l'étape de préformulation. Le test de stress est le principal outil utilisé pour prédire les problèmes de stabilité, élaborer des méthodes d'analyse et déterminer les produits et les voies de dégradation. Dans cette étude, un intérêt est porté à une forme pharmaceutique liquide buvable, en l'occurrence un sirop à base de pidolate de magnésium associé aux deux parabènes de méthyle et de propyle dans leur forme sodée. Un protocole expérimental pour l'étude de dégradation forcée est présenté afin d'évaluer les éventuelles incompatibilités physicochimiques pouvant se produire entre ces différents composés.

ABSTRACT

Syrups are widely used pharmaceutical preparations and are used for their ease of administration and tolerance. Thus, they do not present problems of disintegration or dissolution in the gastrointestinal tract. Although syrups have many advantages, they make a good environment for the proliferation of micro-organisms. In order to solve this problem, the use of antimicrobial preservatives such as methyl and propylparaben is recommended. However, this combination can, under certain conditions, interact with the other components of the preparation. So, a good mastery of the formulation parameters as well as a good knowledge of the physical and chemical phenomena allows us to foresee possible incompatibilities between the raw materials during the pre-formulation stage. The stress testing is the main tool used to predict stability problems, develop analytical methods and determine degradation products and degradation pathways. In this manuscript, we will mention the liquid oral dosage forms and take the example of syrups as well as the physicochemical incompatibilities that may occur within them. We will then talk about the preservatives used in these preparations and the forced degradation studies. In a second part, we will propose an experimental protocol for the study of the degradation of methyl- and propylparaben sodium in the presence of a metallic compound (magnesium pidolate) based on a bibliographical synthesis of various studies on the subject.

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir donné la foi et la volonté afin d'arriver à la finalité de ce travail.

Nos remerciements s'adressent dans un premier lieu à l'ensemble des membres du jury qui a accepté de juger ce travail.

Nous exprimons notre grande reconnaissance et nos sincères remerciements à notre promotrice M^{me} AIT MESBAH ZOHRA d'abord d'avoir accepté de nous encadrer mais aussi pour ses conseils avisés durant cette période difficile, pour la confiance qu'elle nous a accordée, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire.

Nous remercions vivement notre co-promotrice M^{me} BOUHANNACHE BOUCHRA, responsable du département des « formes liquides » au laboratoire de pharmacie galénique du CRD SAIDAL pour ses bonnes explications qui ont éclairé le chemin de nos recherches, pour sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordée.

Nous exprimons notre grande reconnaissance et nos sincères remerciements à M^{me} MAKAOUI NASSIMA de nous avoir accueillis au sein du laboratoire de chimie analytique du CRD SAIDAL.

Notre sincère reconnaissance et nos vifs remerciements à M^{me} BOUASSEL KAHINA analyste au sein du laboratoire de chimie analytique du CRD Saidal pour ses conseils et ses encouragements.

Merci aussi à DJILALI KHADIDJA, doctorante au département de génie des procédés de l'USTHB, pour sa gentillesse et sa générosité. Les documents que vous avez partagés avec nous étaient de grande utilité.

Les mots nous manquent pour exprimer notre gratitude et nos remerciements à Mr HAMMOUDA MOHAMED SEDIK, Mlle MAHI IHCENE, Mlle HAMMOUDI MOUNIRA, Mlle MEKERKEB ABERRANE SELMA et Mr YAHIAOUI YACINE pour leurs aides et leurs conseils durant notre travail.

Nous exprimons notre grande reconnaissance et nos sincères remerciements à Mme ELBAKYAN_ALEXANDRA Créatrice du site Sci-Hub sans lequel nous n'aurions jamais eu accès à certains documents.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve durant ces quatre années de cursus malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nous souhaitons aussi remercier nos PARENTS pour leur soutien permanent car ils ont largement contribué à notre réussite dont nous sommes pleinement satisfaits.

Nous profitons encore de cette occasion pour remercier nos camarades pour l'échange scientifique et dynamique que nous avons maintenu durant nos quatre années de formation.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : FORMES PHARMACEUTIQUES LIQUIDES BUVABLES : EXEMPLE DES SIROPS ET INCOMPATIBILITES ENTRE CONSTITUANTS

I.1. Définition d'un médicament	4
I.2. Les préparations liquides pour usage oral	4
I.2.1. Les sirops	5
I.2.2. Les ampoules buvables	6
I.3. Les incompatibilités physico-chimiques dans les formes pharmaceutiques liquides	6
I.3.1. Les incompatibilités physiques	7
I.3.2. Les incompatibilités chimiques	8
I.4. Les facteurs pouvant favoriser les incompatibilités physico-chimiques	10

CHAPITRE II :

GENERALITES SUR LES CONSERVATEURS : CAS DU METHYL- ET DU PROPYLPARABENE SODIQUE

II.1. Contamination microbienne des produits pharmaceutiques	14
II.2. Conséquences d'une contamination	15
II.3. La protection vis-à-vis des micro-organismes	16
II.4. Qu'est-ce qu'un conservateur ?	17
II.4.1. Selon la pharmacopée européenne	17
II.4.2. Selon la pharmacopée américaine	17
II.5. Qualités requises d'un conservateur	17
II.6. Acide benzoïque et ses dérivés	19
II.7. Les parabènes	20

II.8. Stabilité des parabènes	20
II.9. Avantages des parabènes	21
II.10. L'utilisation en association	21
II.11. Incompatibilités	22
II.12. Les sels de parabènes	22
II.12.1. Le méthylparabène sodique	22
II.12.2. Le propylparabène sodique	23
II.13. Interaction des parabènes avec les composés métalliques : Cas du pidolate de magnésium	24

CHAPITRE III : LES ETUDES DE DEGRADATION FORCEE

III.1. Généralités	27
III.2. Intérêt des études de dégradation forcée	27
III.3. Exemples de conditions de dégradation forcée décrites en littérature	28
III.4. Méthodes indicatrices de stabilité	30
III.5. Le bilan massique	31

CHAPITRE IV : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

IV.1. Comportement des parabènes	33
IV.1.1. En présence d'agents oxydants	33
IV.1.2. Hydrolyse alcaline du méthylparabène par du NaOH	37
IV.1.3. Interaction physico-chimique entre le méthylparabène et les polyols	38
IV.1.4. Biotransformation des parabènes par des bactéries résistantes	39
IV.1.5. Transestérification des parabènes par voie enzymatique	40
IV.1.6. Métabolisme des parabènes	41
IV.2. Données sur la transformation du pidolate de magnésium	43
IV.3. Méthodes d'analyse indicatrices de stabilité	44
IV.4. Proposition d'un protocole expérimental	45

CONCLUSION	50
-------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

APPENDICES

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure IV.1 : Déprotonation du méthylparabène	38
Figure IV.2 : L'hydrolyse des espèces déprotonées de méthylparabène	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II.1 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du méthylparabène sodique	23
Tableau II.2 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du propylparabène sodique	24
Tableau II.3 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du pidolate de magnésium	25
Tableau IV.1 : Protocole expérimental proposé pour les études de dégradation forcée des parabènes en présence du pidolate de magnésium	48

LISTE DES ABREVIATIONS

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination

CEE-ONU : La Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

FDA : Food and Drug Administration

GC : Gas Chromatography

GRAS : Generally Recognized As Safe

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH : The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

MS ou SM : Mass Spectrometry ou Spectrométrie de Masse

NMR ou RMN : Nuclear Magnetic Resonance ou Résonance Magnétique Nucléaire

RP-HPLC : Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography

INTRODUCTION

Parmi les différentes voies d'administration, la voie orale est encore la plus couramment utilisée en raison de sa facilité d'administration [1]. De très nombreux médicaments, notamment ceux à usage pédiatrique, sont administrés par cette voie sous forme de simples solutions ou même sous forme de sirops [2, 3].

Les sirops par exemple, ont l'avantage d'être généralement bien tolérés et qu'ils n'ont pas de problèmes de délitement ou de dissolution dans le tractus gastro-intestinal. Tout de même, un sirop pourrait subir une altération liée à sa concentration en sucre (contamination microbienne si faible concentration en sucre ou, si forte, cristallisation du saccharose) ou à des incompatibilités physico-chimiques entre ses différents composants.

Les fabricants sont en effet conscients des problèmes associés à la contamination microbienne éventuelle des produits. L'addition d'un conservateur antimicrobien pourra permettre de combattre ces éventuelles contaminations, à condition que le choix de ce conservateur ait été fait en tenant compte de tous les facteurs susceptibles de modifier son activité [4].

Une bonne maîtrise des paramètres de la formulation ainsi qu'une bonne connaissance des phénomènes physico-chimiques permet de prévoir d'éventuelles incompatibilités en étudiant, pendant l'étape de préformulation, l'association de certaines matières premières.

A leur tour, les tests de stress (aussi souvent appelés « dégradation forcée ») sont depuis longtemps reconnus comme un élément important du processus de développement des médicaments. Le test de stress est le principal outil utilisé pour prédire les problèmes de stabilité, élaborer des méthodes d'analyse et déterminer les produits et les voies de dégradation [5].

Le guide Q6A de l'ICH relatif aux spécifications mentionne l'exigence que les méthodes d'analyse utilisées pour les substances actives et les produits médicamenteux soient indicatrices de stabilité. Par ailleurs, le guide de 1998 de la FDA sur la stabilité définit les méthodes indicatrices de stabilité comme étant des méthodes analytiques quantitatives validées qui peuvent détecter les changements, au cours du temps, des

propriétés chimiques, physiques ou microbiologiques de la substance active ou du produit médicamenteux et qui sont spécifiques [6].

Afin d'évaluer les interactions moléculaires et les voies de dégradation du méthyl- et du propylparabène, fréquemment utilisés en association, en présence d'autres matières premières dans la préparation, nous allons étudier l'exemple d'un sel minéral indiqué contre les entéropathies sévères et certaines tubulopathies [7] qui est le pidolate de magnésium.

Les trois premiers chapitres du manuscrit ont pour objet de traiter les formes pharmaceutiques liquides buvables et leurs problèmes d'incompatibilités physico-chimiques (CHAPITRE I), puis décrire les conservateurs antimicrobiens en général et les parabènes en particulier (CHAPITRE II) ainsi que les études de dégradation forcée et les méthodes indicatrices de stabilité (CHAPITRE III).

Dans le CHAPITRE IV est exposée une synthèse bibliographique de travaux menés dans le cadre de la dégradation des parabènes et du pidolate de magnésium.

CHAPITRE I :
FORMES PHARMACEUTIQUES
LIQUIDES BUVABLES :
EXEMPLE DES SIROPS ET
INCOMPATIBILITES ENTRE
CONSTITUANTS

I.1. Définition d'un médicament

D'après le code de la santé publique, on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique [8].

Au point de départ de la formulation d'un nouveau médicament, il y a la substance active, c'est-à-dire une substance dont l'activité thérapeutique a été établie et qui a fait l'objet de nombreuses études de la part des chimistes, des toxicologues et des pharmacologues [3].

Tout composant, autre que la substance active, qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication est un excipient. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) aux substances actives, ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect, l'acceptabilité pour le patient et la facilité de fabrication [3].

I.2. Les préparations liquides pour usage oral

En termes de formulation, les formes liquides présentent l'avantage de délivrer la substance active à l'état déjà dissous ou partiellement dissous. De plus, la forme liquide est plus appropriée à l'ajustement posologique et est également plus adaptée aux patients présentant des difficultés de déglutition [2]. En terme pharmaceutique, les préparations liquides à usage oral sont généralement des solutions, émulsions ou suspensions contenant une ou plusieurs substances actives dans un véhicule approprié, elles peuvent toutefois consister en des substances actives liquides utilisées telles quelles [9].

En cas de besoin, les solutions destinées à l'administration par voie orale peuvent contenir des stabilisants pour maintenir la stabilité chimique et physique des substances actives et des agents de conservation afin de prévenir la croissance des micro-organismes dans la solution. Ainsi, le formulateur doit se méfier des interactions chimiques entre ces diverses composantes qui peuvent affecter la stabilité de la préparation [10].

Bien que la caractéristique la plus importante d'une forme pharmaceutique soit l'efficacité, il y a d'autres caractéristiques qui demeurent importantes pour la fabrication des formes liquides telles que l'innocuité ainsi que la stabilité chimique, physique et microbiologique. D'un point de vue pharmaceutique, les problèmes de stabilité sont les principales causes des plaintes de sécurité [11].

Certains sirops ou solutions aqueuses à usage pharmaceutique sont instables malgré l'usage des conservateurs (parabènes par exemple). Dans certains cas, il s'agit d'une instabilité microbiologique due à la dégradation des agents antimicrobiens selon différents mécanismes (hydrolyse, oxydation, etc.). Ces derniers dépendent essentiellement des propriétés de la formulation telles que le pH et les différents composants (substance(s) active(s) et excipients).

Pour avoir une idée plus formelle et pour approfondir les connaissances sur certaines de ces formes, les sirops et les ampoules buvables ainsi que les incompatibilités entre leurs différents composants feront l'objet de la partie suivante.

I.2.1. Les sirops

Les sirops sont des préparations aqueuses concentrées d'un sucre ou d'un succédané de sucre de consistance visqueuse. La plupart des sirops contiennent une forte proportion de saccharose, généralement de 60% à 80%, non seulement en raison du goût sucré et de la viscosité désirables de ces solutions, mais aussi en raison de leur stabilité inhérente en contraste avec le caractère instable des solutions diluées de saccharose. Les solutions de sucre concentrées sont assez résistantes à la prolifération microbienne en raison de l'absence de l'eau requise pour la croissance des micro-organismes [10].

Les sirops peuvent contenir une ou plusieurs substances actives et aussi des substances auxiliaires telles que des colorants, des agents aromatisants et antimicrobiens. Mais il est à noter que ces derniers peuvent être une source d'incompatibilités (colorations, précipitation par variation de pH, etc.) [3].

La présence de grandes quantités d'eau dans les préparations médicamenteuses liquides peut les rendre sensibles à la croissance des micro-organismes responsables d'altérations organoleptiques telles que la détérioration du produit par l'apparition d'une

odeur désagréable et/ou des changements de l'apparence physique (couleur, turbidité, viscosité) ainsi que la réduction de l'effet thérapeutique [12].

La quantité d'un agent de conservation nécessaire pour protéger un sirop contre une éventuelle croissance microbienne varie avec la proportion d'eau présente dans la préparation, la nature et l'activité de préservation inhérente de certaines matières premières et la capacité de l'agent de conservation lui-même [10].

Afin de minimiser ce risque de détérioration et pour tuer les faibles concentrations de contaminants, des agents de conservation sont ajoutés à la formulation et ces derniers doivent être stables pendant toute la durée de conservation de la formulation [12].

I.2.2. Les ampoules buvables

Les ampoules à 2 pointes constituent des doses unitaires liquides majoritairement utilisées pour l'administration des solutions buvables. Elles ont sur les autres formes liquides l'avantage d'une meilleure conservation. Si cela est nécessaire, les ampoules buvables peuvent même être remplies sous gaz inerte pour éviter l'action de l'oxygène et stérilisées pour assurer leur bonne conservation car ce type de procédés ne permet pas un remplissage suffisamment propre. La stérilisation se fait à l'aide d'un procédé compatible avec le produit et son conditionnement définitif : température plus ou moins élevée, filtration stérilisante ou éventuellement l'adjonction d'agents antimicrobiens [3, 13].

La méthode de remplissage des ampoules à pointes fines est identique à celle employée pour les solutions injectables, c'est-à-dire un remplissage collectif sous vide. Cette technique est le seul procédé utilisable pour la conception des ampoules buvables où un cristalliseur d'ampoules vides est noyé dans la solution médicamenteuse pour être remplies avant de laver et sceller leurs pointes [13].

I.3. Les incompatibilités physico-chimiques dans les formes pharmaceutiques liquides

Le potentiel d'instabilité chimique et physique des excipients dans les médicaments a été reconnu depuis plus de 30 ans. La compréhension de la chimie de dégradation de la substance active en présence des excipients est essentielle pour sélectionner les excipients appropriés aux étapes de la formulation [11].

Les études de compatibilité entre la substance active et les excipients ont un rôle clé au début des étapes de préformulation pour sélectionner les excipients ou après la

formulation pour aider à identifier le mécanisme de toute instabilité détectée. Une compréhension des interactions physicochimiques potentielles des substances actives avec les réactivités chimiques connues des excipients et de leurs impuretés facilitera la sélection appropriée des excipients [11].

Les conséquences d'avoir plusieurs composants dans une formulation sont la possibilité accrue d'incompatibilités physiques et/ou chimiques, ce qui résulte en un produit instable, ou un composant qui ne fonctionne pas en présence d'un autre [14].

Les réactions d'instabilité chimique apparaissent avec ou sans contribution microbiologique par des réactions telles que l'hydrolyse, l'oxydation, l'isomérisation et l'épimérisation. Les interactions entre les ingrédients et celles des ingrédients avec les matériaux du contenant (interactions contenant-contenu) ou avec le milieu extérieur (air, humidité, oxygène et lumière) sont les principales causes de ces réactions [11].

Nous pouvons distinguer deux types d'incompatibilités : les incompatibilités physiques qui sont le plus souvent visibles et les incompatibilités chimiques qui, elles, peuvent se manifester par des changements visibles et/ou invisibles (plus difficilement évitables). Dans la plupart des cas, les instabilités physiques sont des conséquences d'instabilités chimiques antérieures [11].

I.3.1. Les incompatibilités physiques

Elles se manifestent par la formation d'un précipité, l'apparition d'une coloration, un dégagement gazeux, etc. La plupart de ces réactions résultent d'un changement de solubilité d'un produit ou d'une réaction acide-base formant des substances non ionisées peu solubles ou des co-précipités d'ions. Ces réactions sont parfois réversibles et peuvent être prévenues en évitant les mélanges incompatibles [15].

I.3.1.1. Risques de précipitation

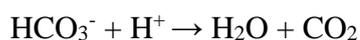
En solution, la précipitation d'une substance active ou d'un excipient instabilisé peut survenir à n'importe quel moment, et pas seulement à cause d'un problème de saturation dans le véhicule utilisé. La précipitation n'est pas nécessairement immédiate et sa cinétique dépend de nombreux éléments [16].

La formation des complexes entre les molécules organiques anioniques à haut poids moléculaire et les cations est une autre source du problème de précipitation [16]. Elle se produit très souvent entre une fonction acide carboxylique et un cation divalent [17]. La baisse de solubilité d'une substance active de type organique sous forme de base non ionique, en présence des électrolytes tels que le sodium, le potassium, le calcium ou encore des chlorures, suivant la concentration de ces derniers ou encore des variations de pH, peut entraîner la précipitation [16].

La précipitation des cristaux des substances actives est l'une des instabilités physiques les plus importantes dans les solutions et qui peut affecter sa performance [11].

I.3.1.2. Dégagement gazeux

Il s'agit de réactions chimiques libérant du dioxyde de carbone, résultat de la réaction entre des molécules contenant des groupements carbonyles et des acides comme le montre la réaction suivante [17, 15] :



Ce dégagement de dioxyde de carbone peut causer, dans certains cas, l'éclatement des ampoules buvables par effet de pression.

I.3.1.3. Les changements de couleur

Ils sont également des signes physiques d'incompatibilité, mais sont principalement le résultat de réactions chimiques ou de dégradation de l'un des composants de la préparation [16].

I.3.2. Les incompatibilités chimiques

Il s'agit d'un changement de pH, réactions d'oxydo-réduction, photo-réactions ou hydrolyse. Ces incompatibilités peuvent entraîner la dégradation d'un produit aboutissant à l'inactivation de la substance active ou la formation d'un composé toxique [15].

