

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

**Modification chimique du chitosane extrait des  
plumes de calamar et application dans la  
formulation de nanogels**

Présenté par :

KHALED Ismahane

Encadré par :

Promotrice : Pr. HADJ-ZIANE Amel

Co-Promotrice : Pr. LARIBI Hassiba

Année universitaire 2022/2023

## **AVANTS PROPOS**

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude et ma reconnaissance à tous ceux qui ont été présents et m'ont soutenu lors de ma soutenance, un moment rempli d'émotions et d'accomplissement.

Mes plus profonds remerciements à madame **HADJ-ZIANE, A** pour sa patience, la confiance qu'elle m'a fait et celle qu'elle m'a inspirée dans l'accomplissement de mon travail, ainsi que le temps qu'elle m'a consacré, les conseils qu'elle m'a prodigués et ses orientations judicieuses pour me promouvoir dans ma thèse !! toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Ma plus haute considération à madame **LARIBI, H** dont l'apport a été déterminant pour l'avancement dans ce travail, et, pour cet esprit d'équipe qui a caractérisé tout le cheminement de cette thèse dans ses moindres recherches. Madame a été exemplaire dans le sens des responsabilités et cette volonté qu'elle m'avait inculquée, Merci madame pour votre indéfectible soutien.

Mes plus vifs remerciements à **Benkacimi Manel**, doctorante, futur espoir de la chimie pharmaceutique, qui, de par ses précieux conseils, avait contribué objectivement à l'élaboration de ce modeste travail, Pour son sérieux et son abnégation.

Aux membres du jury, je vous remercie pour votre présence bienveillante et vos précieux commentaires.

À mes chers collègues et amis, **Safia, Nourelhouda, Salsabila, Amina et Farah**, votre soutien indéfectible a été une véritable source d'inspiration. Vos encouragements sincères et votre présence chaleureuse ont allégé le fardeau des défis et ont rendu ce voyage encore plus spécial.

À ma famille bien-aimée, mes chers frères, je vous suis profondément reconnaissant pour votre amour inconditionnel et votre soutien constant. Votre présence a été ma force et mon refuge dans les moments de doute et de fatigue.

Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à ma réussite, que ce soit par des mots d'encouragement, des pensées positives ou des gestes attentionnés. Votre présence a fait toute la différence.

# **Sommaire**

AVANT-PROPOS

SOMMAIRE

RESUME

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

INTRODUCTION GENERALE

Chapitre I : Chitine et chitosane

I.1 Historique

I.2 La chitine

I.3 Le chitosane

I.4 Méthodes d'extraction

I.5 Propriétés du chitosane

I.6 Modification structurelle du chitosane

Chapitre II : Les nano-systèmes

II.1 Historique

II.2 Intérêt de la nanotechnologie

II.3 Les différentes nanotechnologies

II.4 Les nano-systèmes à base de chitosane

II.5 Les voies d'administration des médicaments

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1 Matériels

III.2 Méthodes

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1 Rendement de l'extraction

IV.2 Identification de la chitine et du chitosane

IV.3 Détermination du degré de désacétylation

IV.4 Etude de la solubilité

IV.5 Mesure du potentiel zêta

IV.6 Degré d'oxydation DCA

IV.7 Analyse spectroscopique par FTIR

IV.8 Activité antioxydante

IV.9 Activité antibactérienne

IV.10 Etude macroscopique (paramètres organoleptiques)

IV.11 Mesure du pH

IV.12 Etude de la capacité d'étalement

IV.13 Taille des particules

IV.14 potentiels zêta des nanogels

IV.15 Test d'adhérence

IV.16 Taux d'encapsulation

IV.17 Etude rhéologique des formulations

Conclusion générale

Références bibliographiques

## الملخص

في المجال الصيدلاني المتنامي باستمرار، يتم تطوير أشكال جديدة مبتكرة وفعالة وسريعة وسهلة الاستخدام بشكل مستمر. هدف هذه الدراسة هو استخلاص مادة خام مطلوبة جدًا في صناعة الأدوية والتي كانت حتى الآن مستوردة من الخارج: الكايتوسان، وهو سكر متعدد طبيعي يعتبر مكلفًا للغاية وقد ثبت أن له العديد من الفوائد العلاجية من ريش الحبار، وهو منتج بحري. ومن أجل منح البوليمر الحيوي المستخلص وظائف جديدة، ثبت أن التأكسد هو بديل مثير للاهتمام، وتم تأكيده من خلال تحليلات طيفية مثل التحويلة الحادة للأشعة تحت الحمراء، والتي أظهرت وجود تم. المجموعة المؤكسدة الجديدة. أيضًا، ساهمت المجموعة المؤكسدة الجديدة في تحسين الذوبانية والنشاط المضاد للبكتيريا تحضير النانوجيلات في ظروف محسنة باستخدام الكايتوسان المستخلص والمؤكسد والتجاري كمكون فعال وكمواد محسنة أيضًا، وأظهرت تصرفًا غير نيوتنيًا في اختبارات الريولوجيا وكانت قوامها مقارنة بالمنتجات التجارية، وأظهرت استقرارًا جيدًا على مر الزمن يمكن تبريره بالقدرة الكهربائية السالبة للجزيئات التي تصل إلى -30 مللي فولت وحجم الجسيمات بين 100 و 500 نانومتر

**كلمات مفتاحية:** استخلاص، كيتين، كيتوسان، أكسدة، ثنائي الدهيدات، نانوجيلات

## Abstract

In the constantly expanding pharmaceutical field, new innovative, effective, rapid and easy-to-use forms are continually being developed. The aim of this study is to extract a raw material that is in great demand in the pharmaceutical industry and that has until now been imported from abroad: chitosan, a natural polysaccharide that is extremely expensive and has proved to have numerous therapeutic virtues.

It was extracted from squid feathers, a marine by-product. In order to give the extracted biopolymer new functionalities, oxidation proved to be an interesting alternative, confirmed by spectroscopic analyses such as FTIR, which highlighted the presence of the new oxidised group. The new oxidised group also improved solubility and antibacterial activity.

The nanogels formulated under optimised conditions using extracted, oxidised and commercial chitosan as the active ingredient and also as an excipient showed non-Newtonian behaviour in rheological tests and their textures were comparable to their commercial counterparts, with good stability over time justified by a Zeta potential in the region of -30 Mv and a particle size of between 100 and 500 nm.

**Keywords :** Extraction, Chitin, Chitosan, Oxidation, Dialdehydes, Nanogels

## **Résumé**

Dans le domaine pharmaceutique en constante évolution, de nouvelles formes innovantes, efficaces, rapides et faciles à utiliser sont continuellement développées. L'objectif de cette étude est d'extraire une matière première très demandée dans l'industrie pharmaceutique et jusqu'à présent importée de l'étranger ; il s'agit du chitosane, un polysaccharide naturel extrêmement onéreux et qui a prouvé de nombreuses vertus thérapeutiques.

L'extraction a été réalisée à partir des plumes de calmars, des sous-produits marins. Afin de conférer au biopolymère extrait de nouvelles fonctionnalités, l'oxydation s'est avérée une alternative intéressante, elle a été confirmée par des analyses spectroscopiques que le FTIR qui ont mis en évidence la présence du nouveau groupement oxydé. Ce dernier a permis aussi d'améliorer la solubilité et l'activité antibactérienne.

Les nanogels formulés dans des conditions optimisées en utilisant le chitosane extrait, oxydé et commercial comme principe actif et aussi excipient ont présentés un comportement Non-Newtonien par des tests rhéologiques et leurs textures ont été comparables à leurs homologues commerciaux avec une bonne stabilité dans le temps justifiée par un potentiel Zêta dans les alentours des -30 Mv et une taille des particules comprise entre 100 et 500nm.

**Mots clés :** Extraction, Chitine, Chitosane, Oxydation, dialdéhydes, Nanogels,

## **Listes des figures**

## **Chapitre I : Chitine et chitosane**

**Figure I.1 :** Chronologie des découvertes des médicaments et l'utilisation du chitosan

**Figure I.2 :** Structure de la chitine

**Figure I.3 :** Schéma simplifié des trois formes cristallines de la chitine

**Figure I.4:** Méthodes d'extraction chimique et biologique

**Figure I.5:** Structure chimique de chitosane

**Figure I.6:** Schéma de l'extraction chimique

**Figure I.7:** Schéma de l'extraction biologique

**Figure I.8:** Schéma d'extraction assistée par enzyme

**Figure I.9:** schéma d'extraction assisté par micro-onde

**Figure I.10 :** Les groupements modifiables

**Figure I.11 :** schéma d'oxydation du chitosane par le périodate

## **Chapitre II : Les nano-systèmes**

**Figure II.1 :** les différentes structure des nanotechnologies les plus communes

**Figure II.2 :** Classification des nanogels

**Figure II.3 :** Libération de médicaments à partir de nanogels

**Figure II.4 :** les différentes structures des nanogels

**Figure II.5 :** Schéma des techniques de préparation des nanogels

**Figure II.6 :** différentes voies d'administration des médicaments

## **Chapitre III : matières et méthodes**

**Figure III.1 :** plumes de calamars

**Figure III.2 :** la poudre de la chitine obtenue (photo original)

**Figure III.3 :** La poudre du chitosane obtenu (Photo original)

**Figure III.4 :** étapes d'extraction du chitosane

**Figure III.5 :** Transformation des groupes fonctionnels de la chitine en chitosane oxydé

**Figure III.6 :** Capacité antioxydante par coloration

**Figure III.7 :** Représentation schématique de cinq mécanismes de base de l'action antibiotique contre les cellules microbiennes.

**Figure III.8 :** Appareil de Diffraction dynamique de la lumière SZ-100 (HORIBA-SCIENTIFIC).

## **Chapitre IV : Résultats et méthodes**

**Figure IV.1:** Spectre infrarouge de la chitine

**Figure IV.2 :** Spectre infrarouge du chitosane

**Figure IV.3 :** Test de solubilité du chitosane extrait

**Figure IV.4 :** Test de solubilité du chitosane modifié

**Figure IV.5 :** Mesure du potentiel zêta du  $\beta$ -Chitosane extrait

**Figure IV.6 :** Comparaison de l'aspect visuel entre le chitosane extrait et le chitosane oxydé.

**Figure IV.7 :** spectre infrarouge du chitosane oxydé

**Figure IV.8 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par le  $\beta$ -Chitosane extrait

**Figure IV.9 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par le  $\beta$ -Chitosane modifié

**Figure IV.10 :** Résultats du pouvoir antibactérien contre les bactéries

**Figure IV.11 :** Résultats du pouvoir antibactérien contre les champignons

**Figure IV.12 :** Aspects des trois nanogels après 24h

**Figure IV.13 :** Aspects des trois nanogels après un mois de stockage

**Figure IV.14 :** Histogramme des diamètres d'étalement des trois nanogels en fonction du poids

**Figure IV.15 :** Les tests d'étalement pour les trois nanogels

**Figure IV.16 :** Variation du potentiel zêta en fonction du temps

**Figure IV.17 :** Courbes d'écoulement des nanogels préparé

**Figure IV.18 :** Variation de module de stockage ( $G'$ ) et ( $G''$ ) en fonction du taux de cisaillement des trois nanogels formulés.