I.3.2.1. Changement de pH

Le pH est un facteur très important dans la stabilité et la compatibilité des substances médicamenteuses. En effet, de nombreuses substances sont instables à des pH basiques (au-dessus de 7) ou acides (au-dessous de 7). L'ajout d'une substance à caractère acide ou basique dans une solution peut provoquer un changement de son pH et entraîner

la dégradation du produit par des réactions de type acide-base. Pour pallier à cette problématique, des solutions tampons sont alors souvent utilisées pour stabiliser le pH d'une préparation médicamenteuse et éviter sa dégradation [17].

I.3.2.2. Réactions d'oxydo-réduction

Ce sont des réactions d'échanges d'électrons entre deux molécules modifiant la charge et aboutissant à un changement des propriétés physico-chimiques. L'oxydation est la perte d'électrons. Elle est catalysée par l'oxygène, la lumière, les ions OH^- , les ions de métaux lourds, etc. L'utilisation de matériaux d'emballages foncés permet de retarder ce phénomène [15]. La réduction quant à elle est le gain d'électrons. Elle se passe rarement avec les médicaments [17].

La plupart des molécules de substances actives sont sous forme réduite. Par conséquent, la présence de l'oxygène de l'air peut présenter des problèmes d'instabilité. On parle souvent d'auto-oxydation quand cette réaction est spontanée. Il est clair que cela peut être amplifié par le pH, selon la structure moléculaire de la substance active. Ceci est principalement dû au fait que le potentiel d'oxydoréduction de nombreuses réactions est dépendant du pH [16].

Les réactions d'oxydation sont complexes et il est difficile de comprendre le mécanisme de la réaction. La meilleure approche est d'éviter les excipients contenant des réactifs oxydatifs comme les peroxydes et les ions métalliques [11].

I.3.2.3. Photo-réaction

La lumière du jour, ou de manière plus spécifique les rayons UV, peuvent catalyser des réactions d'oxydation et d'hydrolyse. La photolyse, selon la molécule, est directement proportionnelle à l'intensité de la lumière, sa longueur d'onde et à la durée d'exposition et ceci lors du stockage et/ou de l'administration du médicament [15, 16]. L'énergie associée au rayonnement augmente que sa longueur d'onde diminue. Quand les molécules sont exposées à un rayonnement électromagnétique, elles absorbent la lumière (photons) à des longueurs d'onde caractéristiques, ce qui provoque une augmentation dans l'état énergétique du composé. Cette énergie peut provoquer la décomposition [18].

La solution la plus simple pour protéger une préparation du risque de photolyse est de la garder à l'abri de la lumière, soit à l'aide d'un contenant approprié, soit à l'aide d'un emballage secondaire adéquat [16].

I.3.2.4. Hydrolyse

L'hydrolyse d'une substance est sa décomposition par fixation des ions H^+ et OH^- provenant de la dissociation d'une molécule d'eau [16].

Les cas d'hydrolyse des substances actives sont, en majeure partie, la conséquence de la présence d'un carbone électrophile relié à un groupement qui peut facilement être libéré [19]. L'exemple des composés contenant un groupement carbonyle ou ester constituent l'essentiel des composés hydrolysables [2].

L'hydrolyse est le mécanisme le plus courant pour induire une incompatibilité entre la substance active et les excipients. La plupart des réactions d'hydrolyse sont catalysées par des acides et/ou des bases. Un changement d'une seule unité de pH peut augmenter ou diminuer le taux de réaction par un facteur de 10 [11].

I.4. Les facteurs pouvant favoriser les incompatibilités physico-chimiques

Les réactions décrites précédemment peuvent être influencées par de nombreux facteurs, ce qui complexifie la problématique des instabilités et des incompatibilités physico-chimiques [15]. Nous détaillons ci-après les facteurs pouvant influencer la stabilité et la compatibilité physico-chimique entre les différents composants d'un médicament.

I.4.1. La concentration

D'une manière générale, les produits sont plus stables en solution diluée car plus une solution médicamenteuse sera concentrée en substances plus l'équilibre d'une potentielle réaction chimique entre ces composants sera en faveur de la formation des produits de cette réaction [15].

Néanmoins, pour certains médicaments, la stabilité est meilleure en solution concentrée en raison de la présence d'un agent stabilisant en quantité plus importante [15].

I.4.2. Le pH

Le pH a un rôle important dans la solubilisation, et par conséquent dans la biodisponibilité de la substance active, mais peut également, à des valeurs extrêmes, être responsable d'une dégradation importante de la préparation. Le taux de dégradation est en effet beaucoup plus élevé aux valeurs extrêmes. Le pH optimal est souvent identique à celui de la meilleure solubilité pour une molécule donnée [16].

I.4.3. La température

La température est l'un des facteurs les plus importants dans la stabilité des médicaments, une augmentation de 10°C de la température de conservation pourrait augmenter de 2 à 5 fois la vitesse des réactions de dégradation [16].

Il a été aussi constaté que la baisse de température de conservation peut engendrer une instabilité chimique ou physique de la substance active comme dans le cas de la précipitation d'une solution saturée mise au réfrigérateur [16].

Pour certaines molécules, la stabilité physico-chimique n'est optimale que dans une petite fourchette de température en dehors de laquelle une augmentation de la dégradation est constatée [16].

En 1889, Svante Arrhenius a proposé l'équation mathématique suivante pour expliquer l'influence de la température sur la constante de vitesse, k.

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

Où :

A : Facteur de fréquence. Il ne dépend pas de la température.

Ea : Energie d'activation.

T : Température (en Kelvin).

R : Constante des gaz parfaits (R = 8,3145 J. mol⁻¹. K⁻¹) [20].

I.4.4. La Lumière

De nombreux textes de la littérature pharmaceutique font référence à l'instabilité de nombreux produits lorsqu'exposés à une forte lumière du soleil. Bien que, dans certains cas, l'instabilité est due à la chaleur qui accompagne les rayons du soleil. L'exposition d'un médicament, sensible à la lumière (photolabile), au soleil fournit suffisamment

d'énergie pour permettre la décomposition. Seul le rayonnement lumineux absorbé par le médicament est efficace pour produire une réaction photochimique [18].

I.4.5. L'oxygène

La présence d'oxygène au sein d'une préparation peut entraîner l'instabilité de celle-ci par oxydation de l'un de ses composants. Ce problème est souvent évité par le remplacement de l'air par un gaz inerte (généralement l'azote) durant le remplissage, l'ajustement du pH et sa stabilisation ou encore l'addition d'un agent chélatant. Les anti-oxydants, pour autant qu'ils ne créent pas d'autres problèmes de dégradation ou de toxicité, peuvent également être une solution directe et pratique [16].

CHAPITRE II :

GENERALITES SUR LES

CONSERVATEURS : CAS DU

METHYL- ET DU

PROPYLPARABENE SODIQUE

II.1. Contamination microbienne des produits pharmaceutiques

Dans un produit contaminé, le micro-organisme utilise celui-ci comme une source de nourriture pour en tirer de l'énergie. En échange, il diffuse dans le milieu des déchets provenant de cette transformation [21].

Dans la contamination microbienne des médicaments, il faut distinguer la contamination qui peut survenir lors du processus de fabrication, de la contamination qui survient après la fabrication. La contamination au cours de la fabrication peut avoir plusieurs origines. Elle peut être due aux matières (eau, produits biologiques d'origine animale, végétale, ou tellurique, etc.), aux locaux, au matériel, ou encore au personnel. La contamination après la fabrication concerne, quant à elle, le consommateur [21].

Comme déjà mentionné, la contamination microbienne peut survenir lors des différentes étapes de la vie du médicament et être de sources multiples [22] :

- **Liée aux matières premières**

L'eau est la principale matière première utilisée comme excipient dans les formes pharmaceutiques liquides ou comme agent de nettoyage ou de rinçage des locaux et du matériel. Elle est donc le constituant le plus souvent incriminé comme à l'origine des contaminations accidentelles. De plus, la multiplication microbienne ne peut se faire que dans les produits contenant une phase aqueuse, ce qui facilite aussi la propagation de la contamination à tout le contenu du récipient.

- **Liée aux locaux et au matériel**

La contamination peut être due à la réalisation de certaines opérations dans des locaux ou dans du matériel inadaptés ou insuffisamment protégés des sources de pollution (courant d'air, humidité, eau stagnante, etc.).

- **Liée au personnel**

Le personnel chargé de la fabrication, du conditionnement primaire et d'entretien, représente également une source non négligeable de contamination, par les germes dont il est porteur même en l'absence de toute pathologie infectieuse.

- **Liée au conditionnement primaire**

Certains articles de conditionnement primaire peuvent être à l'origine de la contamination du produit fini. A titre d'exemple, les articles de conditionnement (flacons, tubes, etc.) emballés directement dans des cartons peuvent entraîner la contamination du médicament par des moisissures véhiculées par les particules de carton.

- **Liée au consommateur**

En effet, le consommateur peut lui aussi être à l'origine de la contamination du produit soit en favorisant l'entrée d'air lors du prélèvement (flacon à large ouverture, pot, etc.) ou en effectuant des gestes qui favorisent l'inoculation du produit (prélèvement avec le doigt, remise dans le récipient de l'excédent du produit prélevé, etc.).

II.2. Conséquences d'une contamination [21]

La contamination microbienne peut être nuisible à la santé du consommateur, et dans une autre mesure pour le fabricant, pour des raisons économiques.

Au cours de l'utilisation du produit, des modifications des caractères organoleptiques et physico-chimiques du médicament peuvent y survenir. On peut observer :

- Un changement de coloration dû soit à la dégradation des composants du médicament, soit à la formation de métabolites diffusés par les contaminants.
- L'apparition de gaz, le plus souvent due au développement de bactéries anaérobies.
- Un changement olfactif, car certains micro-organismes produisent des composés d'odeur plus ou moins désagréable et peuvent modifier le parfum naturel du produit.
- Une modification du pH de la préparation, une oxydation, une réduction ou une hydrolyse acide/base de la substance active et/ou de certains excipients y compris les agents de conservation antimicrobiens, réactions dues à l'activité des enzymes bactériennes.
- L'apparition de troubles ou floculats dans les préparations limpides constitués par la biomasse bactérienne et/ou par des composants du produit insolubilisés sous l'influence du métabolisme microbien.

II.3. La protection vis-à-vis des micro-organismes [21]

La protection vis à vis des micro-organismes peut être réalisée par stérilisation, ou plus communément par addition d'agents antimicrobiens.

Il faut agir à tous les niveaux de la vie du médicament : il importe, en premier lieu, de bien connaître les sources possibles de contamination. On adoptera une hygiène industrielle maximale en respectant de manière rigoureuse les Bonnes Pratiques de Fabrication, on instaurera un système de protection efficace du médicament à l'utilisation et on fixera des taux de contamination maximums pour les produits finis.

En 1990, la Cosmetic, Toiletry & Perfumery Association a édité un fascicule de « Microbial Quality Management ». En préambule, les membres de ce comité insistent sur certaines notions d'importance capitale :

- La fonction du conservateur est de protéger le produit lors de son utilisation et non pas de se substituer à une hygiène rigoureuse en phase de production.
- La détermination in situ de l'efficacité du conservateur adapté à une formule donnée (challenge-test) est irremplaçable. Ce choix ne pouvant s'effectuer de manière satisfaisante sur la seule base de données théoriques.
- A chaque fois que cela est possible, le formulateur doit s'efforcer de développer des produits intrinsèquement hostiles à la prolifération microbienne afin d'éviter l'utilisation de conservateurs chimiques.
- Lorsque l'addition d'un conservateur est inévitable, son choix doit être effectué pendant la phase de développement du produit et il doit être considéré comme un élément de la formule à part entière.
- L'utilisation de matières premières biodégradables accentue la nécessité d'un système de protection efficace, dans la mesure où ces composés seront plus facilement employés comme source de nutriments par les micro-organismes contaminants.
- Toute modification dans les spécifications des matières premières entrant dans la composition d'un produit peut modifier l'activité du système de protection. Face à une telle situation, de nouveaux challenge-tests devront être entrepris afin de vérifier l'efficacité de protection du produit.

II.4. Qu'est-ce qu'un conservateur ?

Ils sont numérotés de E200 à E290 d'après les normes de la CEE-ONU. En réalité, il n'existe qu'une quarantaine de conservateurs autorisés par la réglementation [23].

Un conservateur se définit comme une substance chimique naturelle ou synthétique que l'on incorpore autant qu'additif dans un produit à usage alimentaire, cosmétique ou même pharmaceutique en vue d'accroître sa sécurité et sa stabilité microbiologiques. Cette définition n'inclue donc pas les actions contre la dégradation chimique apportées par les antioxydants par exemple [23, 24].

Ces additifs antimicrobiens sont seulement bactériostatiques au regard des doses faibles auxquelles ils sont employés. Ils ne peuvent donc pas rendre sain un produit contaminé, ni améliorer la qualité d'un mauvais produit. Ces additifs permettent seulement au produit de conserver plus longtemps ses caractéristiques de départ. La conservation chimique ne peut totalement empêcher les produits de s'endommager, mais ralentit le processus de détérioration causé par les micro-organismes [23, 24].

II.4.1. Selon la pharmacopée européenne

Si une préparation pharmaceutique n'a pas elle-même une activité antimicrobienne, des agents de conservation antimicrobiens peuvent être ajoutés, en particulier aux préparations aqueuses ayant une teneur en eau plus élevée telles que les solutions et les suspensions destinées à la voie orale, pour empêcher la prolifération ou limiter la contamination microbienne qui, dans les conditions normales de stockage et d'utilisation, pourrait survenir dans un produit et présenter un risque d'altération pour la préparation [9].

II.4.2. Selon la pharmacopée américaine

Les agents de conservation antimicrobiens sont des substances ajoutées aux produits pharmaceutiques aqueux. Des agents de conservation peuvent être ajoutés aux formes posologiques non stériles pour les protéger contre la croissance de micro-organismes introduits par inadvertance pendant ou après le procédé de fabrication [25].

II.5. Qualités requises d'un conservateur

Aucun conservateur ne remplit tous les critères d'un système idéal. En pratique, on utilise des associations de conservateurs. Si le conservateur idéal existait, il devrait présenter, en plus d'une conformité aux réglementations en vigueur, les critères suivants :

II.5.1. Innocuité

Le conservateur doit être dépourvu de tout effet toxique, irritant ou sensibilisant au niveau de la peau ou des membranes muqueuses, à la concentration utilisée pour la conservation, à court et à long terme [24].

II.5.2. Spectre d'activité

Le conservateur doit présenter un large spectre d'activité. Il doit être efficace contre les bactéries Gram + et Gram -, les levures et les moisissures. De plus, un haut niveau d'activité est demandé aux concentrations les plus faibles possibles [24].

II.5.3. Solubilité dans l'eau

Les micro-organismes se multiplient en phase aqueuse, il est donc important que le conservateur se maintienne à concentration efficace dans la phase hydrophile du médicament, d'où l'importance de la solubilité du conservateur dans l'eau [24].

II.5.4. pH de la formulation

La plupart des bactéries se développent à un pH neutre ou proche de la neutralité et étant donné que les micro-organismes peuvent supporter des variations de pH allant de 2 à 11, le conservateur idéal devrait être actif sur toute cette fourchette. En pratique, la majorité des préparations pharmaceutiques sont ajustées à un pH voisin de la neutralité, un pH qui permet la meilleure tolérance cutanée et de la muqueuse gastrique. De plus, l'efficacité de nombreux conservateurs est étroitement liée au pH du milieu. Le pH d'un médicament doit par conséquent être stable pendant sa durée de validité [24].

II.5.5. Propriétés physiques

Le conservateur idéal devrait être incolore, inodore et insipide dans le produit fini. En outre il doit être facile à utiliser et à incorporer [24].

II.5.6. Volatilité

Les conservateurs devraient être non-volatils, évitant une perte d'activité si le produit est sujet à une élévation de température [24].

II.5.7. Compatibilité

Il faut considérer la compatibilité du conservateur avec le processus de fabrication (Notamment si une étape de chauffage intervient dans ce processus), ainsi qu'avec le

réceptif de conditionnement et son mode de fermeture. Une qualité fondamentale pour le conservateur est qu'il doit être compatible avec tous les autres composants du médicament. Son contrôle doit donc être effectué sur le produit fini et, si possible, dans son récipient définitif pendant sa période de validité pour s'assurer que cette activité n'a pas été empêchée par le stockage [3, 9, 24].

II.5.8. Stabilité

Idéalement, les conservateurs devraient être hautement stables vis-à-vis de la température, de l'air, de l'humidité, de la lumière, de l'eau et du pH ; conférant ainsi une grande flexibilité d'utilisation, dans des procédés de fabrication divers [24].

II.5.9. Efficacité à long terme

Les conservateurs devraient maintenir leur efficacité durant toute la durée de vie du médicament et présenter une activité constante dans le temps. De plus, ils ne doivent pas être dégradés, provoquant ainsi le risque de produire des métabolites pouvant modifier les caractéristiques du produit fini ou être néfastes pour la santé du consommateur [24].

II.5.10. Coût

Un conservateur doit être rentable, facilitant ainsi son utilisation sur une commerciale peu onéreuse [24].

Cette liste de paramètres pouvant intervenir sur l'activité du conservateur montre qu'il est indispensable d'étudier profondément, lors de la phase de développement, le comportement de ces agents dans une formulation et leurs interactions avec les autres composants de la préparation.

Parmi les conservateurs antimicrobiens les plus utilisés dans le domaine pharmaceutique se trouve la famille des parabènes, il s'agit des esters de l'acide parahydroxybenzoïque, dérivé phénolique de l'acide benzoïque.

II.6. Acide benzoïque et ses dérivés

L'acide benzoïque est la structure de base qui, par adjonction d'un groupement hydroxyle en position para, donne naissance à l'acide p-hydroxybenzoïque. Ce dernier peut être estérifié pour donner naissance aux parabènes [26].

II.7. Les parabènes

Les parabènes (ou **para**-hydroxybenzoates) forment un groupe homologue dérivé de l'acide hydroxybenzoïque. Celui-ci est estérifié en C-4 par un alcool et, selon l'alcool utilisé, les différents parabènes sont obtenus ainsi que leurs dérivés sodiques [22].

La famille de ces molécules s'articule autour d'un même squelette chimique. Celui-ci est constitué d'un cycle unique aromatique, d'un groupement hydroxyle et d'un groupement ester en position para du cycle [27].

Les parabènes peuvent être utilisés seuls, en association avec d'autres parabènes ou avec d'autres agents antimicrobiens pour exercer une activité antimicrobienne et antifongique [28]. Il est reconnu que les parabènes sont des conservateurs présentant une innocuité relative. De ce fait, ils constituent les conservateurs de choix pour la plupart des formulations pharmaceutiques [29].

Les parabènes sont plus efficaces contre les levures et les moisissures que contre les bactéries et sont plus actifs contre les bactéries Gram+ que contre les bactéries Gram- [28].

II.8. Stabilité des parabènes

La performance des parabènes est affectée par un certain nombre de facteurs environnementaux y compris le pH de la formulation. En effet, il a été démontré que les solutions aqueuses de méthyl- et de propylparabène de pH compris entre 3 et 6 sont stables (moins de 10% de perte durant 4 ans à température ambiante) et peuvent être stérilisées par autoclave à 120°C pendant 20 minutes, sans décomposition [28].