## **Listes des tableaux**

## **Chapitre 1 : chitine et chitosane**

**Tableau I.1** : Exemples de teneur en chitine provenant de différentes sources

**Tableau I.2** : Domaines d'application et utilisations potentielles de la chitine et de ses dérivés.

**Tableau I.3** : les modifications les plus communément appliquées pour le chitosane

## **Chapitre II : les Nano-systèmes**

**Tableau II.1** : les formes galéniques et la formulation utilisée

## **Chapitre III : Matériels et méthodes**

**Tableau III.1** : les différentes matières impliquées dans le processus d'extraction du chitosane et la synthèse du chitosane oxydé ainsi que leur fonction respective.

**Tableau III.2** : les différents produits utilisés.

## **Chapitre IV : Résultats et discussions**

**Tableau IV.1** : diamètre d'inhibition des souches en fonction des antibactériens utilisés

**Tableau IV.2** : taille des particules dans le nanogel de chitosane commercial

**Tableau IV.3** : taille des particules dans le nanogel de chitosane extrait

**Tableau IV.4** : taille des particules dans le nanogel de chitosane oxydé

**Tableau IV.5** : taille des particules dans le nanogel de chitosane commercial

**Tableau IV.6** : taille des particules dans le nanogel de chitosane oxydé

**Tableau IV.7** : taille des particules dans le nanogel de chitosane extrait

**Tableau IV.8** : Résultat du test d'adhérence des nanogels.

**Tableau IV.9** : Résultat du taux d'encapsulation des nanogels.

**Tableau IV.10** : représente la viscosité des différents nanogels.

## **Liste des abréviations**

**UV/vis** : spectrométrie Ultra-violet-visible

**FTIR** : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

**COS** : chitooligosaccharides

**CS** : chitosane

**pH** : Potentiel hydrogène

**pka** : Constante d'équilibre

**DD/DDA** : Degré de désacétylation

**Mw** : Poids Moléculaire

**NP** : Nanoparticules

**DLS** : Diffusion dynamique de la lumière

**DCA** : Chitosane oxydé

**PA** : Principe actif

**KBr** : Bromure de potassium

**LDA** : Capteur de lumière ambiante

**DPPH** : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

**rpm** : Tour par minute

**nm** : Nanomètre

**mV** : millivolt

**AcOH** : Acide acétique

**PI** : indice de polydispersité

# **Symboles**

**$\eta$**  : Viscosité intrinsèque

**$K, a$**  : Paramètres qui dépendent

**$t_0$** : Temps d'écoulement du solvant

**$t$**  : Temps d'écoulement de la solution de chitosane

**$A$**  : Absorbance

**$G'$**  : La variation du module de stockage

**$G''$** : La variation du module de perte

# **Introduction générale**

Le marché mondial des céphalopodes a connu une croissance considérable au cours des dernières décennies [1]. Les fruits de mer sont composés d'un grand volume de déchets tels que les queues, les peaux, les têtes, les écailles et les épines dorsales. Les déchets rejetés dans l'océan par les industries de transformation des produits de la mer, comme les carapaces de crabes, de crevettes, de krills et de homards, ainsi que les plumes des calamars ont considérablement augmenté ces dernières années. Ces déchets de crustacés et céphalopodes contribuent à la pollution de l'environnement, ce qui pose un problème aux industries de transformation et nécessite un traitement efficace [2].

De nombreux produits chimiques et processus biologiques ont été utilisés pour créer des composés utiles tels que la chitine, le chitosane et les chitooligosaccharides (COS), qui ont un large éventail d'utilisations, afin de réutiliser les déchets de crustacés [3].

Le  $\beta$ -chitosane (CS) est un polysaccharide cationique naturel, peu abondant, obtenu dans l'industrie par acétylation de la chitine [4]. Il est largement utilisé dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique, biomédical, agricole, alimentaire et dans l'emballage en raison de ses propriétés inhérentes [5], et est connu pour sa biodégradabilité et sa biocompatibilité, ainsi que pour ses activités antifongiques et antibactériennes [6], son activité antioxydante et son activité antitumorale [2], [7].

Des études ont été réalisées pour obtenir des matériaux entièrement nouveaux ou pour modifier des composants déjà connus afin d'améliorer leurs propriétés, l'intérêt pour les polysaccharides et les matériaux basés sur ces biopolymères s'est considérablement accru, car ils sont susceptibles d'être modifiés chimiquement, ce qui permet d'adapter leur structure et leurs propriétés à la forme requise pour leur utilisation ultérieure [8,9].

Les changements de conformation du squelette du chitosane dépendent des conditions environnementales locales, notamment le pH et le pKa...). Les groupes fonctionnels (hydroxyle et amine) jouent un rôle essentiel dans la solubilité de la molécule de chitosane. [5], [10].

Il a été confirmé que les dérivés du chitosane présentent une activité biologique unique et ont été utilisés comme agents immunostimulants et antimicrobiens, ce qui est extrêmement bénéfique dans le domaine des biomatériaux [11].