L'efficacité de ces agents antimicrobiens est modérée à un pH supérieur à 7, ceci est dû à l'hydrolyse. A titre d'exemple, les solutions aqueuses de méthyl- et de propylparabène de $\text{pH} \geq 8$ sont sujettes à une hydrolyse rapide en raison de la formation de l'anion phénolate (perte de 10% ou plus en 60 jours à température ambiante). Plus la longueur de la chaîne alkyle est importante, plus la résistance à l'hydrolyse augmente [28].

Il a été prouvé qu'il y ait eu, à pH 8, une croissance microbienne à des niveaux sous inhibition dans le cas du méthyl- et du propylparabène [30].

Les parabènes subissent aussi une hydrolyse en solution alcaline faible ou d'acide fort et le produit d'hydrolyse, l'acide p-hydroxybenzoïque, n'a pratiquement aucune activité antimicrobienne [31].

II.9. Avantages des parabènes [21]

Les parabènes peuvent être considérés comme étant bien tolérés et ayant une faible toxicité générale. En effet, ils présentent beaucoup plus d'avantages :

- Ils offrent un très large spectre d'activité.
- Leurs propriétés organoleptiques sont favorables : inodores, insipides et incolores et ne provoquent pas la décoloration de la formulation. Leur pH quasi neutre ne cause pas de changement d'aspect du produit dans lequel ils sont incorporés.
- Ils présentent une excellente stabilité chimique dans un large intervalle de pH.
- Ils sont thermostables. Ainsi, les produits contenant des parabènes peuvent être stérilisés en autoclave sans perte d'efficacité antimicrobienne provoquée par l'hydrolyse de ces derniers.
- Ils sont stables également vis-à-vis de l'air, résistant à une hydrolyse dans une eau chaude ou froide et dans une solution acide faible.

II.10. L'utilisation en association

Pour évaluer l'efficacité d'un conservateur, on peut considérer deux facteurs :

- L'activité intrinsèque de la substance, souvent liée à son aspect lipophile, permet, plus ou moins bien, de traverser la paroi cellulaire et la membrane plasmique du micro-organisme.
- Sa solubilité aqueuse déterminante car la réplication microbienne a lieu généralement dans la phase aqueuse [21].

Avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle, l'activité des parabènes augmente alors que leur solubilité dans l'eau diminue. En considérant ces deux propriétés, on peut procéder à un mélange de parabènes de chaînes alkyles de longueurs différentes, permettant ainsi une augmentation de l'activité antimicrobienne tout en maintenant une solubilité suffisante dans l'eau [21].

L'association la plus fréquemment rencontrée est celle comportant du méthyl- et du propylparabène [21]. Par exemple, des combinaisons sont appliquées avec des concentrations généralement de 0,015 à 0,2 % pour le méthylparabène et de 0,02 à 0,06 % pour le propylparabène dans les formulations pharmaceutiques orales [32].

II.11. Incompatibilités

Les tests de compatibilité effectués entre les parabènes et les polyols (xylitol, glycérol, sorbitol) en solution aqueuse ont démontré clairement une interaction conduisant à des produits de transestérification avec la structure générale polyol esters d'acide parahydroxybenzoïque [33].

Aussi, une large gamme de matières premières a été signalée pour interagir avec les parabènes comme les dérivés de la cellulose, le trisilicate de magnésium, le talc, les huiles essentielles, l'éthanol, l'éthanolamine, la b-cyclodextrine et l'atropine. Par ailleurs, il a été démontré que l'activité antimicrobienne des parabènes est réduite en présence de surfactants non ioniques suite à une réaction de micellisation [28].

Il a également été rapporté que le magnésium aluminium silicate, le trisilicate de magnésium, l'oxyde de fer jaune et le bleu outremer absorbent le propylparabène, réduisant ainsi son efficacité de conservation [28].

Théoriquement, une réaction de transestérification pourrait se produire entre les parabènes et toute molécule contenant des groupements hydroxyles [31].

II.12. Les sels de parabènes

Les sels de parabènes, en particulier le sel de sodium, à savoir le méthyl- et le propylparabène sodique peuvent être utilisés de manière plus promue à la place des parabènes en eux-mêmes, en raison de leur plus grande solubilité dans l'eau. Cependant, le pH d'une formulation peut devenir plus alcalin en raison de la formation de l'anion phénolate [28]. Aussi, les sels de parabènes peuvent être particulièrement utiles lorsque le chauffage d'une préparation aqueuse est indésirable.

Les sels potassiques de parabènes ont montré une meilleure activité antimicrobienne contre plus de micro-organismes que leurs parabènes respectifs [34].

La dégradation de ces sels par hydrolyse transforme le parabène en acide parahydroxybenzoïque et en alcool, puis en phénol par décarboxylation [21].

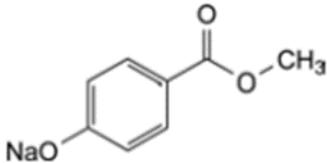
II.12.1. Le méthylparabène sodique

En pharmacie, le méthylparabène sodique est employé pour la conservation des préparations médicamenteuses liquides ou semi-solides. Il est préparé par estérification de l'acide p-hydroxybenzoïque avec du méthanol [28]. Une dose journalière admissible allant

de 0 à 10 mg/kg de poids corporel/jour a été établie par l'EFSA pour le méthylparabène et ses sels utilisés en tant qu'additifs [27].

Les principales propriétés physico-chimiques et organoleptiques du méthylparabène sodique sont présentées dans le **tableau II.1** ci-dessous.

Tableau II.1 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du méthylparabène sodique [9, 28]

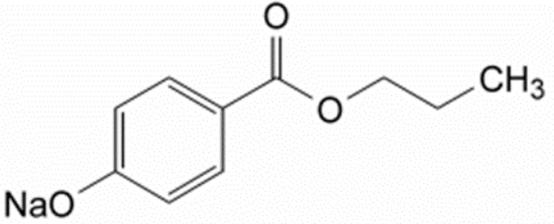
Propriétés physico-chimiques	Structure chimique	
	Synonymes	Para-hydroxybenzoate de méthyle sodique, nipagine sodique, E219.
	Formule empirique	$C_8H_7NaO_3$
	Masse moléculaire	174.14 g/mol
	Composition	Le para-hydroxybenzoate de méthyle sodique contient au minimum 95,0 % et au maximum 102,0 % de 4- (méthoxycarbonyl) phénolate de sodium, calculé par rapport à la substance anhydre.
	Acidité/alcalinité	pH = 9.5 - 10.5 (solution aqueuse à 0.1 % massique).
Solubilité	1g dans 50ml d'éthanol (95 %), 1g dans 2ml d'eau, pratiquement insoluble dans les huiles végétales et dans le chlorure de méthylène.	
Propriétés organoleptiques		Poudre hygroscopique cristalline blanche ou sensiblement blanche, inodore ou presque inodore.

II.12.2. Le propylparabène sodique

Le propylparabène sodique est inclus dans la base de données des ingrédients inactifs de la FDA (capsules orales, comprimés, suspensions) [28].

Dans le **tableau II.2** sont citées les principales propriétés physico-chimiques et organoleptiques du propylparabène sodique.

Tableau II.2 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du propylparabène sodique [9, 28]

Propriétés physico-chimiques	Structure chimique	
	Formule empirique	C ₁₀ H ₁₁ NaO ₃
	Masse moléculaire	202.2 g/mol
	Composition	Le para-hydroxybenzoate de propyle sodique contient au minimum 94,0 % et au maximum 102,0 % de 4-(propoxycarbonyl) phénolate de sodium, calculé par rapport à la substance anhydre.
	Acidité/alcalinité	pH = 9.5 - 10.5 (solution aqueuse à 0.1 % massique).
Solubilité	1g dans 1ml d'eau à 20°C, 1g dans 2ml d'éthanol (50 %), 1g dans 50ml d'éthanol (95 %), pratiquement insoluble dans les huiles végétales et le chlorure de méthylène.	
Propriétés organoleptiques		Poudre hygroscopique blanche ou sensiblement blanche, cristalline, inodore ou presque inodore.

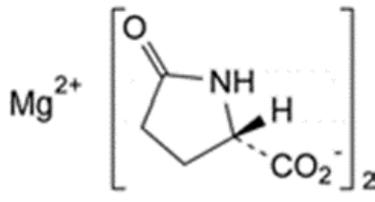
II.13. Interaction des parabènes avec les composés métalliques : cas du pidolate de magnésium

Le magnésium est un cation essentiel, impliqué dans de nombreuses réactions enzymatiques. Il a un rôle majeur dans le métabolisme énergétique ainsi que dans la synthèse des protéines. Un déficit magnésien ou une hypomagnésémie, traduit quasi constamment une pathologie sous-jacente d'origine digestive ou rénale [35, 36].

Pour remédier à une hypomagnésémie, des solutions buvables contenant du magnésium sont prescrites. Afin de protéger ces préparations d'une éventuelle prolifération microbienne, des agents conservateurs (les parabènes par exemple) y seront ajoutés.

Selon une étude chez l'animal, le pidolate augmente les propriétés pharmacologiques du magnésium, comparés à d'autres sels [37]. Certaines des propriétés physico-chimiques et organoleptiques du pidolate de magnésium sont regroupées dans le **tableau II.3**.

Tableau II.3 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du pidolate de magnésium [9]

Propriétés physico-chimiques	Structure chimique	
	Formule empirique	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₆ Mg
	Masse moléculaire	280.5 g/mol
	Teneur	8,49 % à 8,84 % de Mg (substance anhydre).
	Solubilité	Très soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène.
Propriétés organoleptiques		Poudre amorphe blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

CHAPITRE III :
LES ETUDES DE DEGRADATION
FORCEE

III.1. Généralités

Les études de dégradation forcée impliquent généralement l'exposition d'échantillons représentatifs de la substance active ou du produit médicamenteux aux conditions de stress pertinentes de lumière, chaleur, humidité, hydrolyse acide/base et oxydation [38]. Les études peuvent devoir être répétées à mesure que les méthodes, les procédés ou les formulations changent [39].

Une exposition suffisante d'une substance active ou d'une préparation médicamenteuse est atteinte lorsque la substance active se trouve dégradée à environ 10% de sa quantité initiale ou après une exposition supérieure à l'énergie fournie lors des essais de stabilité accélérés. L'application de cette règle empirique peut n'entraîner aucune dégradation dans certains cas [39].

Il est recommandé que les études de dégradation forcée doivent être entreprises à une concentration de 1 mg/ml. En utilisant une telle concentration en substance active, il est généralement possible d'obtenir même les produits de décomposition mineurs dans la gamme de détection [40].

Une enquête sur les publications traitant les études de dégradation forcée a révélé qu'il existait encore une variabilité énorme dans les conditions employées [5]. En dehors des conditions de stress photolytique explicitées dans la ligne directrice ICH Q1B (ICH Guideline, 1996), il n'existe pas de recommandations spécifiques fixant les conditions d'exposition vis-à-vis des autres facteurs à explorer (stress hydrolytique, thermique et oxydant), ni de recommandations sur les approches analytiques à employer. Par conséquent, les études de dégradation forcée n'ont pas un protocole général et bien précis pour leur réalisation. Ainsi, l'intensité des conditions de stress et la durée d'exposition sont donc à déterminer par l'expérimentateur et ce, en fonction des objectifs prédéfinis, des risques identifiés et des moyens disponibles [2].

III.2 Intérêt des études de dégradation forcée

Les études de dégradation forcée sont entreprises pour démontrer la spécificité lors de l'élaboration des méthodes indicatrices de stabilité, en particulier lorsque peu d'informations est disponible sur les produits de dégradation potentiels. Ces études fournissent aussi des renseignements sur les voies et les produits de dégradation des différents composants d'un médicament qui pourraient se former pendant sa durée de vie et leur caractérisation [39].

L'industrie pharmaceutique mène des études sur la dégradation forcée des médicaments pendant l'étape de préformulation pour sélectionner les matières premières appropriées et évaluer leur compatibilité pour développer la formulation [41]. Elles peuvent également être utiles pour investiguer la stabilité chimique et physique des formes cristallines, la stabilité stéréochimique de la substance active seule et dans une préparation, les problèmes liés au bilan massique et à la différenciation des produits de dégradation des différentes substances dans une formulation [39].

Les études de dégradation forcée permettent également de prévoir le devenir du médicament au niveau de l'organisme mais aussi dans l'environnement. En outre, ces études permettent aussi l'évaluation de la toxicité de la molécule [42].

La stabilité de différentes formulations dans des conditions de dégradation forcée spécifiées pourrait être comparée et les plus stables et robustes des formulations peuvent être sélectionnées pour des développements ultérieurs [41].

III.3. Exemples de conditions de dégradation forcée décrites en littérature

III.3.1. Dégradation hydrolytique

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par des bases ou des acides. Les études de dégradation forcée se font ainsi généralement en milieu aqueux à pH 1 (HCl 0,1 mol. l⁻¹) et à pH 13 (NaOH 0,1 mol. l⁻¹) [2].

Mais, tant que la solubilité de la substance active en milieu aqueux dépend de son état de charge qui est fonction du pH de la solution, il est possible que la substance active soit insuffisamment soluble pour évaluer son hydrolyse en milieu aqueux. Pour cette raison, il est d'usage d'avoir recours à de l'acétonitrile ou à du méthanol comme co-solvant [2]. Néanmoins, les alcools étant susceptibles d'induire des réactions secondaires (transestérification dans le cas du méthanol), surtout lorsque la substance contient une fonction acide carboxylique, amide ou ester [42], il est préférable d'utiliser l'acétonitrile réputé plus inerte. Ce dernier peut cependant induire des époxydations en milieu basique et en présence de peroxydes [2].

III.3.2. Dégradation oxydative

L'oxydation peut suivre plusieurs mécanismes : l'auto-oxydation, oxydation par les peroxydes ou par les électrons de transferts. L'étude de stress se fait classiquement par une dilution aqueuse de H₂O₂ (0.3-3%) à une température inférieure à 30°C. les températures

supérieures à 30°C peuvent dégrader H₂O₂ en radicaux libres qui, à leur tour, vont dégrader la molécule avec un mécanisme différent de celui souhaité. En plus, il est recommandé d'effectuer la dégradation dans un milieu sombre pendant 1 à 7 jours pour éliminer l'effet de l'oxydation due à la lumière [43].

La dégradation par H₂O₂ entraîne souvent une dégradation secondaire des dégradants primaires rendant l'interprétation des résultats plus difficile [38].

III.3.3. Dégradation thermique

Le mot « thermolyse » est utilisé pour décrire des réactions de décomposition chimique guidées par la chaleur. La dégradation thermolytique correspond à l'exposition à une température élevée, ce qui va provoquer la rupture des liaisons. Son mécanisme peut être considéré comme, hydrolyse, déshydratation, isomérisation, épimérisation, décarboxylation, réarrangement ou quelques types de réactions de polymérisation [42].

Ces tests sont généralement initiés à une température ambiante, en l'absence de dégradation, une température plus élevée est appliquée (50-70°C). Un contrôle thermique (c-à-d médicament en solution neutre à la même température de l'essai) doit également être exécuté pour identifier toute dégradation due à la température. Le temps de stress maximal ne devrait pas dépasser 7 jours. Les échantillons à analyser sont souvent neutralisés à l'aide d'un(e) acide/base/tampon pour éviter une décomposition plus poussée [38].

III.3.4. Dégradation photolytique

L'évaluation de la photostabilité des substances médicamenteuses comprend deux parties : les essais de dégradation forcée et les épreuves de confirmation de la stabilité. Quant aux médicaments, l'évaluation doit, normalement, suivre un enchaînement : le médicament est d'abord exposé directement à la lumière, puis, s'il y a lieu, il est exposé dans son emballage primaire et, enfin, dans son emballage commercial. Il faut poursuivre l'évaluation en passant à des essais de plus en plus poussés jusqu'à ce que les résultats montrent que le médicament est suffisamment protégé de la lumière [44].

Certains chercheurs l'ont trouvé pratique d'entreprendre ces études en commençant par des conditions extrêmes (80°C ou encore plus, 0,5N NaOH, 0,5N HCl, 3% H₂O₂) avec des fréquences de prélèvement plus courtes (2, 5, 8 et 24 heures) permettant ainsi une évaluation approximative des taux de dégradation. Les prélèvements à des temps précoces

peuvent permettre de distinguer les dégradants primaires et leurs produits de dégradation secondaires [45].

III.4. Méthodes indicatrices de stabilité

La mise en évidence des produits de dégradation nécessite une méthode d'analyse apte à détecter les produits de dégradation formés et à discriminer le signal de chaque produit de dégradation et de la substance active. Cette méthode doit aussi permettre de suivre leur augmentation et leur diminution. Ces performances analytiques peuvent être obtenues par le couplage de techniques de chromatographie liquide avec une détection fondée sur la spectroscopie UV-visible, ou la spectroscopie de masse [2].

Si une méthode indicatrice de stabilité n'est pas disponible dans la littérature, il peut être intéressant de chercher une monographie de la substance active dans une pharmacopée. En effet, les monographies des matières premières peuvent constituer une première approche. Ces monographies recensent les principales impuretés de synthèse. Il s'agit le plus souvent d'intermédiaires de synthèse et ces derniers sont parfois les premiers produits de dégradation. Néanmoins, il est important de ne pas perdre de vue que les pharmacopées ne précisent pas si la méthode de la monographie est aussi indicatrice de stabilité [16].

La stratégie de développement d'une méthode indicatrice de stabilité commence par un « screening » d'une méthode capable de séparer et de détecter un large éventail des produits de dégradation. Toutefois, il est impossible de développer une méthode indicatrice de la stabilité d'un nouveau médicament d'une manière idéale dès le début. Dans ce cas, la réalisation des études de dégradation forcée est beaucoup plus importante surtout lorsque les produits de dégradation potentiels sont inconnus [42].

Dans la pratique pharmaceutique actuelle, la méthode analytique la plus utilisée est la méthode HPLC liée à un détecteur à barrette de photodiode (DAD). Cette méthode d'analyse chromatographique est régie principalement par deux paramètres : les caractéristiques de la colonne disponible pour l'étude (contenant la phase stationnaire) et les proportions du mode gradient utilisées de la phase mobile [42].

Pour développer une méthode indicatrice de stabilité d'un composé et optimiser la séparation des différents pics, il est nécessaire de choisir des échantillons appropriés à ce processus soit en préparant des échantillons partiellement dégradés ou en utilisant des échantillons dopés avec des impuretés de la substance concernée. De toute façon, la

meilleure manière de développer une méthode spécifique à la substance médicamenteuse et ses impuretés consiste à utiliser ces deux méthodes à la fois [42].

Les méthodes d'analyse doivent être validées ou vérifiées, et l'exactitude ainsi que la précision (écarts-types) devraient être consignées. Les essais des substances apparentées ou des produits de décomposition utilisés doivent être validés pour démontrer qu'ils sont spécifiques au produit examiné et qui sont suffisamment sensibles [18].

Dans le cas des interférences dues aux excipients, l'exploration doit être faite lors de l'étude de linéarité en préparant des gammes avec et sans excipients, les rapports de concentrations entre la substance active et les excipients reproduisant la composition du produit fini. Le traitement des résultats des gammes de concentration s'attachera alors à démontrer l'absence de différences significatives entre les pentes et les ordonnées à l'origine des gammes obtenues dans chaque condition [16].

III.5. Le bilan massique

L'analyse des résultats obtenus à partir des études de dégradation forcée sera préférentiellement complétée par l'évaluation du bilan massique [16].