L'oxydation du chitosane par le périodate comme réactif a attiré l'attention des chercheurs ces dernières années. Le chitosane oxydé au périodate a été décrit comme un composant permettant d'obtenir des surfaces solides biocompatibles [12],. On peut s'attendre à ce que les matériaux à base de chitosane modifié soient caractérisés par une faible toxicité tout en conservant les propriétés du chitosane telles que l'hydrophilie, qui est essentielle pour les applications biomédicales [8], [13].

De récents développements dans le domaine de la conception pharmaceutique ont permis de créer des systèmes nanostructurés qui combinent les avantages des nanoparticules avec ceux des matrices polymériques d'origine, afin d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques, mécaniques et pharmacologiques. Ainsi que de contrôler leur libération. De plus, ces systèmes offrent une protection accrue contre la dégradation, améliorent la pénétration des médicaments à travers les barrières biologiques et favorisent une distribution ciblée dans l'organisme [14].

Dans ce contexte précis, et afin de répondre à des exigences socio-économiques pour réduire l'importation des matières premières, nous avons valorisé les plumes de calamar par extraction du chitosane, qui une fois oxydé sera utilisé comme principe actif dans la formulation de nanogels pour application transdermique

Pour se faire, le mémoire a été structuré comme suit :

- Une partie théorique avec deux chapitres, le premier sur l'extraction du chitosane, et le deuxième entame des généralités sur les nanogels et les différentes voies d'administration.
- Une partie pratique qui est divisée en deux parties, la première définit les différents protocoles de formulation des trois nanogels et leurs méthodes de caractérisations ; la deuxième présente les différents résultats obtenus et leurs interprétations.

Enfin, on termine ce travail par une conclusion générale qui mettra l'accent sur les principaux résultats obtenus avec des recommandations et perspectives pour la continuité dans cet axe de recherche très passionnant.

# Chapitre I

## I. Introduction

Les polysaccharides sont des polymères naturels composés de sucres simples liés chimiquement, et sont largement répandus dans la nature. Ils jouent des rôles essentiels dans la structure et la fonction des organismes vivants, ainsi que dans de nombreuses applications industrielles, notamment en matière d'administration de médicaments [1].

Parmi les nombreux polysaccharides, le chitosane est un biopolymère d'intérêt particulier en raison de ses propriétés uniques et de sa polyvalence dans divers domaines de recherche et d'application. Le chitosane est dérivé de la chitine, qui est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose [2].

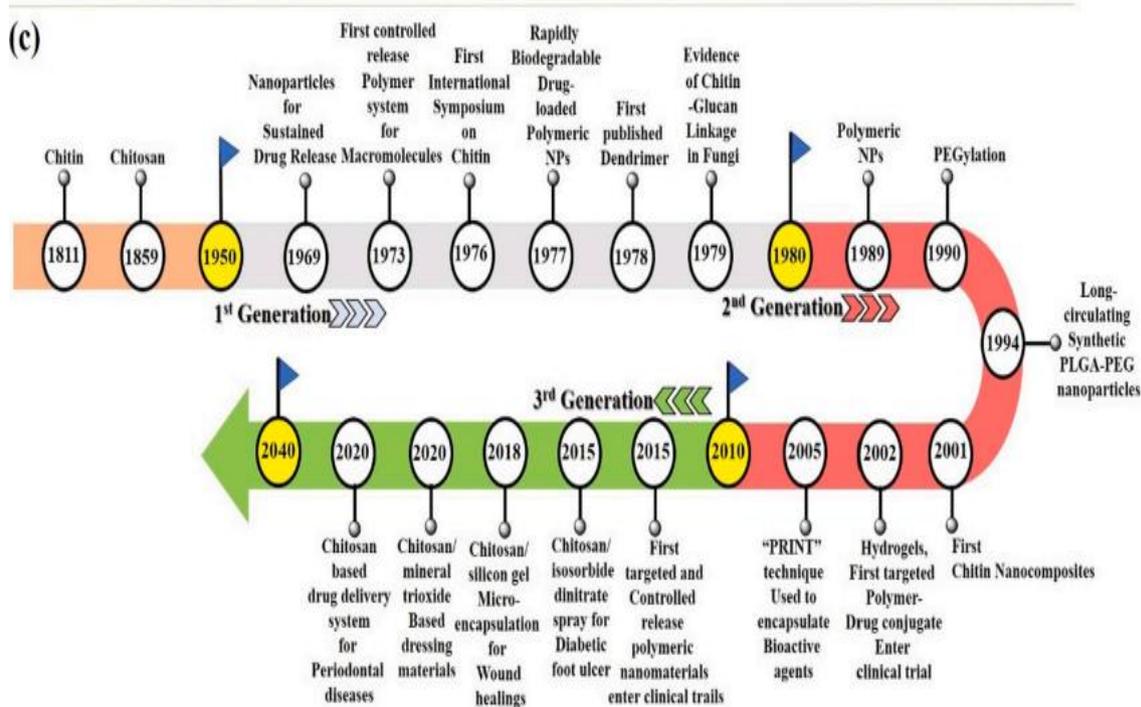
### I.1 Historique

Le chitosane est un polymère provenant de la chitine, un polysaccharide retrouvé dans les mollusques, les carapaces des insectes, crustacés, et champignons. Les propriétés associées à la chitine et au chitosane sont connues depuis bien longtemps [3].

La chitine a été découverte en 1811 par le chimiste Français Henri Braconnot. En 1859, Rouget a observé que la chitine traitée par de la potasse à chaud, était soluble dans des solutions aqueuses acides. Cette découverte a permis de distinguer le chitosane [4].

Dans les années 1950, le chitosane a été clairement décrit comme un polymère de D-glucosamine [5]. À partir des années 1970, la chitine et le chitosane ont commencé à être utilisés dans le but de valoriser les déchets produits par les conserveries de poissonneries [4].