D'un point de vue théorique, une véritable diminution de la masse de la molécule mère dans les études de la dégradation forcée est nécessairement équivalente à la masse totale de tous les produits de dégradation formés [42]. Si une différence importante existe, plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Certains produits de dégradation ne sont pas mis en évidence par le système chromatographique et la méthode peut être discutable.
- Le coefficient de réponse de l'impureté est différent de celui de la substance active [16].

CHAPITRE IV :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours des trois étapes de son cycle de vie, la substance active est régulièrement exposée à un environnement aqueux, au sein des formes pharmaceutiques liquides, lors de son devenir dans l'organisme et/ou après son élimination dans l'environnement [2].

Au cours des trois étapes précédemment citées, des mécanismes de dégradation et/ou de métabolisation en milieu aqueux s'opèrent sur la substance active conduisant ainsi à des changements en matière d'identité et de teneur du médicament [2].

Ces transformations impliquent une disparition partielle ou totale de la molécule mère et, parallèlement, l'apparition d'autres composés de structure plus ou moins apparentée dont le profil de risque est souvent moins bien évalué voire reste inconnu [2].

La partie suivante est une synthèse de différentes études entre récentes et anciennes sur la dégradation des parabènes. Pour commencer, nous aborderons le comportement des parabènes dans différents milieux en présence de certains agents oxydants notamment ceux utilisés dans les procédés d'oxydation avancée. Nous citerons après quelques mécanismes de biotransformation des parabènes par des bactéries résistantes et nous finirons par décrire le devenir des parabènes dans l'organisme. La dégradation du pidolate de magnésium sera aussi traitée ainsi que des méthodes d'analyse indicatrices de stabilité.

IV.1. Comportement des parabènes

IV.1.1. En présence d'agents oxydants

IV.1.1.1. Le chlore

Le méthylparabène peut être dégradé d'un milieu aqueux contenant l'anion chlorure par un procédé électrochimique, principalement par oxydation, ce qui aboutit à la formation d'un sous-produit solide de nature polymérique constitué de produits de dégradation chlorés du méthylparabène, car lorsque des composés phénoliques et leurs équivalents oxydés sont présents dans la même solution, ils peuvent subir des réactions de polymérisation. Cette oxydation se produit initialement par la chloration et l'hydroxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque [46].

Une autre étude sur la cinétique de dégradation du méthyl- et du propylparabène par ClO_2 a montré une réaction de second ordre dont sa vitesse augmentait avec l'augmentation du pH et de la température. Deux produits de dégradation ont été générés, pour chaque parabène, par hydroxylation dont le schéma de dégradation est représenté

dans l'**APPENDICE B**. De plus, les deux produits étaient moins toxiques que le composé d'origine [47].

La dégradation des parabènes résiduels (le méthyl-, propylparabène) dans les eaux grises par oxydation des composés phénoliques par le dioxyde de chlore dans des contacteurs biologiques a été observé [48].

D'après une autre expérience, la réaction de chloration se produit au niveau du carbone en position ortho du cycle, celui en para étant bloqué par le groupement ester. La réaction a lieu plus facilement à pH alcalin (entre 7,3 et 8,0) en présence d'acide hypochloreux [49]. Il a été constaté aussi que la présence de brome dans l'eau intervient dans la réaction des parabènes avec le chlore et que la réaction de bromation est beaucoup plus favorable que la réaction de chloration surtout à 38°C [49].

Il a aussi été prouvé par que les dérivés halogénés des parabènes peuvent être formés par réaction des bactéricides parents avec le chlore résiduel de l'eau de robinet [50].

IV.1.1.2. Le fer

En 2018, la dégradation du propylparabène par le ferrate aqueux Fe(VI), 600 mM a été étudiée dans différentes matrices d'eau et a donné une réaction de second ordre à pH 7,0. Les produits de dégradation intermédiaires identifiés par HPLC/SM sont le benzoate de propyle, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide benzoïque [51].

Il a été suggéré, comme présenté sur le schéma réactionnel de l'**APPENDICE C**, que la voie de dégradation du propylparabène par oxydation se déroule par la formation de liaisons hydrogènes accompagnée d'un transfert intermoléculaire d'électrons. Le Fe(VI) oxyde le fragment phénol du propylparabène par un transfert d'électrons générant un radical phénoxy puis un électron est transféré à l'atome d'oxygène ce qui va rompre la liaison C-O du phénol impliquant une oxydation supplémentaire avec Fe(VI) à la formation de benzoate de propyle. D'autre part, Fe(VI) rompt la liaison ester pour former l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide benzoïque [51].

En 2014, la photodégradation de quatre parabènes a été évaluée, dont le méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène en présence de complexes Fe(III)-citrate sous simulation de lumière solaire et a montré que la dégradation des parabènes augmente avec la diminution du pH dans la plage de 5,0 à 8,0. L'oxydation des parabènes a donné naissance à certains intermédiaires d'hydroxylation et à des acides carboxyliques de faible poids

moléculaire, en effet le groupement OH formé dans la solution de citrate de Fe(III) était principalement responsable de la dégradation du méthylparabène. Premièrement, comme le montre le schéma réactionnel de l'APPENDICE D, le $\bullet\text{OH}$ a attaqué le noyau aromatique et le fragment méthyle du méthylparabène pour produire de l'acide benzoïque et de l'acide 4-hydroxybenzoïque (procédé a). Ces produits intermédiaires ont ensuite réagi avec le $\bullet\text{OH}$ pour donner l'acide 3-hydroxybenzoïque, l'hydroquinone, l'acide 2,4-dihydroxybenzoïque et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (procédé b). L'oxydation supplémentaire du $\bullet\text{OH}$ a provoqué le clivage des cycles benzéniques suivi par la génération d'acides carboxyliques de bas poids moléculaire tels que l'acide nonanedioïque, l'acide malonique, l'acide succinique, l'acide glutarique, l'acide adipique et l'acide heptanedioïque (procédé c) [52].

IV.1.1.3. Le dioxyde de titane

L'application du N-TiO₂ dans des réactions d'ozonation photocatalytique pour la dégradation d'un mélange de parabènes (méthyl-, éthyl-, propyl-, butyl- et benzylparabène) à 50 mg. l⁻¹ sous rayonnement UV a été étudiée. Un taux de dégradation important à un pH neutre a été remarqué [53].

Selon une autre étude réalisée en 2019, l'utilisation de l'Ag-TiO₂ comme catalyseur dans un procédé d'ozonation photocatalytique pour la dégradation d'un mélange de parabènes (méthyl- et propylparabène) dans une eau ultrapure a montré que la dégradation, à pH 7, était rapide [54]. Comme il a été montré en 2003, les valeurs élevées de pH favorisent l'auto-décomposition de l'ozone en radicaux hydroxyles, ce qui améliore la dégradation [55]. La dégradation des parabènes commence par l'attaque du cycle benzénique ainsi que d'autres fragments par le radical hydroxyle comme déjà montré en 2015 [56]. Cela peut conduire à des dérivés hydroxylés et désalkylés de parabènes tels que l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide 2,4-dihydroxybenzoïque et l'hydroquinone [57].

En 2019, une étude a été réalisée sur la dégradation photocatalytique de mélanges de parabènes (méthyl-, éthyl- et propylparabène) à partir d'eau ultrapure par des nanotubes de TiO₂ en utilisant une source d'irradiation. Des résultats positifs ont été obtenus sur l'efficacité de l'oxydation photocatalytique de ce système dans ces conditions [58].

Dans la littérature, les principaux sous-produits couramment identifiés à partir de l'activité des radicaux hydroxyles sur les parabènes (A) sont l'acide 4-hydroxybenzoïque (B), l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (D) et l'hydroquinone (C) [54, 56, 59]. Par

conséquent, les réactions les plus courantes pour la formation de sous-produits de parabènes comme le montre le schéma réactionnel de l'**APPENDICE E** sont la désalkylation (sous-produit B) et l'hydroxylation (sous-produits D et F) [56]. Cependant, une réaction de décarboxylation peut se produire induisant ainsi à la formation de l'hydroquinone (C). Le radical hydroxyle peut également attaquer le cycle benzénique lorsque des groupements esters sont présents (F) conduisant à des sous-produits aliphatiques [60].

IV.1.1.4. L'ozone

La principale réaction ayant lieu lors de la mise en présence des parabènes avec l'ozone est l'hydroxylation du cycle aromatique et de la chaîne ester. En raison de la nature électrophile de l'ozone, cette molécule ne peut réagir qu'avec le cycle aromatique des parabènes. La décomposition de l'ozone dans l'eau engendre la formation de radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$). Ces radicaux sont les seules espèces capables de réagir avec la chaîne ester des parabènes [61].

L'hydroxylation du cycle aromatique produit une série de composés hydroxylés générés par une réaction directe avec l'ozone ou un radical hydroxyle (**APPENDICE F**). Les deux principaux produits de dégradation identifiés sont l'hydroquinone et l'acide p-hydroxybenzoïque (**APPENDICE G**). La réactivité des parabènes vis-à-vis de l'ozone est dans l'ordre croissant méthylparabène < éthylparabène < propylparabène < butylparabène [61].

La dégradation, par ozonation, d'un mélange contenant du méthyl-, éthyl-, propyl-, butyl- et benzylparabène en solution aqueuse a été étudié en 2010. Il a été remarqué que la cinétique réactionnelle est de premier ordre avec deux étapes d'ozonation. Il a été constaté aussi que le taux de dégradation des parabènes se maximisaient à 35°C ainsi qu'à des pH alcalins. En effet l'augmentation de la basicité de la solution a fait que l'ion hydroxyde a agi comme initiateur et a ainsi accéléré la vitesse de décomposition de l'ozone en oxydants secondaires tels que les radicaux hydroxyles [62].

En 2019, une étude sur la dégradation de propylparabène en phase aqueuse dans un système d'ozonation photocatalytique ($\text{O}_3/\text{UV}/\text{ZnO}$) a été réalisée. Il a été révélé que la dégradation du propylparabène a suivi une cinétique de pseudo-premier ordre avec une dégradation maximale à pH 9 due à un effet synergique entre l'ozone et le zinc [63].

IV.1.1.5. Autres systèmes d'oxydation avancée

L'étude de dégradation des parabènes (méthyl-, éthyl- et butylparabène) dans les eaux par oxydation avancée sous l'action de différents systèmes (UV/H₂O₂, UV/S₂O₈⁻² et UV/Fe²⁺/H₂O₂) a montré que les rendements quantiques de dégradation augmentaient de l'ordre méthylparabène < éthylparabène < butylparabène. Ceci est lié à une diminution de la différence d'énergie de leurs orbitales LUMO-HOMO et à une augmentation de la longueur de leurs chaînes alkyles. L'analyse des sous-produits de dégradation par HPLC/SM a identifié, comme présenté dans le schéma de l'APPENDICE H, trois principaux mécanismes sous-jacents : la désestérification, l'hydroxylation radicalaire et la décomposition. Aucun des sous-produits de dégradation n'était toxique en fonction de leurs effets sur la viabilité des cellules HEK-293 [64].

Il a été aussi montré que la présence d'ions I⁻, Cl⁻, SO₄²⁻ et HCO₃³⁻ dans le milieu réactionnel a induit un taux de dégradation plus élevé des parabènes, ce qui peut être associé à une formation plus élevée de •OH et d'autres radicaux hautement oxydants [53, 54].

IV.1.2. Hydrolyse alcaline du méthylparabène par du NaOH

Plusieurs chercheurs ont étudié la réaction d'hydrolyse du méthylparabène catalysée par une base (NaOH 0.5M) et ont montré que sa cinétique de dégradation suit un modèle de pseudo-premier ordre, et que la réaction comprend deux étapes séquentielles [65, 66] :

La première (**Figure IV.1**) correspond à la déprotonation du groupe -OH du méthylparabène, qui se produit immédiatement lors de la dissolution du solide car le pKa pour l'ionisation de l'-OH (pKa = 8,42-8,87 dans la plage de température de 278-313 K) est considérablement plus faible que le pH de la solution initiale de NaOH (pH = 12,7) [65, 66, 67].

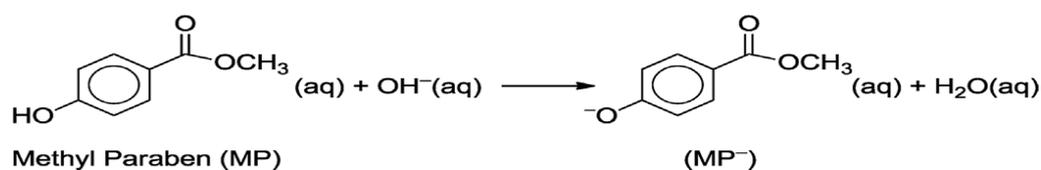


Figure IV.1 : Déprotonation du méthylparabène [65, 66, 67]

La seconde (**Figure IV.2**) est l'hydrolyse des espèces déprotonées (méthylparabène⁻) produites lors de la première étape [65, 66, 67].

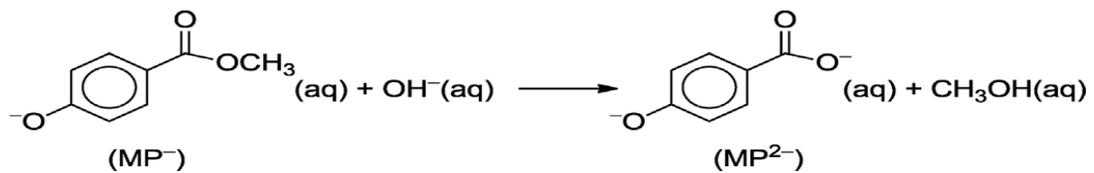


Figure IV.2 : L'hydrolyse des espèces déprotonées de méthylparabène [65, 66, 67]

En 1992, l'influence de la congélation sur l'hydrolyse alcaline ($\text{NaOH } 10^{-2} \text{ M}$) des solutions d'esters de méthyle, d'éthyle et de n-propyle p-hydroxybenzoate a été examinée et a montré que la cinétique de dégradation hydrolytique des parabènes est de pseudo-premier ordre avec une vitesse de réaction maximale entre -12 et -10°C [68].

Les taux d'hydrolyse accrus qui se produisent à l'état congelé par rapport à l'état liquide sont expliqués par la cristallisation des molécules d'eau dans la solution qui en résulte ensuite une augmentation de la concentration en ions hydroxydes dans la phase liquide restante [68].

IV.1.3. Interaction physico-chimique entre le méthylparabène et les polyols

En 1995, une analyse par HPLC et RMN d'une solution tampon ($\text{pH } 6,5 \pm 0,05$) contenant 15 % de xylitol et 0,13 % de méthylparabène et qui a été chauffée à 90°C pendant 1 heure a indiqué la présence de trois esters isomères (des esters de xylityle) de formule moléculaire $\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{Si}_5\text{O}_7$, attribués respectivement aux xylityl 4-hydroxybenzoates substitués en position 1, 2 et 3 qui ont été formés par transestérification ainsi que de l'acide p-hydroxybenzoïque. L'expérience a aussi montré que plus le pH augmente plus la vitesse de réaction est élevée avec une vitesse de réaction maximale à pH 10 [69].

Le méthylparabène peut réagir avec d'autres divers polyols tels que le glycérol et le sorbitol à des valeurs de pH élevées entre 9 et 11 par réaction de transestérification en raison des différents groupes hydroxyles des polyols, alors des isomères peuvent se former. [69]

Il faut s'attendre à un degré élevé de formation d'esters dans le cas des formulations pharmaceutiques à $\text{pH} \geq 7$, en particulier à des concentrations élevées de polyols. La transestérification peut être évitée dans ces formulations en abaissant, si possible, le pH ou en abaissant la concentration des polyols. Il faut tenir compte des modifications des

propriétés physiques causées par les faibles concentrations de polyols (l'isotonie) et par l'utilisation de parabènes à longue chaîne alkyle ayant une faible solubilité dans l'eau [69].

IV.1.4. Biotransformation des parabènes par des bactéries résistantes

Une souche EM de *E. cloacae* gram-, facultativement anaérobie, a été isolée et identifiée en 2001 à partir de lots d'un complément minéral alimentaire qui était normalement bien stabilisé avec du méthyl- et du propylparabène et il a été observé que [70] :

- La résistance de la souche EM aux parabènes se reflète dans les concentrations minimales d'inhibition. La concentration de méthylparabène nécessaire pour inhiber la souche était de 4000 mg. litre⁻¹ (26,3 mM). Les concentrations de propylparabène nécessaires pour empêcher la croissance de cette souche n'ont pu être déterminées qu'à des niveaux supérieurs à 600 mg. litre⁻¹ (3,3 mM) [70].
- La formation du phénol a été confirmée par la conversion stœchiométrique de l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol par une enzyme de type décarboxylase fonctionnant dans des conditions aérobies (voir **APPENDICE I**) [70].
- La souche EM était capable d'hydrolyser complètement environ 500 mg. litre⁻¹ de méthyl-, d'éthyl- ou de propylparabène en moins de 2 heures et un mélange de méthyl- et de propylparabène (1400 et 150 mg. litre⁻¹ respectivement), quantités similaires à celles utilisées dans les préparations commercialisées, en moins de 4 heures [70].

D'autres rapports sur les bactéries résistantes aux parabènes ont montré que :

- La décarboxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque en phénol par des bactéries aérobies a été signalée avec une souche de *E. aerogenes*, à la fois sous des conditions aérobies et anaérobies [71].
- La voie de dégradation habituelle de l'acide p-hydroxybenzoïque par les bactéries aérobies dont *Acinetobacter cal-coceticus*, *Pseudomonas putida* et *Agrobacteriumtumefaciens* est la voie β-cétoadipate, qui aboutit à la formation de l'acide protocatéchique au lieu du phénol [72, 73].
- Il a été documenté que dans des conditions anaérobies, l'acide p-hydroxybenzoïque peut être décarboxylé en phénol. Cette voie a été observée chez un certain nombre de consortiums anaérobies isolés de l'environnement ainsi que

dans *Clostridium hy-droxybenzoicum* et *Moorella* (basonyme, *Clostridium*) *thermoacetica* [74, 75].

- Une souche de *P. Aeruginosa* isolée en 1984 a pris 5 jours pour hydrolyser complètement 100 mg. litre⁻¹ de propylparabène [76]. Alors que la souche de *Cladosporium* isolée en 1962 était capable d'hydrolyser 70% d'une solution de méthylparabène de 2000 mg. litre⁻¹ en 5 jours [77].

Deux micro-organismes (*Pseudomonas beteli* et *Burkholderia latens*) résistants au méthyl- et au propylparabène respectivement ont été isolés et identifiés. La dégradation des parabènes par *P. beteli* et *B. latens* se fait par hydrolyse du parabène en acide p-hydroxybenzoïque et son alcool respectif [78].

En 2012, il a été montré que dans un système de biofilm aéré à lit de galets, la biodégradation du méthylparabène a donné des molécules de phénol [79]. De plus, certains rapports récents ont révélé que l'acide p-hydroxybenzoïque et le phénol étaient produits lors de la biodégradation des parabènes [80, 81].

IV.1.5. Transestérification des parabènes par voie enzymatique

En 2010, une étude a été menée sur l'effet d'addition d'alcools (méthanol, éthanol et propanol) dans des solutions aqueuses de pH 7,0 à 25°C sur la transformation des parabènes (méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène) cibles dans les boues activées induite par les enzymes d'Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens*. D'abord les chercheurs ont observé une dégradation efficace de 4 homologues de parabène, dans des solutions diluées de boues activées, suivant une cinétique de dégradation de premier ordre. Ensuite ils ont aussi observé l'hydrolyse des parabènes en acide p-hydroxybenzoïque dans des solutions enzymatiques d'Amano lipase de *Pseudomonas fluorescens* sans alcool ajouté. Après ajout d'alcool dans le système, différents résultats ont été notés [82] :

Avec ajout du méthanol au système, une transestérification efficace du butyl-, propyl- et éthylparabène en méthylparabène s'est produite [82].

Avec ajout d'éthanol au système on peut observer une transestérification du butyl- et du propylparabène en éthylparabène [82].

Avec ajout du propanol au système on peut observer que l'hydrolyse des parabènes est prédominante que la transestérification [82].

En 2017, la transformation du propylparabène en méthylparabène par transestérification dans une eau grise synthétique par une biomasse aérobie n'a été observée qu'en présence de traces de méthanol [83]. En 2018, une expérience similaire a été réalisée dans les mêmes conditions dans un système à boue activée en présence d'enzymes (biocatalyseurs, en particulier les lipases) et les mêmes résultats ont été obtenus après ajout du méthanol et de l'éthanol [84].

La transestérification a été expliquée par le fait que l'amano lipase attaque d'abord le carbonium du groupe ester pour former un intermédiaire covalent et libérer l'alcool endogène. Ensuite, l'intermédiaire présumé réagit avec l'alcool exogène et enlève l'amano lipase liée pour donner un parabène nouvellement formé, ou avec l'eau pour libérer l'acide p-hydroxybenzoïque [82].

Il a été signalé que certains micro-organismes, tels que : *Bacillus*, *Bacillariophyta*, *Fusarium sambucinum*, *Absidiaglauca*, etc., produisent de la lipase ou de l'estérase et qu'ils interviennent dans l'hydrolyse et la transestérification de l'ester (par catalyse enzymatique). Cela suggère une liaison préférentielle des fragments hydrophobes des enzymes au site actif des esters avant l'hydrolyse [82].

IV.1.6. Métabolisme des parabènes

Dans la littérature, quatre espèces animales (rat, chien, chat et lapin) ont servi à l'étude toxicocinétique (ADME) des parabènes. Par voie orale, l'absorption des parabènes est rapide et importante (jusqu'à 94 % de la dose est excrétée dans l'urine). Ils sont très rapidement métabolisés puisque les composés parents se retrouvent à des niveaux négligeables dans le sang et que divers métabolites sont présents dans l'urine dans l'heure suivant l'administration [85].

Quelle que soit l'espèce étudiée, la métabolisation des parabènes aboutit à l'hydrolyse de ces derniers en acide p-hydroxybenzoïque qui est le métabolite principal. Ce métabolite peut être ensuite conjugué notamment avec la glycine, l'acide glucuronique ou le sulfate pour former l'acide para-hydroxyhippurique, le glucuronide para-hydroxybenzoyle ou le sulfate para-carboxyphényle (schéma de l'**APPENDICE J**) [85].

Ce schéma de métabolisme est confirmé par une étude française dirigée en 2012 qui repose sur des études de toxicocinétique du profil d'ADME du méthyl-, propyl- et butylparabène à la suite de doses uniques de 100 mg/kg de poids réalisées chez l'animal.

Le principal métabolite est l'acide p-hydroxybenzoïque (un métabolite détoxifié qui n'a aucune activité œstrogénique et qui n'a aucun risque pour la santé) ce qui suggère que les parabènes subissent un métabolisme de premier passage dans le foie avant d'atteindre la circulation systémique [86].

Il a été démontré en 2010 que l'hydrolyse des parabènes à longue chaîne alkyle, dans la peau ou dans le foie humain, est plus lente que celle des parabènes à courte chaîne alkyle [87].

Dans une évaluation des aspects sanitaires du méthyl- et du propylparabène, le comité spécial des substances GRAS n'a signalé aucune accumulation des parabènes dans l'organisme des rats, des lapins, des chiens, des chats et des humains. Les principaux métabolites excrétés dans l'urine, par ordre décroissant sont l'acide p-hydroxybenzoïque > les conjugués glycine > acide glucuronique > acide sulfurique conjugués de l'acide p-hydroxybenzoïque [88].

Le devenir métabolique du méthylparabène a été étudié chez le lapin après administration d'une dose unique (0,4 ou 0,8 g/kg de poids). 39 % de la dose du méthylparabène administrée a été excrétée sous forme d'acide p-hydroxybenzoïque libre, tandis que le reste est apparu sous forme de glycine (15 %), d'acide glucuronique (ester 7 % et éther 15 %) et d'acide sulfurique (10 %) conjugués de l'acide p-hydroxybenzoïque [89, 90, 91].

La pharmacologie du méthyl-, de l'éthyl- et du propylparabène a été étudiée chez le rat après administration orale de 100 mg de ces esters. Il a été suggéré qu'il y avait deux étapes de détoxification du parabène. La première étant l'absorption rapide du parabène par le tractus gastro-intestinal et l'excrétion de l'acide p-hydroxybenzoïque dans l'urine et la seconde, la détoxification métabolique par conjugaison glucuronique, sulfoconjugaison et glycino-conjugaison [92].

Le devenir métabolique de l'éthyl- et du propylparabène marqués au C14 et administrés à des chats mâles à des doses de 156 et 158 mg/kg de poids par voie orale, respectivement a été étudié. Les deux chercheurs. On a conclu que dans les 72 heures suivant l'administration orale, les deux parabènes étaient complètement excrétés et que les principaux métabolites urinaires étaient l'acide p-hydroxyhippurique et l'acide p-hydroxybenzoïque [93].

Des études in vitro réalisées en 1997 suggèrent que les estérases qui sont présentes dans le foie et les reins sont extrêmement efficaces pour hydrolyser les parabènes (100% d'hydrolyse en 3 minutes) [94].

Chez un volontaire humain ayant reçu 2 g de propylparabène par jour pendant 5 jours, 17,4 % de la dose administrée a été excrétée sous forme d'acide p-hydroxybenzoïque, dont 3,7 % a été associé à de la glycine et 13,7 % était sans glycine [29].

IV.2. Données sur la transformation du pidolate de magnésium

En milieu aqueux, la condensation de l'acide glutamique en acide pyroglutamique (APG) devient une réaction équilibrée. D'une façon générale, et à des pH variant de 3 à 10, la formation d'APG est favorisée quand la température augmente, tandis que l'hydrolyse de l'APG en acide glutamique devient totale en milieu fortement acide ou alcalin. Dans ce dernier cas, la racémisation est rapide (voir **APPENDICE K**) [95].

Notons qu'en solution aqueuse tamponnée, une réaction secondaire lente et irréversible de décarboxylation d'APG en pyrrolidone a été observée [95].

A partir de l'acide pyroglutamique, qui est le produit de condensation cyclique de l'acide glutamique, on peut obtenir du pyroglutaminol et du prolinol par hydrogénation catalysée par du ruthénium, et du succinimide par décarboxylation oxydative sur catalyseurs d'Argent. Cette dernière réaction, cependant, utilise le persulfate de potassium comme oxydant, produisant une grande quantité de déchets de sel (schéma **APPENDICE L**) [96].

Comme il a été démontré que le palladium (Pd) et le platine, soutenus par le carbone sont les meilleurs catalyseurs pour la décarboxylation dans les solvants organiques ainsi que dans l'eau, En 2015, des chercheurs ont décidé dans une première expérience d'exposer l'acide pyroglutamique à un catalyseur Pd/C dans l'eau à 250°C sous 40 bars de N₂ et de vapeur. Après 6 heures, l'analyse quantitative a montré que la 2-pyrrolidone s'était formée avec un rendement de 56 % à une conversion de 83 % de l'acide pyroglutamique. L'acide pyroglutamique a également été exposé à un Catalyseur Pd/Al₂O₃ dans des conditions identiques à celles du catalyseur Pd/C. Cela a donné 70% de 2-pyrrolidone à une conversion d'acide pyroglutamique de 86%, ce qui a confirmé l'excellente activité de décarboxylation [96].

Dans la décarboxylation de l'acide pyroglutamique sur Pd/C ou Pd/Al₂O₃, en plus de la 2-pyrrolidone, plusieurs produits secondaires ont été identifiés par GC-MS et 1H-NMR : acide propionique (PA), Acide γ -hydroxybutyrique (GHB), γ -butyrolactone (GBL) et pyrrolidine, avec des rendements respectifs de 12 %, 4 %, 2 % et 1 % [96].

IV.3. Méthodes d'analyse indicatrices de stabilité

Une nouvelle méthode RP-HPLC simple, spécifique, sensible, rapide et précise a été développée pour le dosage du méthyl- et du propylparabène dans les formulations pharmaceutiques ainsi que du phénol, qui est leur principal produit de dégradation. La séparation a été effectuée dans une colonne C18 à l'aide d'une phase mobile (acétonitrile/tampon d'acétate de pH 5 ; 25/75 v/v) en mode gradient. La détection a été effectuée à une longueur d'onde fixe ($\lambda = 271\text{nm}$) avec un débit de 1,3 ml/min [97].

Dans ces conditions, les temps de rétention relatifs du propylparabène, méthylparabène et du phénol étaient de 1.00, 0.53 et 0.46 min respectivement [97].

La réponse du détecteur était linéaire à des concentrations variant de 10 à 60 $\mu\text{g/ml}$ pour le méthylparabène, de 3 à 15 $\mu\text{g/ml}$ pour le propylparabène et de 0,125 à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ pour le phénol. La variation intra et inter journalière s'est avérée inférieure à 2 %. Les limites de quantification et de détection du phénol sont respectivement de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ et de 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Le taux de récupération était égal à 101,8 % pour le méthylparabène, 101,2 % pour le propylparabène et 98,4 % pour le phénol [97].

Par la performance de cette méthode, le suivi du mécanisme de formation du phénol à partir des parabènes a été effectué [97].

Les concentrations de méthyl- et de propylparabène dans les échantillons ont été déterminées par un système HPLC (Shimadzu, Japon). L'échantillon a été dilué de façon appropriée et 10 μl ont été injectés dans une colonne C18 à phase inverse. Les composés ont été élués par pompage d'une phase mobile d'acétonitrile/tampon phosphate de pH 3,5 à 50 mM (50:50 v/v) à un débit de 1 ml/min et détectés par un photomètre UV à la longueur d'onde de 254 nm. La méthode a été validée pour sa précision et sa linéarité dans la plage utilisée (10 à 200 $\mu\text{g/ml}$). Les surfaces des pics des échantillons et des pics des standards ont été utilisées pour calculer les concentrations du méthyl- et du propylparabène dans les échantillons. Des produits de dégradation présumés, à savoir le phénol et l'acide p-

hydroxybenzoïque, ont également été injectés à une concentration de 100 µg/ml pour vérifier leur présence dans les solutions de parabènes inoculées [98].

IV.4. Proposition d'un protocole expérimental

L'aboutissement à une formule galénique stable nécessite des études de dégradation forcée, et le choix des tests va dépendre de la nature de la substance active et de la forme pharmaceutique.

Dans les formes liquides, les parabènes sont souvent associés à la préparation comme conservateurs antimicrobiens pour la protéger contre les micro-organismes.

Dans le cas d'une solution de pidolate de magnésium contenant du méthyl- et du propylparabène sodique, et sur la base des données bibliographiques énoncées, nous recommandons le protocole des tests de dégradation forcée à entreprendre et qui est résumé dans le **tableau IV.1**.

Des séries de solutions sont préparées :

- Série 1 : (méthylparabène sodique + propylparabène sodique) / eau
- Série 2 : pidolate de magnésium / eau
- Série 3 : (pidolate de magnésium + méthylparabène sodique) / eau
- Série 4 : (pidolate de magnésium + propylparabène sodique) / eau
- Série 5 : (Pidolate de magnésium + méthylparabène sodique + propylparabène sodique) / eau

En 2015, il a été démontré que la dégradation du méthyl- et du propylparabène, dans un intervalle de pH entre 5.5 et 7.5, mène à la formation de l'acide p-hydroxybenzoïque qui se transforme ensuite en phénol. Dans le cas d'une association de méthyl- et de propylparabène, la présence de l'acide p-hydroxybenzoïque seulement a été remarqué, étant le produit de dégradation primaire des parabènes, cette association a empêché sa décarboxylation en phénol [97].

C'est pour cela qu'il n'est pas nécessaire de faire une étude de dégradation des parabènes mais la série 1 est préparée pour confirmer si le pH alcalin supérieur à 7.5 n'influence pas l'absence du phénol dans le cas d'une association de méthyl- et de propylparabène.

La série 2 est proposée pour étudier la dégradation du pidolate de magnésium en milieu alcalin et pourrait servir comme blanc pour les séries 3, 4 et 5.

La série 3 et 4 ont pour objectif d'étudier l'effet de la longueur de la chaîne alkyle des parabènes sur leur dégradation en présence du pidolate de magnésium. L'évaluation de l'effet de l'association du méthyl- et du propylparabène sur leur dégradation en présence du pidolate magnésium se fera au moyen de la série 5.

Comme recommandé, et dans le but d'obtenir même les produits de décomposition mineurs dans la gamme de détection, les concentrations des solutions en parabènes et en pidolate de magnésium sont à 1 mg/ml [40].

Chaque solution de chaque série sera étudiée dans un intervalle de pH alcalin variant de 7 à 10 passant par 7.5, 8 et 9.

Ces différentes séries de solutions vont être exposées à différents paramètres de stress (température, pH, agents oxydants) afin d'étudier différentes voies de dégradation (hydrolyse, oxydation).

IV.4.1. La température

Les températures de stress sont en relation avec les conditions de stockage de la substance en question :

- Substance conservée à -20°C : température de stress $\geq 15^{\circ}\text{C}$
- Substance conservée entre 5°C et 30°C : température de stress $\geq 50^{\circ}\text{C}$ [44].

La condition maximale de stress est définie en tenant compte de la durée d'exposition. En effet, il est préférable de réaliser l'étude de dégradation sur une durée plus longue et à une température plus basse sans dépasser les 80°C car des températures trop élevées risquent d'entraîner des processus de dégradation secondaires non représentatifs [99].

Dans notre cas, ces trois matières premières sont généralement conservées à température ambiante, donc nous optons pour une température de stress de 60°C.

IV.4.2. Le pH et la dégradation hydrolytique

Afin d'évaluer l'impact du pH sur l'hydrolyse de ces molécules, chaque série comportera des solutions à différents pH alcalins. Pour se faire, nous utiliserons une

solution de HCl 0.1M ou de NaOH 0.1M pour ajuster le pH et ce, selon le pH de la solution initial et celui que nous voudrions atteindre.

Le choix d'un milieu alcalin revient aux propriétés des matières premières. Selon le handbook of pharmaceutical excipients, l'ajout de sels de parabènes peut rendre le pH d'une formulation plus alcalin. Ainsi, des expériences ont montré que le pidolate de magnésium augmente le pH d'une solution.

Les tests d'hydrolyse s'effectueront dans une fiole borosilicatée avec fermeture étanche pour éviter le contact avec le milieu extérieur.

Au moment du prélèvement, l'échantillon à analyser sera neutralisé avec une solution de HCl 0.1M pour stopper la dégradation [42].

IV.4.3. La dégradation oxydante

La dégradation oxydante des parabènes se déroulera selon deux voies distinctes :

En 1^{er} lieu nous utiliserons du peroxyde d'hydrogène afin d'évaluer l'effet oxydant de l'oxygène sur les deux conservateurs en présence du pidolate de magnésium.

Le fait de soumettre les solutions à 0,1 à 3 % de H₂O₂ à la température ambiante pendant 7 jours ou jusqu'à un maximum de 20 % de dégradation pourrait potentiellement générer un produit de dégradation pertinent. [40]

En 2^{ème} lieu nous utiliserons le réactif de Fenton afin d'évaluer l'effet oxydant d'un métal de transition sur les deux conservateurs dans ces conditions [39, 100]. Cette voie est catalysée par la lumière. L'utilisation des métaux de transition (Fe³⁺) à une concentration de 1 à 5 mM pendant 1 jour est recommandée [43].

Tableau IV.1 : protocole expérimental proposé pour les études de dégradation forcée des parabènes en présence du pidolate de magnésium

Type de dégradation	Série à dégrader	Conditions expérimentales	Fréquences de prélèvement
Hydrolyse	Toutes les séries	Solutions à différents pH (7, 7.5, 8, 9, 10) Conservation à 25°C et 60°C	1, 3, 5 et 10 jours

Oxydation	Toutes les séries	H ₂ O ₂ Concentration entre 0.1 et 3% à 25°C	1, 3, 5 et 7 jours
		Fe ³⁺ (FeCl ₃ ou Fe ₂ (SO ₄) ₃) Concentration entre 1 et 5mM à 25°C	1, 4, 8, 12 et 24 heures

IV.4.4. Méthodes de contrôle

Divers paramètres peuvent être contrôlés afin de vérifier que les propriétés initiales des solutions sont maintenues durant toute leur durée de conservation. Les principaux paramètres à contrôler ainsi que les techniques utilisables sont décrits ci-dessous.

IV.4.4.1. La mesure de la limpidité et du degré d'opalescence des liquides

La mesure de la limpidité est décrite comme une méthode visuelle, qui permet de comparer un liquide à examiner par rapport à des suspensions témoins extemporanées. Il existe ainsi des méthodes instrumentales (néphélométrie, turbidimétrie) reposant sur la mesure de la densité optique après agitation [16].

IV.4.4.2. Mesure du pH

Lors de la conservation, plusieurs causes peuvent induire une modification de pH : une dégradation de la substance active, une dégradation d'un excipient, une interaction contenant/contenu ou la diffusion du gaz carbonique ambiant à travers le conditionnement. Ainsi, toute modification du pH marquera une modification de la solution initiale préparée [16].

IV.4.4.3. La coloration

Une préparation pharmaceutique sous forme de solution doit garder tout au long de sa conservation une composition constante, ce qui signifie une constance de toutes ses propriétés physiques, telles que la coloration. En effet, un changement de couleur signifie un changement de composition. Toutefois, un non changement de couleur ne signifie pas

un non changement de composition. La coloration d'une solution peut être évaluée soit à l'œil nu, soit par spectrophotométrie visible [16].

IV.4.4.4. La viscosité

Durant la conservation, la viscosité peut évoluer soit en donnant des produits plus fluides ou au contraire plus visqueux. Cette propriété ne doit pas évoluer au cours du temps [16]. Une mesure de la viscosité, à l'aide d'un viscosimètre, pourrait s'effectuer.

IV.4.4.5. Méthodes d'analyse indicatrices de stabilité

Afin d'analyser et d'évaluer le taux de dégradation d'une substance ainsi que ces produits de dégradation, on a généralement recours aux méthodes indicatrices de stabilité. La méthode d'analyse la plus utilisée dans le domaine pharmaceutique c'est la méthode HPLC. Pour plus de précision, cette dernière peut être couplée à la spectrométrie de masse. Dans notre cas, et d'après la synthèse bibliographique, nous pouvons utiliser l'une des méthodes validées trouvées dans la littérature.

CONCLUSION

Notre travail a eu pour objectif d'étudier la dégradation de deux sels de parabènes : le méthyl- et le propylparabène sodique dans un milieu liquide alcalin en présence d'une substance active : le pidolate de magnésium.

Au cours de notre synthèse bibliographique, nous avons évalué la dégradation des parabènes dans différents milieux et selon différentes voies ainsi que leur métabolisation dans différents organismes y compris le corps humain.