Ces dernières années, le chitosane a suscité un grand intérêt en tant que matériau pour des applications biomédicales et pharmaceutiques. De nombreuses recherches ont été menées dans ce domaine, la figure (1-1) témoigne la chronologie des principales découvertes depuis la recherche sur les médicaments utilisant des polymères et du chitosan jusqu'aux essais cliniques :



**Figure I.1 :** Chronologie des découvertes des médicaments et l'utilisation du chitosane [6]

## I.2 La chitine

### I.2.1 Définition

La chitine ( $C_8H_{13}O_5N$ ) est un biopolymère très abondant que l'on trouve dans les mollusques, l'exosquelette des crustacés, les cuticules des insectes, les algues et la paroi cellulaire des champignons [7], qui sont des producteurs naturels de chitine [2], [4].

C'est un polymère exceptionnellement insoluble, ce qui le rend non biodégradable [8].

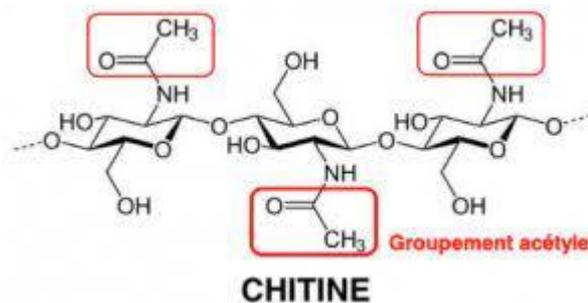
Les quantités de chitine provenant des déchets de coquilles varient selon les espèces (tableau1) et les saisons, mais, en général, les exosquelettes contiennent environ 30 à 40 % de protéines, 30 à 50 % de minéraux (principalement du carbonate de calcium) et 20 à 30 % de chitine [9], ainsi que d'autres composés tels que des pigments (p. ex. astaxanthine) et des lipides [10]

**Tableau I.1 :** Exemples de teneur en chitine provenant de différentes sources[11].

Source	Teneur en chitine %
Arthropodes	2 à 72
Mollusque	4 à 40
Plume de calmars	2.9 à 20.1
Champignons	3.0 à 20
Crevette	3 à 33
Crabes	26.6
Algues	Faible

## I.2.2 La structure chimique de la chitine :

Il s'agit d'un amino-polysaccharide linéaire constitué principalement d'unités de  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)- liées à des unités de 2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose et partiellement d'unités de  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-amino-2- désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose liées [2]. La figure ci-dessous illustre la structure de la chitine

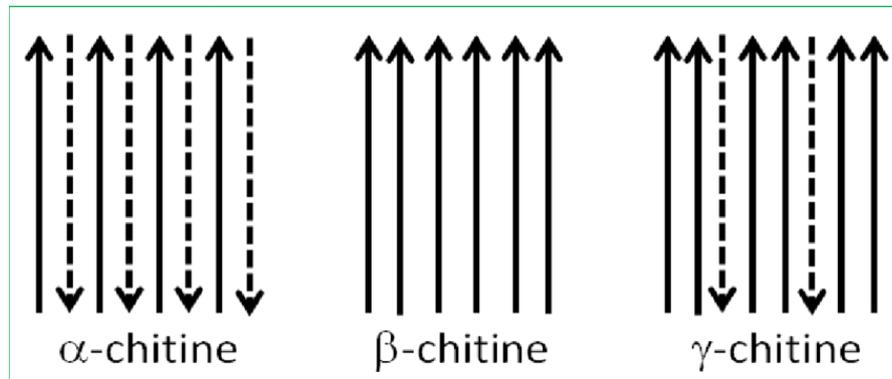


**Figure I.2 :** Structure de la chitine[9]

## I.2.3 La cristallinité de la chitine

Il existe trois structures cristallines polymorphes différentes de chitine : l' $\alpha$ -chitine, la  $\beta$ -chitine et la  $\gamma$ -chitine. L' $\alpha$ -chitine est la forme la plus courante de chitine et les chaînes adjacentes sont disposées dans des directions opposées. La  $\beta$ -chitine a été découverte dans les plumes de calmars et les diatomées et est considérée comme plus disponible, flexible et rigide que l' $\alpha$ -chitine.

Dans la  $\beta$ -chitine, les chaînes sont alignées parallèlement et sont plus réactives aux solvants. Alors que la  $\gamma$ -chitine est un mélange de  $\alpha$  et  $\beta$ -chitine où deux des trois chaînes sont orientées dans une direction et la troisième chaîne dans la direction opposée. Cette structure est rare et se trouve principalement dans le coléoptère *Ptinus*, les fibres de cocon et l'estomac de *Loligo* et seiches [5], [8].