D'après les données de la littérature, les dérivés d'esters de l'acide p-hydroxybenzoïque sont des molécules qui s'hydrolysent facilement dans les milieux alcalins à des pH supérieurs à 7. Cette réaction peut être catalysée soit par l'augmentation de la température, soit en présence de certains agents chimiques possédant des propriétés oxydantes tels que les composés métalliques (Fe, Cu, Zn, etc.) ou en présence de certains ions halogénures tels que I^- , Cl^- , Br^- ou en présence d'ions de SO_4^{2-} et de HCO_3^- .

Il a été démontré par plusieurs chercheurs que les parabènes peuvent être hydrolysés par des micro-organismes résistants en les transformant en acide p-hydroxybenzoïque avec leurs alcools respectifs. De même, d'autres études ont révélé que des réactions de transestérification des parabènes par voie biologique ou par voie normale peuvent avoir lieu en présence de polyols ou d'alcools tels que le méthanol ou l'éthanol.

Afin de mieux illustrer les différentes voies de dégradation (hydrolyse, oxydation, etc.) des parabènes en milieu aqueux, des études de dégradation forcée sont grandement recommandées pour collecter des informations sur la stabilité chimique de ces composés afin de prévoir leur comportement au cours de la fabrication d'un médicament, de développer une méthode d'analyse indicatrice de stabilité, d'évaluer la toxicité des produits de dégradation sur l'organisme et de connaître leur impact écologique et environnemental.

Pour conclure, l'avenir de la recherche scientifique dans le domaine pharmaceutique ne se résume pas uniquement à la découverte de nouvelles molécules possédant un effet thérapeutique, mais se base aussi sur une meilleure exploitation de celles qui sont déjà connues en les rendant plus sûres et plus efficaces soit par de nouvelles associations avec d'autres excipients soit par une meilleure optimisation des formulations assurant ainsi une stabilité chimique plus importante tout en minimisant ses risques sur la santé humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Ronchia Federica, Serenoa Antonio, Paidea Maxime, Henniaa Ismaël, Sacréb Pierre, Guillaume George, Stéphane Vincent, Goole Jonathan, Amighi Karim. Development and evaluation of budesonide-based modified-release liquid oral dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Vol. 54. (September 2019).
- [2] Secrétan Philippe-Henri. Caractérisation des processus de dégradation de nouveaux anticoagulants et d'un cytotoxique en milieu aqueux avec évaluation des impacts pharmaceutiques et environnementaux. Thèse de doctorat. Université Paris-Saclay, 2018.
- [3] Le Hir A., Chaumeil J-C., Brossard D. Pharmacie galénique Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 9^{ème} édition. 2009.
- [4] Martini M.C., Seiller M. Actifs et additifs en cosmétologie. Conservateurs antimicrobiens. 2^{ème} édition. 1999.
- [5] Steven W. Baertschi, Karen M. Alsante, Robert A. Reed. Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation. 2^{ème} édition. 2011.
- [6] Gana Inès. Caractérisation physique et chimique des substances à activité thérapeutique : application aux études de profil de stabilité et de préformulation. Thèse de doctorat. Université de Monastir et Université Paris Descartes. 2015.
- [7] Badran, A. M., & Crenn, P. Les sels de magnésium oraux. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. Vol. 23, n° 1. (Mars 2009). 9–15.
- [8] Code de la santé publique. Version en ligne sur le site Légifrance. <https://www.legifrance.gouv.fr/>. Consulté le 08/09/20.
- [9] Pharmacopée européenne préparations liquides pour usage oral, méthyle (parahydroxybenzoate de) sodique, propyle (parahydroxybenzoate de) sodique. 8^{ème} édition, 2013.
- [10] Loyd V. Allen, Jr., Nicholas G. Popovich, Howard C. Ansel. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 9^{ème} édition. 2005.
- [11] Cox Gad Shayne. *Pharmaceutical manufacturing handbook Production and Processes*. Section 4 : Normal dosage forms. 2008.

- [12] Anjumn Shabir. Strategic Development and Physicochemical Analysis of Oral Preparations for Unstable Drugs. Thèse de doctorat. Aston University, 2011.
- [13] Prevost Sarah. L'Assurance Qualité en support de la production et mise en application lors de la mise en place d'une nouvelle ligne de production d'ampoules buvables. Thèse de doctorat. Université de POITIERS. 2016.
- [14] Gibson Mark. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. 2ème édition. 2009
- [15] Berkane Zahir. Évaluation d'un programme de réduction des incompatibilités physico-chimiques en réanimation médicale au CHU de Grenoble. Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes. 2016.
- [16] Brossard Denis, Chedru-Legros Valérie, Crauste-Manciet Sylvie, Fleury-Souverain Sandrine, Lagarce Frédéric, Odou Pascal, Roy Sandrine, Sadeghipour Farshid, Sautou Valérie. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations partie 1 : préparations liquides. 1^{ère} édition. 2013.
- [17] Bouacha Mohamed Adnan, Sari Mohammed Nadjib. Analyse des incompatibilités physico-chimiques de la nomenclature des médicaments du service de Chirurgie Générale « A ». Mémoire de fin d'étude, Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen. 2017.
- [18] Makarim Mohammed Khalil. Biological assay of Doxycycline Tetracycline Gentamicin & Erythromycin subjected to accelerated stability studies. Thèse de master. University of Khartoum. 2003.
- [19] Kenneth C. Waterman, Roger C. Adami, Karen M. Alsante, Amy S. Antipas, Dan R. Arenson, Rebecca Carrier, Jinyang Hong, Margaret S. Landis, Franco Lombardo, Jaymin C. Shah, Evgenyi Shalaev, Scott W. Smith, and Hai Wang. Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations. Pharmaceutical Development and Technology. Vol. 7, n° 2. (May 2002). 113–146.
- [20] John W. Hill, Ralph H. Petrucci, Terry W. McCreary, Scott S. Perr. Chimie des solutions. 2^{ème} édition. 2008.
- [21] Mussard Justine. Les parabènes, des conservateurs omniprésents : un risque pour la santé ?. Thèse de doctorat. Université de Nantes. 2006.

- [22] Cohen Yaëlle, Gleitz Chloé. Les conservateurs dans les produits cosmétiques : Cas des parabènes et du phénoxy-éthanol. Et que penser des produits cosmétiques « biologiques » ?. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier. 2009.
- [23] Clémens Stéphane. Les additifs alimentaires : législation et problèmes liés à leur utilisation. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier - Grenoble I. 1995.
- [24] Moudjed Abderrezak, Temmar Oussama, Eddib Mohamed. Les conservateurs en pharmacie. Thèse de doctorat, Université de Blida 1. 2019.
- [25] The United States Pharmacopeia. Microbiological Tests. 41^{ème} révision. 2008.
- [26] Bréchet Caroline. Les conservateurs classés comme excipients à effet notoire : impact en cosmétologie ?. Thèse de doctorat. Université de Nantes. 2010.
- [27] Haman Camille. Les parabènes dans l'eau : introduction dans l'environnement, occurrence et toxicité. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. 2014.
- [28] Handbook of Pharmaceuticals Excipients. Methylparaben, Propylparaben Sodium, 6^{ème} édition. 2009.
- [29] Soni M.G., Carabin I.G., Burdock G.A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food and Chemical Toxicology. Vol. 43 (2005). 985–1015.
- [30] Aalto T.R., Firman M.C., Rigler N.E. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives I. uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. Journal of the american pharmaceutical association. Vol. XLII, n° 8. (August 1953). 449-457.
- [31] Ma Minhui, Lee Tony, Kwong Elizabeth. Interaction of methylparaben preservative with selected sugars and sugar alcohols. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 91, n° 7. (July 2002). 1715–1723.
- [32] Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use. European Medicines Agency. 2015.
- [33] Hensel A., Leisenheimer S., Müller A., Busker E., Wolf Heuss E., Engel J. Transesterification Reactions of Parabens (Alkyl 4-Hydroxybenzoates) with Polyols in Aqueous Solution. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 84, n° 1. (January 1995). 115–118.

- [34] Mizuba S., Sheikh W. Antimicrobial efficacy of potassium salts of four parabens. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol. 1. (March 1987). 363-369.
- [35] Al-Ghamdi Saeed M., Cameron Eugene C., Sutton Roger A. Magnesium Deficiency : Pathophysiologic and Clinical Overview. *American Journal of Kidney Diseases*. Vol. 24, n° 5. (November 1994). 737-752.
- [36] Badran Abdul-Monem, Joly Francisca, Messing Bernard. L'hypomagnésémie : causes, manifestations et traitement. *Nutrition clinique et métabolisme*. Vol. 18, n° 3. (Septembre 2004). 127–130.
- [37] Avensac Magalie. Le magnésium dans la prise en charge du stress à l'officine. Thèse de doctorat. Université Toulouse III. 2018.
- [38] Huynh-Ba Kim. *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development*. 1^{ère} édition. 2009.
- [39] Dan W. Reynolds, Kevin L. Facchine, June F. Mullaney, Karen M. Alsante, Todd D. Hatajik, Michael G. Motto. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. *Pharmaceutical Technology*. Vol. 26, issue 2. (February 2002). 48-56
- [40] Blessy M, Ruchi D. Patel, Prajesh N. Prajapati, Agrawal Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol. 4, Issue 3. (June 2014). 159-165.
- [41] Ahmad Iqbal, Sheraz Muhammad Ali, Ahmed Sofia. *Stability of drugs and drug products*. 1^{ère} édition. 2016.
- [42] Mouradi Wafaa. *Dégradation forcée du DOCETAXEL*. Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V Rabat. 2009.
- [43] El Karbane Miloud. *Etude de comportement de la dégradation forcée de certains médicaments génériques : Optimisation et validation des méthodes chromatographiques indicatrices de stabilité*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V Rabat. 2014.
- [44] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q1A(R2), Q1B, Q2(R1). Current Step 4 version. 1996.
- [45] Ngwa George. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Delivery Technology*. Vol. 10, n° 5. (June 2010).

- [46] Dionisio, D., Santos, L. H. E., Rodrigo, M. A., & Motheo, A. J. Electro-oxidation of methylparaben on DSA®-Cl₂: UV irradiation, mechanistic aspects and energy consumption. *Electrochimica Acta*. Vol. 338. (April 2020).
- [47] Qianhui Mao, Qi Li, Huimin Li, Shoujun Yuan, Jibiao Zhang. Oxidative paraben removal with chlorine dioxide: Reaction kinetics and mechanism. *Separation and Purification Technology*. Vol. 237. (April 2020).
- [48] Andersen, H. R., Lundsbye, M., Wedel, H. V., Eriksson, E., & Ledin, A. Estrogenic personal care products in a greywater reuse system. *Water Science & Technology*. Vol. 56, n° 12. (2007). 45-49.
- [49] Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Negreira, N., & Cela, R. Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 575, issue 1. (August 2006). 106-113.
- [50] González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., & Cela, R. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water Research*, Vol. 45, issue 20. (December 2011). 6770-6780.
- [51] Jibin An, Chunqiu Xia, Jiahong He & Huixia Feng. Oxidation of propyl paraben by ferrate (VI): Kinetics, products, and toxicity assessment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. Vol. 53, issue 10. (April 2018). 873-882.
- [52] Feng X, Chen Y, Fang Y, Wang X, Wang Z, Tao T, Zuo Y. Photodegradation of parabens by Fe (III)-citrate complexes at circumneutral pH: Matrix effect and reaction mechanism. *Science of the Total Environment*. Vol. 472. (February 2014). 130–136.
- [53] Fernandes, E., Martins, R. C., & Gomes, J. Photocatalytic ozonation of parabens mixture using 10% N-TiO₂ and the effect of water matrix. *Science of the Total Environment*. Vol. 718. (May 2020).
- [54] Gomes, J. F., Lopes, A., Gmurek, M., Quinta-Ferreira, R. M., & Martins, R. C. Study of the influence of the matrix characteristics over the photocatalytic ozonation of parabens using Ag-TiO₂. *Science of the Total Environment*. Vol. 646. (January 2019). 1468–1477.
- [55] Kasprzyk-Hordern, B., Ziólek, M., Nawrocki, J. Catalytic ozonation and methods of

Enhancing molecular ozone reactions in water treatment. *Applied Catalysis B: Environmental*. Vol. 46, issue 4. (December2003). 639–669.

[56] Petala, A., Frontistis, Z., Antonopoulou, M., Konstantinou, I., Kondarides, D.I. and Mantzavinos, D. Kinetics of ethylparaben degradation by simulated solar radiation in the presence of N-doped TiO₂ catalysts. *Water Research*. Vol. 81. (September2015). 157–166.

[57] Gomes, J., Leal, I., Bednarczyk, K., Gmurek, M., Stelmachowski, M., Diak, M., Quinta- Ferreira, M.E., Costa, R., Quinta-Ferreira, R.M., Martins, R.C. Photocatalytic ozonation using doped TiO₂ catalysts for the removal of parabens in water. *Science of the Total Environment*. Vol. 609. (December2017). 329–340.

[58] João Gomes, João Lincho, Eva Domingues, Marta Gmurek, Pawel Mazierski, Adriana Zaleska-Medynska, TomaszKlimczuk, Rosa M. Quinta-Ferreira, Rui C. Martins. TiO₂ nanotube arrays-based reactor for photocatalytic oxidation of parabens mixtures in ultrapure water: Effects of photocatalyst properties, operational parameters and light source. *Science of the Total Environment*. Vol. 689. (November2019). 79–89.

[59] Gomes, J., Quinta-Ferreira, M.E., Costa, R., Quinta-Ferreira, R.M., Martins, R.C. Parabens degradation using catalytic ozonation over volcanic rocks. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 25. (March 2018). 7346–7357.

[60] Gmurek, M., Rossi, A.F., Martins, R.C., Quinta-Ferreira, R.M., Ledakowicz, S. Photodegradation of single and mixture of parabens–kinetic, by-products identification and cost-efficiency analysis. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 276. (September2015). 303–314.

[61] Tay, K. S., Rahman, N. A., & Abas, M. R. B. Ozonation of parabens in aqueous solution: Kinetics and mechanism of degradation. *Chemosphere*. Vol. 81, issue 11. (December2010). 1446-1453.

[62] Tay, K. S., Rahman, N. A., & Radzi Bin Abas, M. Kinetic studies of the degradation of parabens in aqueous solution by ozone oxidation. *Environmental Chemistry Letter*. Vol. 8, issue 4. (December2010). 331–337.

[63] Asgari, E., Esrafil, A., Rostami, R., & Farzadkia, M. O₃, O₃/UV and O₃/UV/ZnO for abatement of parabens in aqueous solutions: Effect of operational parameters and

mineralization/biodegradability improvement. *Process Safety and Environmental Protection*. Vol. 125. May 2019). 238–250.

[64] Álvarez, M. A., Ruidíaz-Martínez, M., Cruz-Quesada, G., Victoria López-Ramón, M., Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., & Mota, A. J. Removal of parabens from water by UV-driven advanced oxidation processes. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 379. (January 2020).

[65] Rafael N. Bento, Miguel A. Rendas, Valdir A.R. Semedo, Carlos E.S. Bernardes, M. Soledade C.S. Santos, Hermínio P. Diogo b, Fernando Antunes, Manuel E. Minas da Piedade. The standard molar enthalpy of the base catalysed hydrolysis of methylparaben revisited. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. Vol. 103. (December 2016). 176–180.

[66] Rafael N. Bento, Miguel A. Rendas, Carlos E.S. Bernardes, M. Soledade C.S. Santos, Fernando Antunes, Manuel E. Minas da Piedade. Kinetics of the base catalysed hydrolysis of methylparaben revisited: Implications for determination of the effective volume of flow-microcalorimeters used to study cell cultures. *Thermochimica Acta*. Vol. 659. (January 2018). 82–88.

[67] O'Neill, M., Beezer, A. E., Labetoulle, C., Nicolaidis, L., Mitchell, J. C., Orchard, J. A., Connor, J. A., Kemp, R. B., & Olomolaiye, D. The base catalysed hydrolysis of methylparaben: a test reaction for flow microcalorimeters used for determination of both kinetic and thermodynamic parameters. *Thermochimica Acta*. Vol. 399, issues 1-2. (March 2003). 63–71.

[68] R. Shija, V. Bruce Sunderland, C. McDonald. Alkaline hydrolysis of methyl, ethyl and n-propyl 4-hydroxybenzoate esters in the liquid and frozen states. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 80, issues 1-3. (February 1992). 203-211.

[69] Hensel, A., Leisenheimer, S., Müller, A., Busker, E., Wolf-Heuss, E., & Engel, J. Transesterification Reactions of Parabens (Alkyl 4-Hydroxybenzoates) with Polyols in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 84, issue 1. (January 1995). 115-118.

[70] Valkova N., Lépine F., Valeanu L., Dupont M., Labrie L., Bisailon J B., Beaudet R., Shareck F., Villemur R. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, n° 6. (June 2001). 2404–2409.

- [71] Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Fife-Asbury, M. A., & Brenner, D. J. DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 22, n°2. (1976). 121–137.
- [72] Harwood, C. S., and Parales R. E. The b-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Reviews of Microbiology*. Vol. 50. (1996). 553–590.
- [73] Parke, D. Super aoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177, n° 13. (July 1995). 3808–3817.
- [74] Hsu, T., Daniel, S. L., Lux, M. F., & Drake, H. L. Biotransformations of carboxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: generation of growth-supportive CO₂equivalentsunder CO₂-limited conditions. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172, n°1. (January 1990). 212–217.
- [75] Zhang X, Mandelco L, Wiegel J. *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an aminoacid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic fresh water pond sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 44, issue 2. (April 1994). 214–222.
- [76] Zedan, H. H., and Serry F. M. Metabolism of esters of p-hydroxybenzoic acid by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Egyptian Journal of Microbiology*. Vol. 19, n° 1. (1984). 41–54.
- [77] Sokolski W., Chidester T. C. G., and Honeywell G. E. The hydrolysis of methylp-hydroxybenzoate by *Cladosporiumresinae*. *Developments in Industrial Microbiology*. Vol. 3. (1962). 179–187.
- [78] Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., & Bansal, A. K. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 75, issue 2. (June 2010). 206-212.
- [79] Fan, C., & Wang, H.-C. Degradation of Methyl Paraben by the Aerated Pebble-bed Biofilm System. *APCBEE Procedia*. Vol. 1. (2012). 299–303.
- [80] Wang, W., Kannan, K. Fate of parabens and their metabolites in two wastewater treatment plants in New York State, United States. *Environmental Science & Technology*. Vol. 50, n° 3. (January 2016). 1174–1181.

- [81] Moos, R.K., Angerer, J., Dierkes, G., Brüning, T., Koch, H.M. Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Archives of Toxicology*. Vol. 90, n° 11. (November 2016). 2699–2709.
- [82] Wang L, Liu T, Sun H, Zhou Q. Transesterification of para-hydroxybenzoic acid esters (parabens) in the activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 354. (July 2018). 145-152.
- [83] Haihong Song, Yuval Alfiya, Yael Dubowski, Eran Friedler. Sorption and biodegradation of propylparaben in greywater by aerobic attached-growth biomass. *Science of the Total Environment*, Vol. 598. (November 2017). 925–930.
- [84] Jing Lu, Haipu Li, Yi Tu, Zhaoguang Yang. Biodegradation of four selected parabens with aerobic activated sludge and their transesterification product. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 156. (July 2018). 48–55.
- [85] Carlo Adamo, Jean Philippe Antignac, Jacques Auger, Patrick Balaguer, Déborah Bourc'his, Louis Bujan, Cécile Chevrier, Corinne Cotinot, Jean-Pierre Cravedi, Vincent Laudet, Gabriel Livera et Rémy Slama. *Reproduction et environnement. Rapport de recherche*. Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). 2011.
- [86] Aubert, N., Ameller, T., & Legrand, J.-J. Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 50, issues 3–4. (March-April 2012). 445-454.
- [87] Harville, H.M., Voorman, R., Prusakiewicz, J.J. Comparison of Paraben Stability in Human and Rat Skin. *Drug Metabolism Letters*. Vol. 1, issue 1. (January 2007). 17–21.
- [88] Select Committee on GRAS Substances (SCOGS). *GRAS (Generally Recognized As Safe) Food ingredients - methyl and propyl paraben*. 1972.
- [89] Tasukamoto, H., Terada, S. Metabolism of drugs. XXIII Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 8, issue 12. (December 1960). 1066–1070.
- [90] Tasukamoto, H., Terada, S. Metabolism of drugs. XXVI. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit. (2). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 10, issue 2. (February 1962). 86–90.

- [91] Tasukamoto, H., Terada, S. Metabolism of drugs. XLVII. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit. (4). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 12, issue 7. (July 1964). 765–769.
- [92] Derache, R., Gourdon, J. Métabolisme d'un Conservateur Alimentaire : L'Acide Parahydroxybenzoïque et ses Esters. *Food and Cosmetics Toxicology*. Vol. 1. (1963). 189–195.
- [93] Phillips, J.C., Topp, C.S., Gangolli, S.D. The metabolism of ethyl and n-propyl-p-hydroxybenzoate (“parabens”) in male cats. *Toxicology Letters*. Vol. 2, issue 4. (October 1978). 237–242.
- [94] Bando, H., Mohri, Y., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 86, issue 6. (June 1997). 759–761.
- [95] Breda Antoine. Contribution à l'étude des dérivés de l'acide pyroglutamique : (acide pyrrolidinone - 2 carboxylique - 5). Thèse de doctorat. Université de Lille. 1967.
- [96] Free De Schouwer, Laurens Claes, Nathalie Claes, Sara Bals, Jan Degrève and Dirk E. De Vos. Pd-catalyzed decarboxylation of glutamic acid and pyroglutamic acid to bio-based 2-pyrrolidone. *Green Chemistry*. Vol. 17, issue 4. (February 2015). 2263–2270.
- [97] Miloud EL Karbane, Aziz Elalami, Houda Bouchafra, Houda Bourichi, Yahia Cherrah, Mohamed Azougagh, Abdelaziz Bouklouze. Stability study of parabens in pharmaceutical formulations containing Paracetamol or Carbocisteine by high-performance liquid chromatography. *Moroccan journal of chemistry*. Vol. 3, n° 3. (2015). 659-668.
- [98] Aeshna Amin, Sateesh Chauhan, Manish Dare, Arvind Kumar Bansal. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 75. (2010). 206–212.
- [99] Waterman, K. C., & Adami, R. C. Accelerated aging : Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 293, issues 1-2. (April 2005). 101–125.

[100] MacFaul, P. A., Wayner, D. D. M., & Ingold, K. U. A radical account of « oxygenated Fenton chemistry ». *Accounts of Chemical Research*. Vol. 31, n° 4. (April 1998). 159–162.

APPENDICE A

GLOSSAIRE

Agent chélatant : C'est une substance chimique qui a la propriété de fixer durablement des ions positifs pour former un complexe soluble.

Biofilm : un ensemble de microcolonies bactériennes engluées dans leurs propres exopolymères et adhérant à une surface inerte ou vivante.

Biomasse bactérienne : La biomasse microbienne représente la quantité de "carbone vivant" contenue dans les microbes du sol, essentiellement bactéries et champignons. Elle constitue un indicateur précoce de la dynamique de la matière organique qui réagit vite aux modifications favorables ou défavorables du milieu.

Biotransformation : Ensemble des modifications subies par une substance introduite dans l'organisme.

Cellules HEK-293 : Les cellules embryonnaires humaines du rein 293 sont l'une des lignées cellulaires les plus courantes utilisées pour des recherches. Leur popularité est due à plusieurs propriétés telles que la maintenance, la robustesse, et la facilité de la transfection.

Challenge test : C'est un protocole microbiologique dont l'objectif est de déterminer si une préparation est susceptible de permettre ou non le développement d'une bactérie pathogène ou potentiellement pathogène, telle que *Listeria monocytogenes*, *Bacillus Cereus* ou *Staphylococcus aureus*. Il s'applique aussi à d'autres micro-organismes responsables d'altération : bactéries végétatives, bactéries sporulées ou levures.

Coefficient de réponse : c'est le rapport de la surface S du pic du standard interne sur celle du pic du composé analysé, à concentration égale. Cette injection est importante, car le détecteur n'a pas la même sensibilité pour tous les composés détectés.

Contacteur biologique : C'est un procédé biologique de traitement des eaux usées. Il consiste à permettre aux eaux usées à entrer en contact avec un milieu biologique afin d'éliminer les polluants avant de les rejeter dans l'environnement.

Dégradation : Résultat de réactions chimiques continues, irréversibles, aboutissant à la production d'entités chimiques distinctes, inactives et/ou potentiellement toxiques. Les composants d'un médicament sont dits compatibles lorsqu'ils n'entraînent pas une

dégradation de la substance active de plus de 10% en termes de teneur, ni une précipitation ou tout autre changement de l'aspect de la solution, de son pH ou de son potentiel d'oxydoréduction.

Désestérification : La désestérification est l'hydrolyse d'un ester, c'est la réaction inverse de l'estérification (formation d'un ester à partir d'un acide carboxylique RCOOH et d'un alcool R'OH). Ces réactions se déroulent en présence d'un catalyseur acide, comme l'acide sulfurique H₂SO₄.

Détecteur à la barrette de photodiode : Contrairement à un détecteur classique dont le récepteur n'est capable d'analyser qu'une seule longueur d'onde en même temps, le détecteur UV à barrette de diodes, composée d'une multitude de diodes miniatures sensibles à la lumière, est capable d'analyser simultanément une large gamme de longueurs d'onde allant souvent de 190 à 400 nm.

Energie d'activation (E_a) : Énergie cinétique totale minimale que doivent fournir les collisions intermoléculaires pour qu'une réaction chimique ait lieu.

Epimérisation : C'est une réaction qui permet l'inversion de configuration d'un seul stéréocentre parmi ceux présents dans un composé chiral.

Epoxydation : Les oxiranes (ou époxydes) sont des éthers cycliques de trois atomes dont l'un d'eux est un oxygène. Leur formation peut se faire par la réaction d'oxydation d'un alcène avec un peracide, c'est-à-dire par une réaction d'époxydation.

In situ : C'est une locution latine qui signifie sur place. Elle est utilisée en général pour désigner une opération ou un phénomène observé sur place, à l'endroit où il se déroule sans le prélever, ni le déplacer.

Incompatibilité : Désigne un phénomène prévisible, se traduisant de manière visuelle ou physique par l'apparition d'un précipité, d'un phénomène d'effervescence, d'un changement de coloration, d'une turbidité ou même de deux phases non miscibles. L'examen visuel permet d'écarter une préparation suspecte.

Instabilité : Concerne des réactions chimiques retardables mais irréversibles (hydrolyse, oxydation, etc.) aboutissant à l'apparition de produits de dégradation inactifs ou toxiques. Ces réactions ne sont pas nécessairement visibles à l'œil nu, ainsi une solution d'apparence limpide n'exclut pas la présence de ces phénomènes.

Isomérisation : Deux molécules possédant la même formule moléculaire mais dont l'arrangement entre les atomes est différent sont des isomères. Le nombre d'isomères possibles associés à une formule moléculaire croît exponentiellement en fonction du nombre de carbones.

Isotonie : Equilibre entre deux solutions séparées par une membrane, ayant la même pression osmotique (qui est liée à la concentration de la solution en molécules).

Métabolisation : Transformation biochimique dans le cadre du métabolisme, c'est-à-dire processus de dégradation et de synthèse organique chez l'être vivant.

Néphélométrie : Mesure de la concentration d'un élément en suspension dans une solution par comparaison de l'opacité de celle-ci avec celle d'une suspension témoin (étalon) de concentration connue.

Orbitales LUMO-HOMO : HOMO et LUMO sont deux orbitales moléculaires, appelées orbitales frontières et qui jouent un rôle particulier :

- HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) Traduit le caractère électrodonneur (nucléophile) de la molécule. Plus l'énergie de cette OM est élevée, plus la molécule cédera facilement des électrons.

- LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) Traduit le caractère électro-accepteur (électrophile) de la molécule. Plus l'énergie de cette OM est faible, plus la molécule acceptera facilement des électrons.

Polymérisation : La polymérisation est le processus chimique permettant de synthétiser un polymère à partir des monomères. Il existe quatre types de polymérisation, soit la polymérisation radicalaire, la polymérisation anionique, la polymérisation cationique et la polymérisation par catalyse métallique (ou organométallique).

Potentiel d'oxydoréduction : C'est une grandeur thermodynamique qui mesure le pouvoir oxydant ou réducteur d'un système redox.

Racémisation : Transformation d'un énantiomère pur en mélange racémique (mélange des deux énantiomères en quantités égales) d'un composé chiral.

Réaction acide-base : Toute réaction dans laquelle un composé A ayant une orbitale vacante, mis en présence d'un composé B possédant un doublet d'électrons libres (alcools, éthers, amines, thiols, thioéthers...), avec création d'une liaison A-B.

Réactivité chimique : Dans la chimie, la réactivité est l'impulsion pour laquelle une substance chimique subit une réaction chimique, soit par elle - même ou avec d'autres matériaux, avec une libération globale de l'énergie.

Réarrangement : Un réarrangement (ou déplacement) est une réaction par laquelle un atome ou un groupe Z se déplace d'un atome A vers un autre atome B d'une même molécule (Z-A-B devient A-B-Z) ce qui correspond a priori et dans la plupart des cas à un mécanisme intramoléculaire.

Rendement quantique : Rapport entre le nombre effectif de photons émis, absorbés ou utilisés au cours d'un processus photophysique ou photochimique et le nombre théorique associé à ce processus.

Stabilité : Une molécule est considérée stable en solution tant qu'elle conserve 90% de sa concentration initiale (Normes USP). Son dosage s'effectue de préférence par HPLC ou par toute autre méthode spécifique permettant de différencier la molécule active de ses produits de dégradation (méthode indicatrice de stabilité). Enfin, les propriétés organoleptiques de la solution doivent être conservées (pas d'apparition ou de modification de la coloration, de l'odeur, etc.).

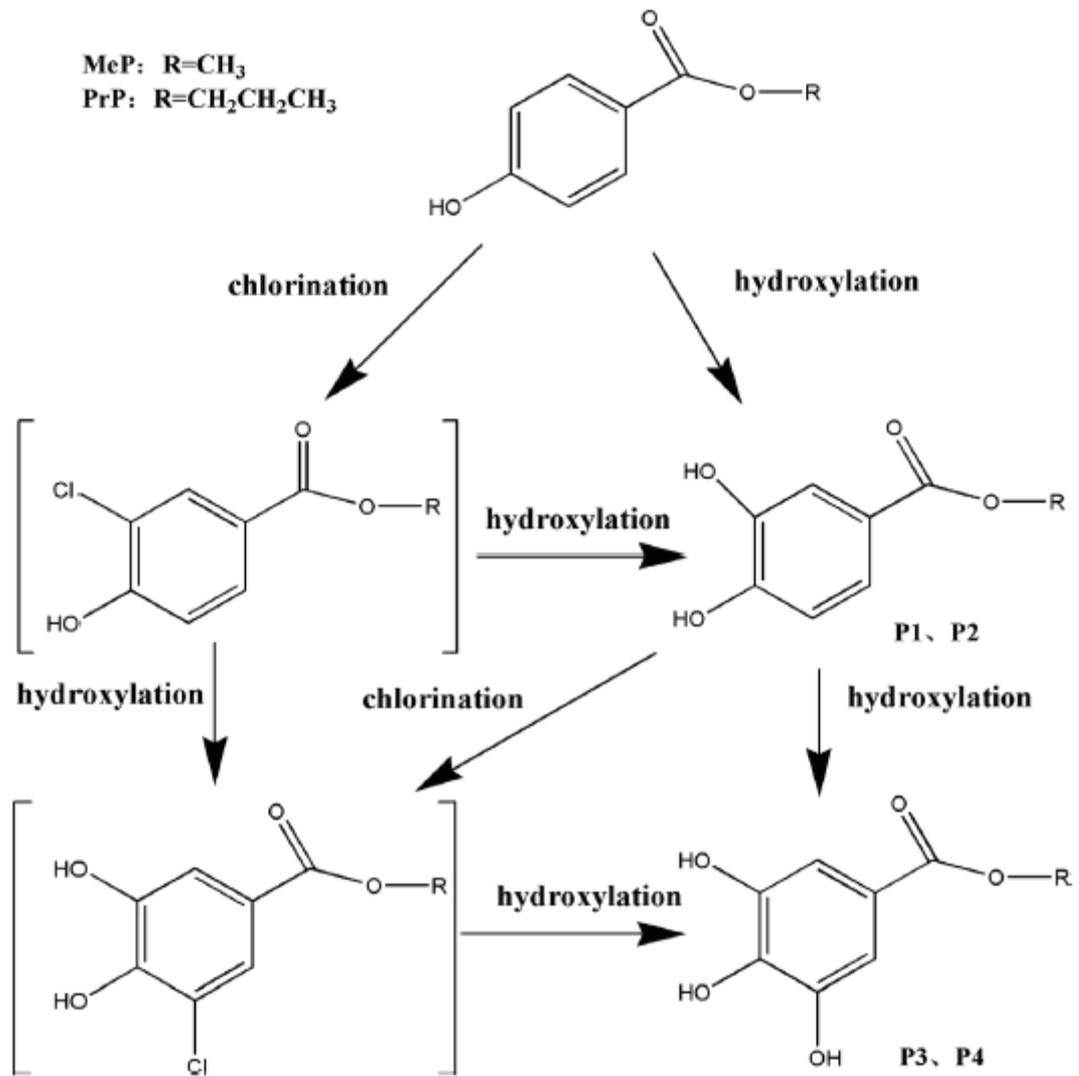
Suspension extemporanée : Se dit d'un médicament qui doit être préparé juste avant son emploi.

Transestérification : Il s'agit de la réaction d'un ester sur un alcool pour donner un autre ester. C'est une réaction réversible, catalysée par un acide ou une base. Pour rendre la réaction complète, on met un gros excès de l'alcool qui sert souvent de solvant.

Voie β -cétoadipate : C'est l'une des voies par lesquelles un micro-organisme peut attaquer le noyau à six atomes de carbone d'un composé aromatique et le convertir en acide aliphatique.

APPENDICE B

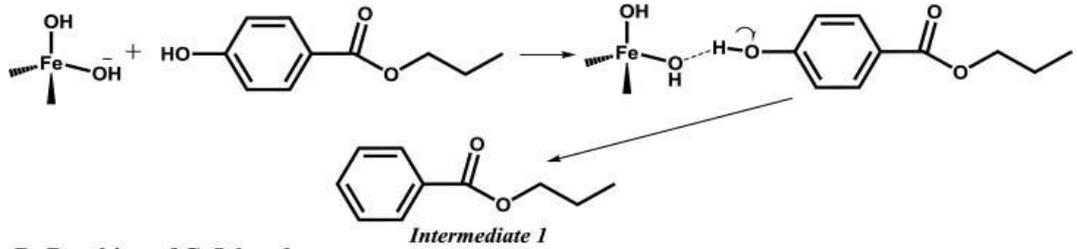
Schéma réactionnel proposé pour la dégradation des parabènes par le ClO_2 [47]



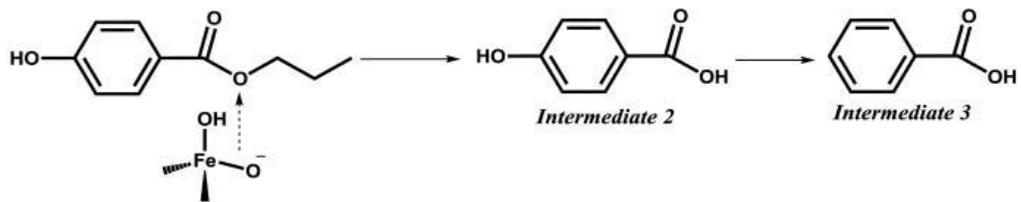
APPENDICE C

Schéma réactionnel proposé pour l'oxydation du propylparabène par le Fe (VI) [51]