**Figure I.3** : Schéma simplifié des trois formes cristallines de la chitine [2],  
[12]

### I.2.4 Méthodes d'extraction de la chitine

Le schéma ci-dessous, résume les méthodes d'extraction de la chitine des déchets des mollusques :

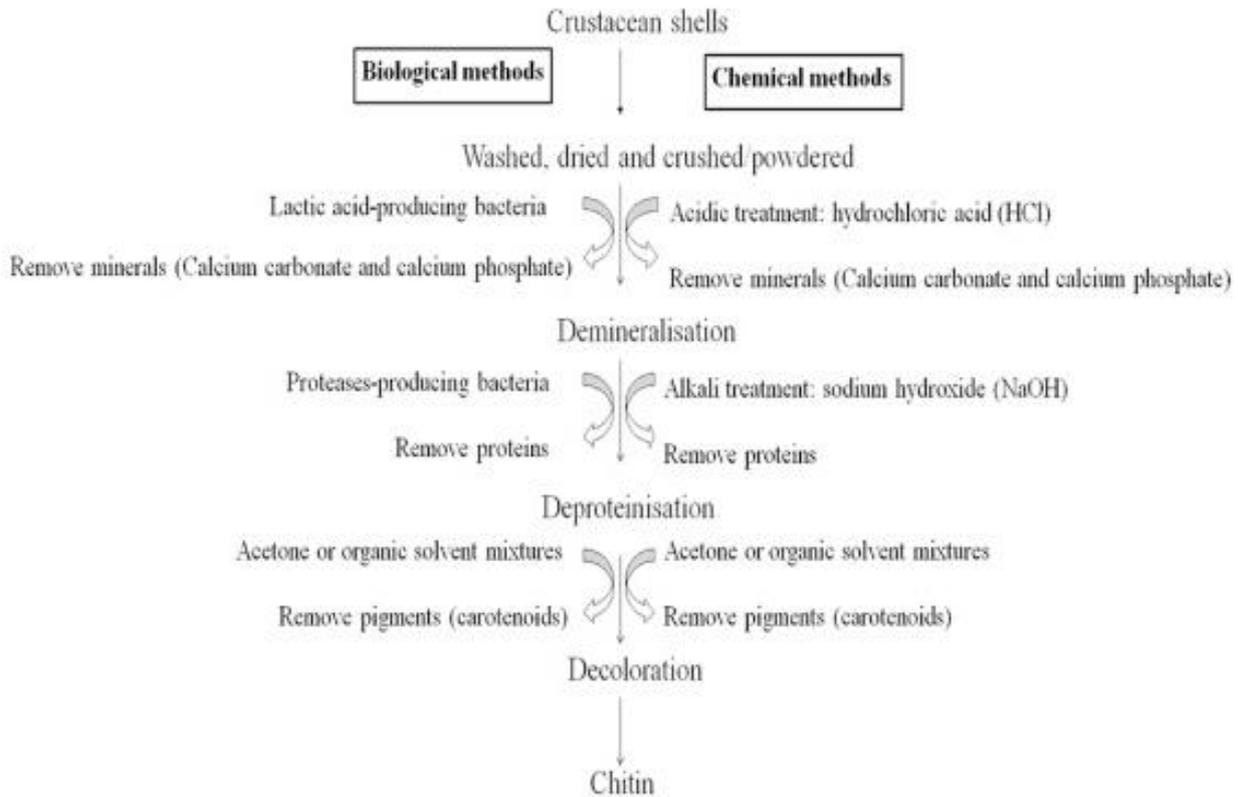


Figure I.4 : Méthodes d'extraction chimique et biologique [8], [10]

### I.3 Le chitosane

#### I.3.1 Définition

Le chitosane ( $C_6H_{11}NO_4$ )<sub>n</sub> est un biopolymère cationique obtenu par désacétylation de la chitine, largement utilisé pour ses propriétés inhérentes[13],

Le chitosane (CS) est non toxique, biodégradable, inoffensif pour la peau, anti-inflammatoire et analgésique, ayant la capacité de formation de gels, et fait partie des polymères d'origine biologique possédant une bonne fonction physiologique. [13]–[15]

#### I.3.2 Structure chimique du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire, composé du 2-amino-2-désoxy-D-glucopyranose (unité désacétylée) liées par une liaison glycosidique bêta (1-4) ; figure (1.5), [2], [16], [17].

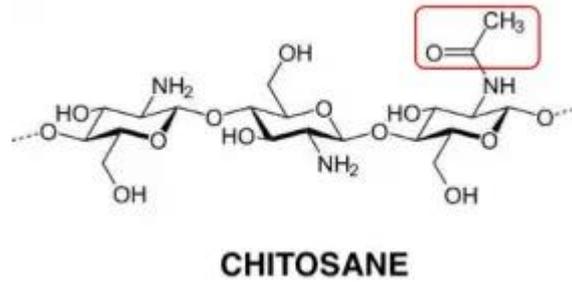


Figure I.5 : Structure chimique de chitosane [9]

## I.4 les méthodes d'extraction du chitosane

### I.4.1 Méthode conventionnelle

**I.4.1.1 Extraction chimique :** La méthode chimique utilise des acides et des bases fortes, pour dissoudre respectivement les carbonates de calcium et les protéines [2], ainsi qu'une utilisation excessive de solutions alcalines et de pH extrême lors de la désacétylation thermochimique de la chitine [18, 19]. Bien que ces méthodes présentent de nombreux inconvénients comprennent l'émission de produits chimiques toxiques, la biotransformation et les émissions de gaz à effet de serre, leur temps d'extraction rapide les rend encore largement utilisés dans l'industrie. Une représentation schématique de l'extraction chimique de la chitine et du chitosane est présentée dans la figure (1.6)