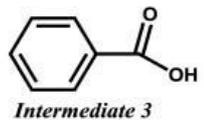
A: Phenoxy radical reaction



B: Breaking of C-O bond

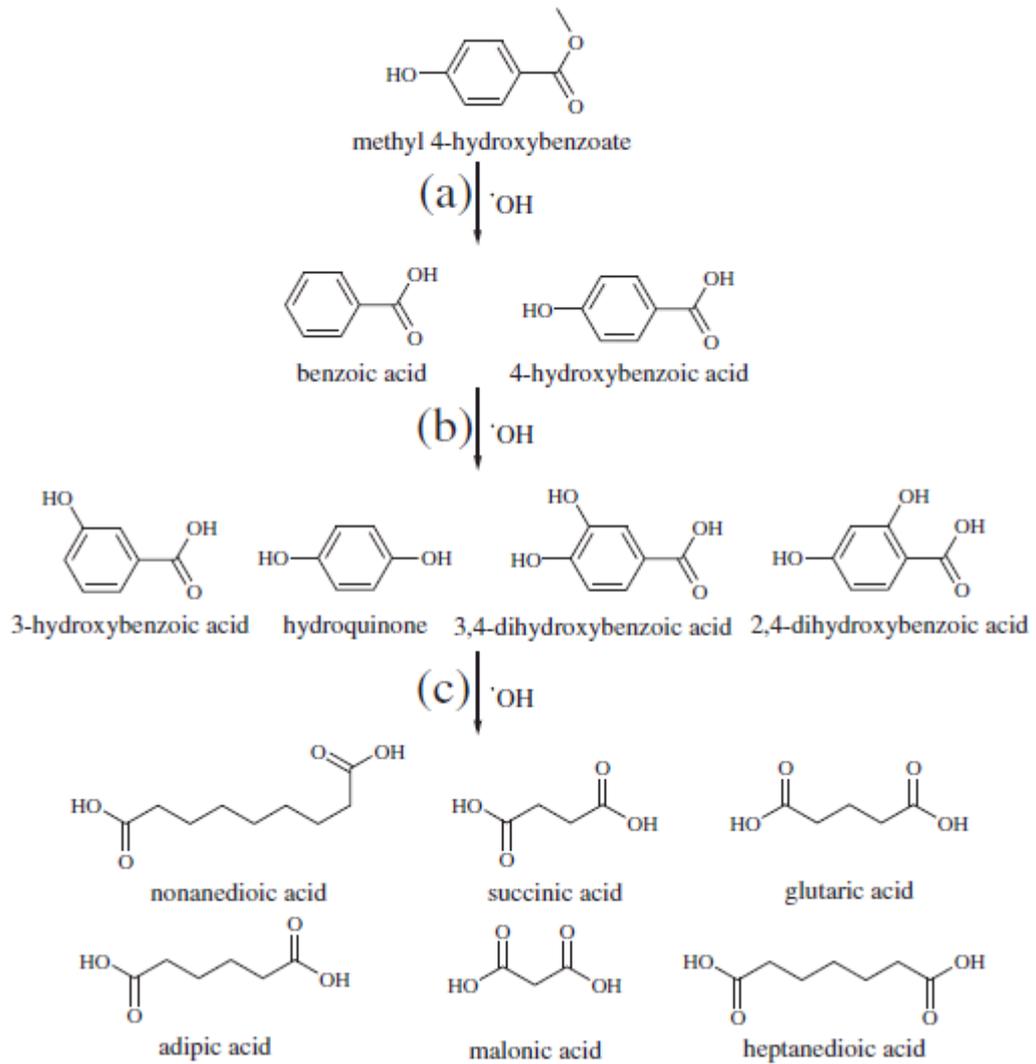


C: Intermediates further degradation by ferrate



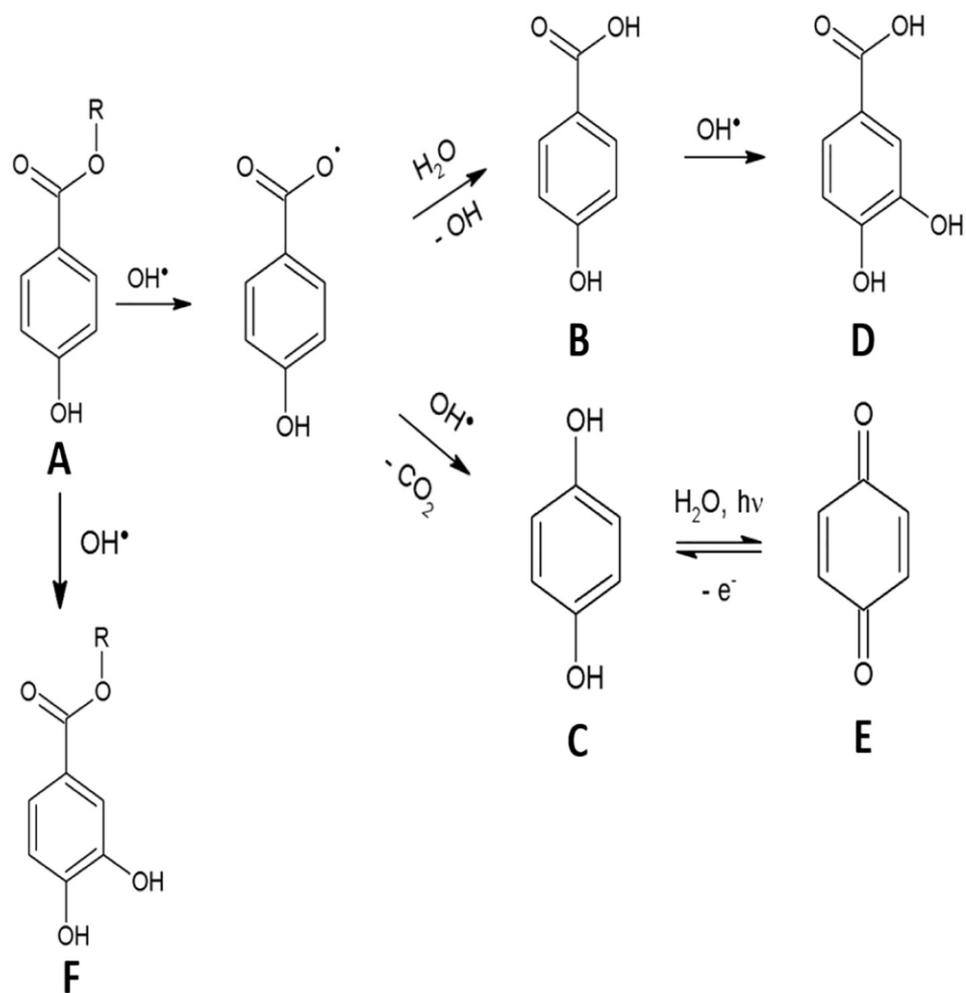
APPENDICE D

Schéma réactionnel proposé pour la photodégradation du méthylparabène par le complexe Fe (III)-citrate [52]



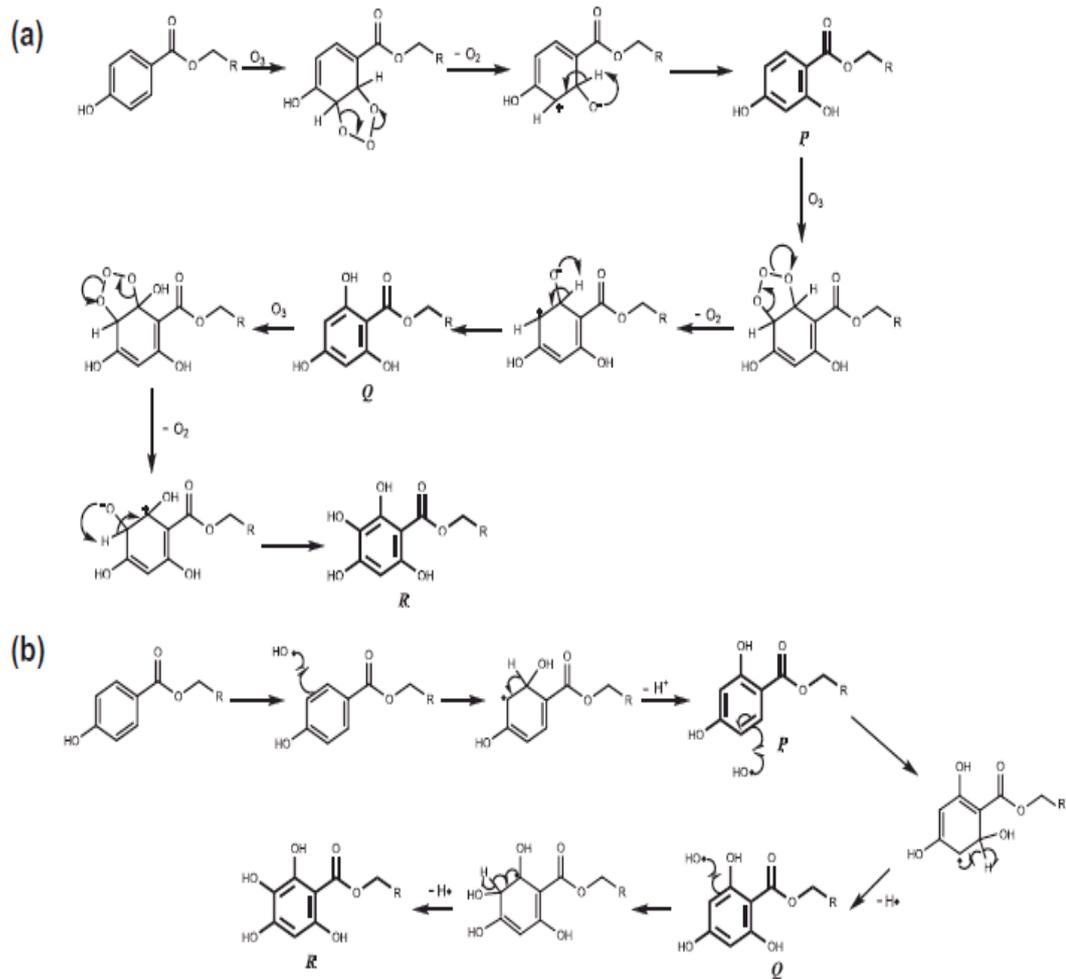
APPENDICE E

Schéma réactionnel proposé pour l'oxydation photocatalytique des parabènes [56]



APPENDICE F

Schéma d'hydroxylation du cycle aromatique par l'ozone et le radical hydroxyle [61]

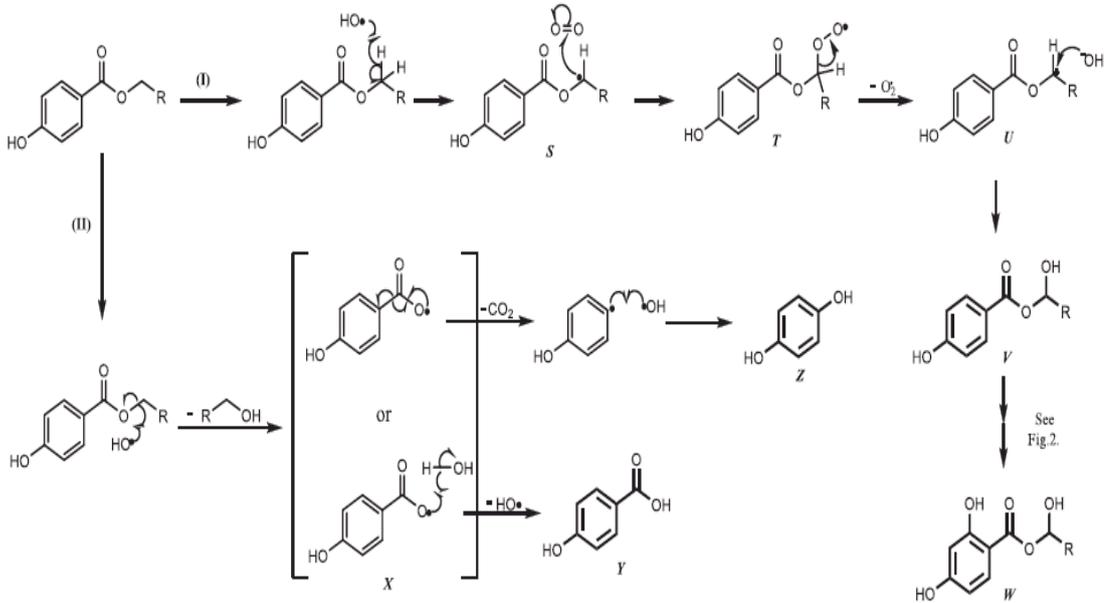


(a) : Hydroxylation du cycle aromatique par l'ozone.

(b) : Hydroxylation du cycle aromatique par le radical hydroxyle.

APPENDICE G

Schéma réactionnel de l'action du radical hydroxyle sur la chaîne ester et formation [61]



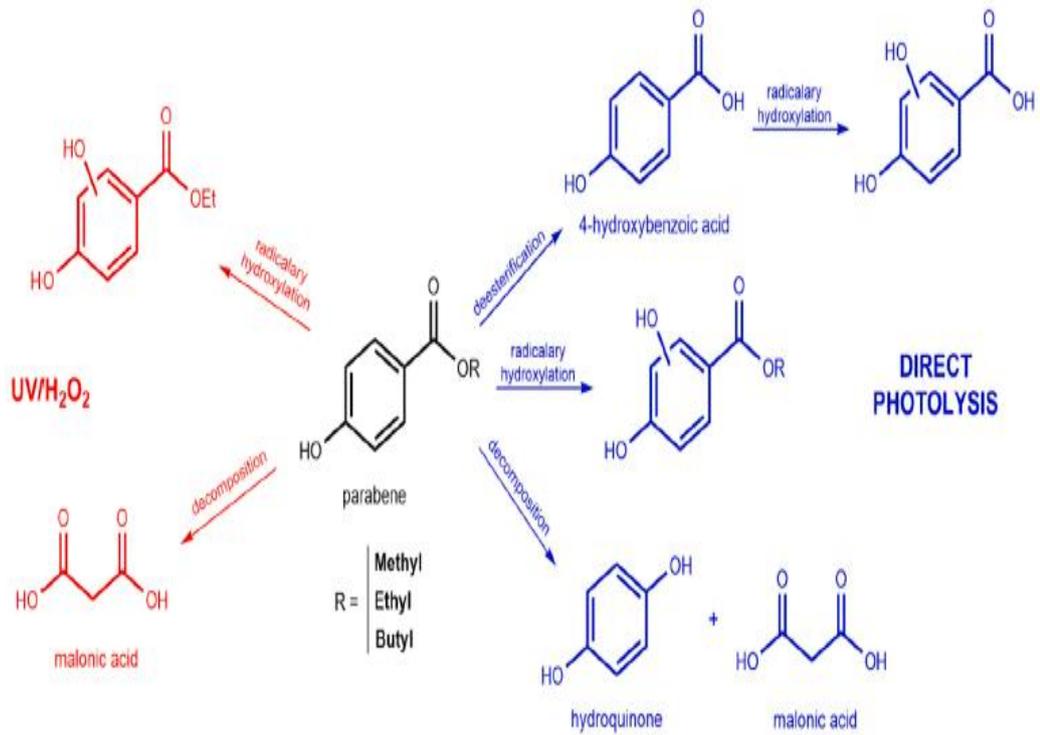
(I) : Réaction du radical hydroxyle sur la chaîne ester.

(II) : Réaction de formation de produits de dégradation (Y : acide p-hydroxybenzoïque, Z : hydroquinone).

APPENDICE H

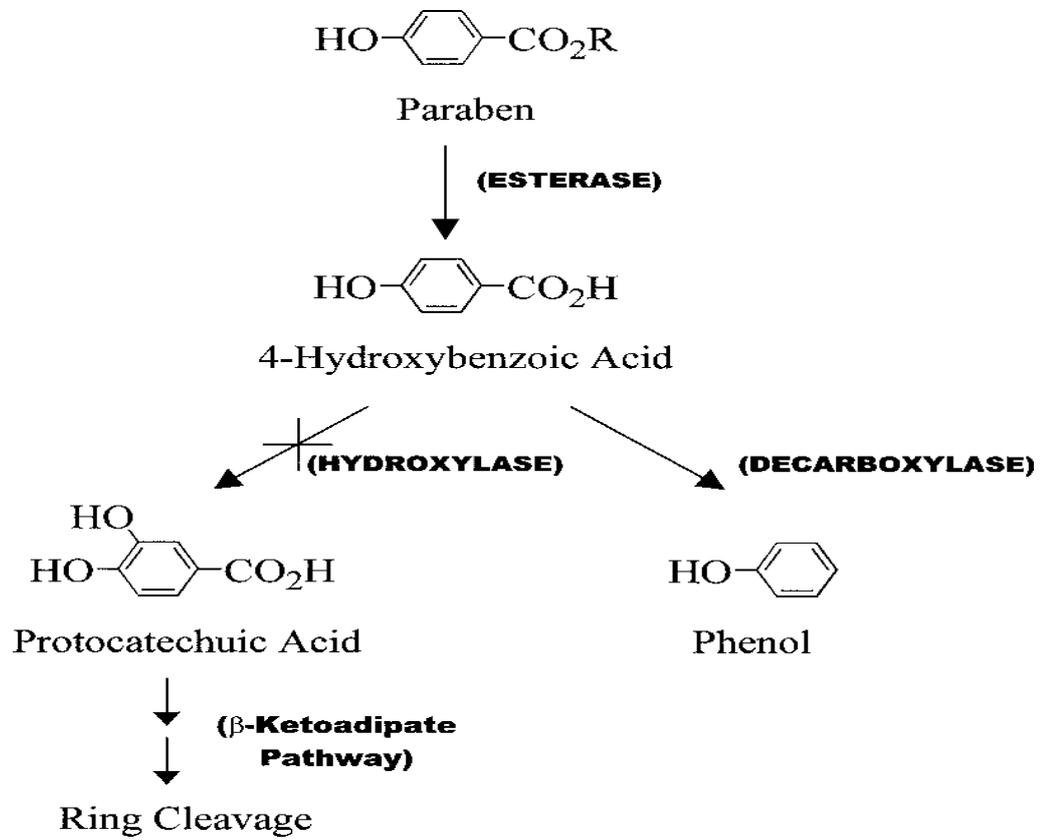
Schéma réactionnel de la dégradation des parabènes selon différents systèmes d'oxydation

[64]



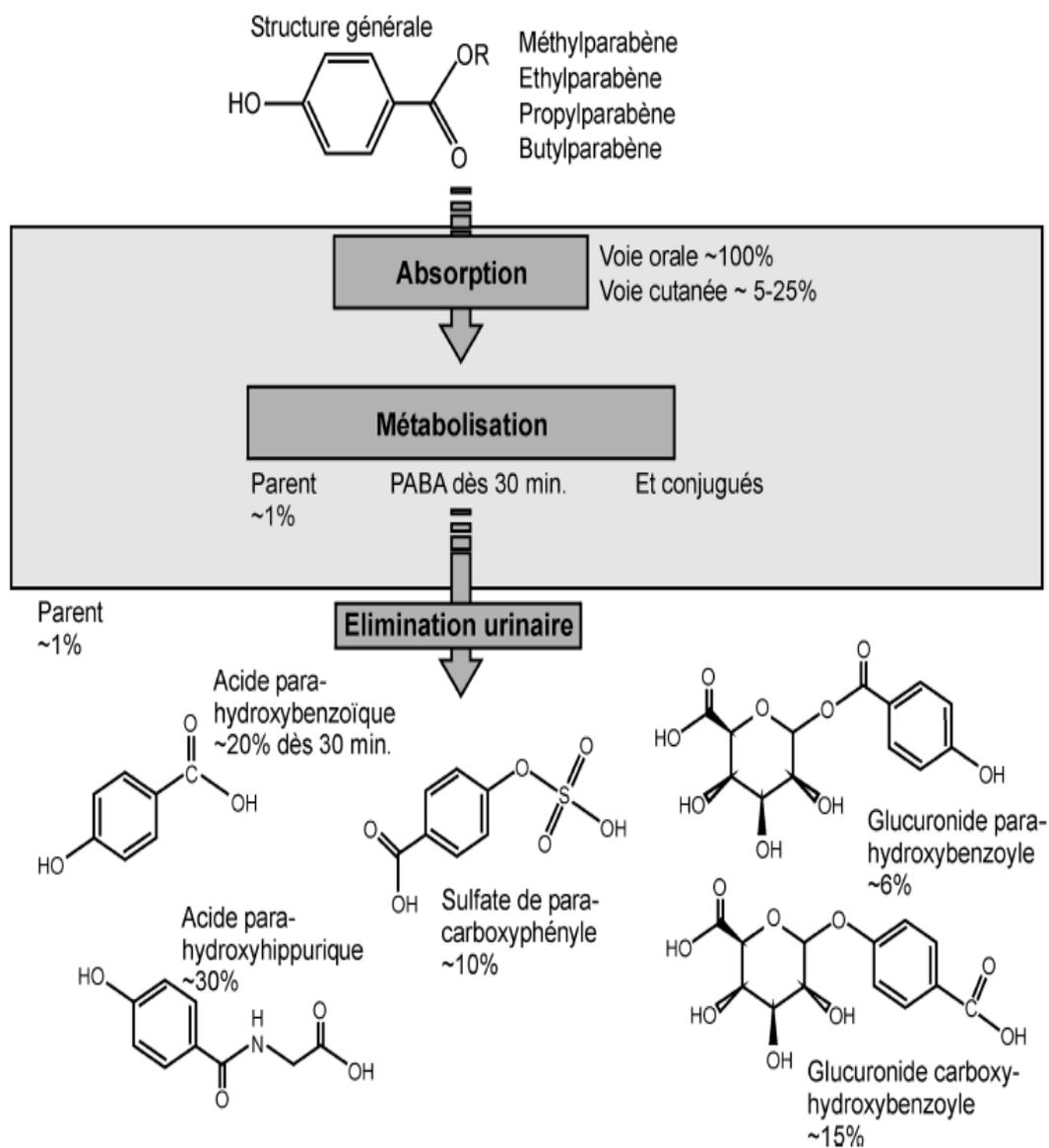
APPENDICE I

Schéma réactionnel proposé pour la dégradation des parabènes [70]



APPENDICE J

Schéma de toxicocinétique des parabènes, établi d'après des tests sur des animaux [85]



APPENDICE L

Voies de réaction possibles vers les produits secondaires observés dans la décarboxylation de l'acide pyroglutamique ; les réactions catalysées à l'acide ou à la base sont marquées à l'aide de parenthèses ; LA : acide de Lewis [96]