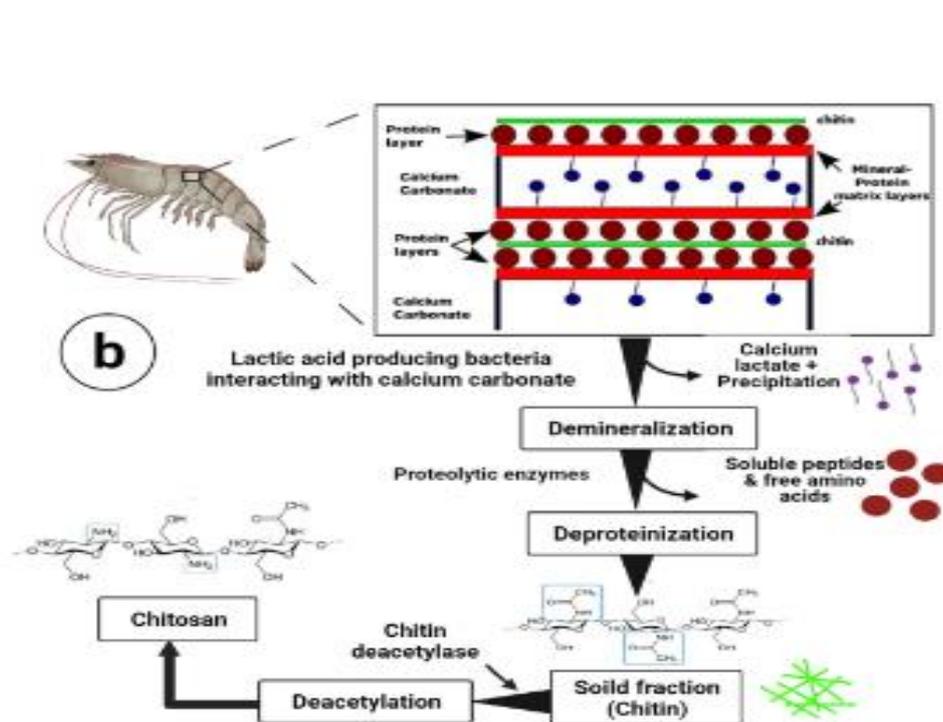
Figure I.6 : Schéma de l'extraction chimique [16]

**I.4.2 Méthode écologique :** L'extraction écologique de la chitine et du chitosane a fait l'objet de plusieurs études approfondies au cours des deux dernières décennies, environ 120 articles de recherche ont été indexés dans les bases de données.

### I.4.2.1 Extraction biologique

Les traitements biologiques (fermentation) offrent une alternative pour extraire la chitine et le chitosane. Des bactéries productrices d'acide lactique et des protéases bactériennes ont été utilisées pour les étapes de déminéralisation et de déprotéinisation respectivement.

Les microorganismes utilisent des enzymes produites naturellement pour catalyser la désacétylation de la chitine en chitosane. Cette méthode est plus douce et plus respectueuse de l'environnement. De plus, elle nécessite souvent moins d'énergie que les méthodes chimiques, mais elle est moins efficace que les autres méthodes [2], [16]; Une représentation schématique de l'extraction par fermentation de la chitine et du chitosane est présentée dans la figure (1.7)

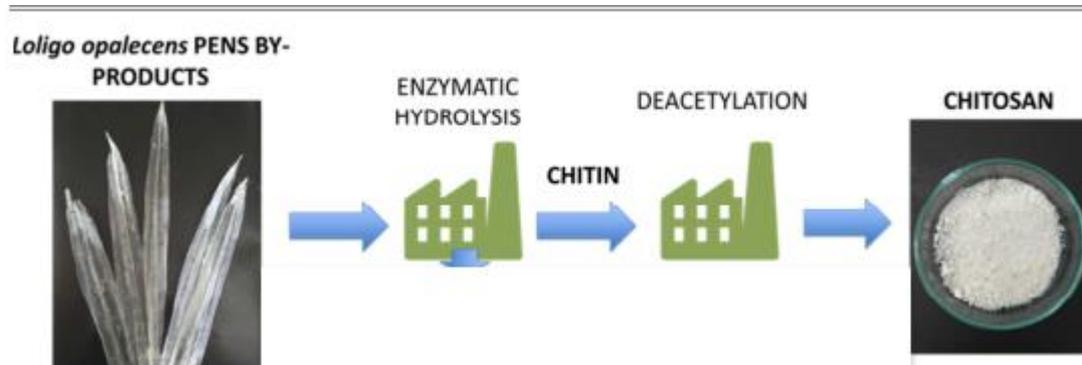


**Figure I.7 :** Schéma de l'extraction biologique [16]

### I.4.2.2 Extraction enzymatique

La désacétylation de la chitine est effectuée par des méthodes enzymatiques par des chitines désacétylases. Cette méthode est également douce et plus respectueuse de l'environnement que les méthodes chimiques, car elle n'implique pas l'utilisation de produits chimiques nocifs. De plus, elle est souvent plus rapide et plus efficace que la méthode biologique ;

Cependant la méthode enzymatique est plus coûteuse que les autres méthodes. De plus, la stabilité et la durée de vie des enzymes sont des facteurs clés à prendre en compte [16]. Une représentation schématique de l'extraction enzymatique de la chitine et du chitosane est présentée dans la figure (1.8)



**Figure 1.8** : Schéma de l'extraction assistée par enzyme [16], [20], [30]

### I.4.2.3 Extraction assistée par micro-ondes

La technologie des micro-ondes est une méthode plus récente qui a gagné en popularité dans les industries chimiques en raison des avantages qu'elle présente par rapport au chauffage conventionnel. Cette synthèse a permis de réduire considérablement le temps de réaction, d'augmenter le rendement et la pureté du produit en réduisant les réactions secondaires indésirables.

Le chauffage par micro-ondes implique deux mécanismes : la polarisation dipolaire et la conduction ionique, qui entraînent une absorption sélective du rayonnement par les substances polaires, ce qui augmente l'efficacité de la réaction. Cependant, les différentes conditions de fonctionnement des micro-ondes affectent le degré de désacétylation et la masse moléculaire du chitosane obtenu.

Il est donc essentiel d'optimiser les conditions du procédé pour améliorer la vitesse de réaction et réduire les coûts de production [16], [20]; Une représentation schématique de l'extraction assistée par micro-ondes est présentée dans la figure (1.9) :

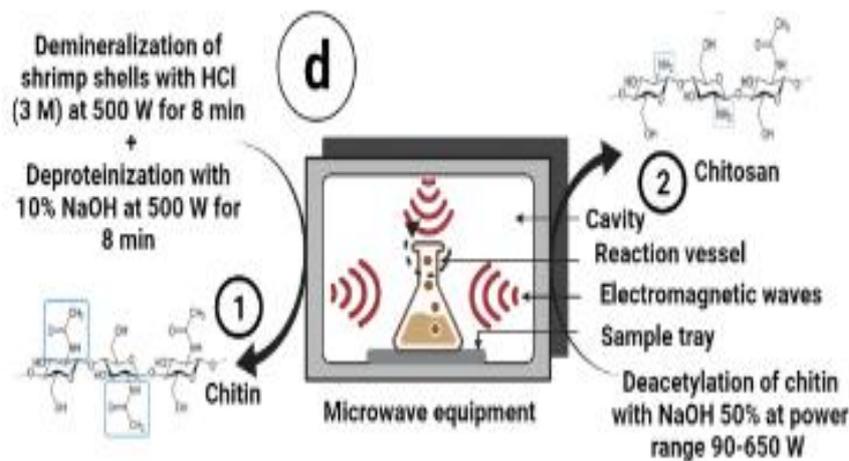


Figure 1.9 : schéma d'extraction assisté par micro-onde [16], [20]

## I.5 Les propriétés du chitosane

### I.5.1 Propriétés physico-chimiques :

#### I.5.1.1 Degré de désacétylation

Le degré de désacétylation (DD) est décrit comme un pourcentage molaire de la D-glucosamine par rapport au total de la D-glucosamine et de la N-acétyl-D-glucosamine dans la chaîne [21]. Le DD est un paramètre structural important qui affecte les propriétés physico-chimiques, mécaniques, de barrières et biologiques du chitosane. Pour évaluer les capacités de ce dernier, il est essentiel d'analyser les différents types de chitosane utilisés et de déterminer leur DD. Il peut être obtenu par titration volumétrique, spectroscopie infrarouge (IR), spectroscopie UV ou d'autres méthodes d'analyse.

La spectroscopie IR est la méthode la plus couramment utilisée pour l'estimation du DD du chitosane [5].

#### I.5.1.2 Poids Moléculaire

Le poids moléculaire (Mw) est considéré comme l'un des facteurs les plus significatifs pouvant influencer la viscosité d'une solution de chitosane, et cela peut être relatif à sa concentration, sa solubilité, ainsi que sa capacité à former des films et des gels.

En général, le chitosane ayant un Mw élevé est plus susceptible de générer une solution à haute viscosité, tandis que celui ayant un Mw plus faible tend à avoir une viscosité plus faible [14].

$$\eta = K * P M_v^a$$

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$$

### I.5.1.3 Solubilité

Le chitosane est un polymère naturellement insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques. Sa solubilité est influencée par plusieurs facteurs, notamment le degré de désacétylation, le poids moléculaire, le pH, la température, la concentration et la présence d'ions dans la solution. Il peut se dissoudre facilement dans un pH inférieur à 6,0 par protonation de NH<sub>2</sub> pour former NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

(En d'autres termes, plus il y a des groupes NH<sub>2</sub> dans la chaîne de la structure du chitosane, plus la solubilité de la solution de chitosane dans un environnement au pH acide est facile) [21].

### I.5.1.4 Cristallinité

En raison de sa structure semi-cristalline inflexible, le CS a une solubilité limitée dans l'eau, ce qui restreint son application dans des processus multiples [21], Tout comme la chitine, la cristallinité du CS dépend de la source et la méthode d'extraction, ainsi qu'aux conditions environnementales.

### I.5.1.5 Viscosité

La viscosité du chitosane est influencée par plusieurs facteurs, notamment le degré de désacétylation du polymère. Plus le chitosane est désacétylé, plus il contient de groupes amine libres, ce qui le rend plus soluble et, par conséquent plus visqueux.

La viscosité dépend également de la concentration du polymère (qui augmente avec la concentration), de la température (qui diminue lorsque la température augmente), du poids moléculaire (où la viscosité intrinsèque augmente avec l'augmentation du poids moléculaire), et du pH (où une viscosité plus élevée est observée à un pH plus bas).

La masse moléculaire moyenne est déterminée par l'équation de Mark-Houwink-Sakurada, qui relie ce paramètre à la viscosité intrinsèque [7]:

$$\eta = K M_v^\alpha$$

Où K et  $\alpha$  sont des constantes qui doivent être déterminées expérimentalement.

Elle est généralement mesurée à l'aide d'un viscosimètre.

## I.5.1.6 Aptitude à la formulation du gel

Le chitosane est un biopolymère qui peut former des hydrogels et des nanogels à la suite de petites modifications de la force ionique ou du pH. Comme indiqué précédemment, les groupes amines du chitosane sont protonés dans un milieu acide. Ce qui provoque des répulsions électrostatiques, qui favorisent le gonflement de la structure du chitosane.

La formation des nanogels a lieu principalement par les interactions électrostatiques des groupes hydroxyles et du groupe amine des monomères.

En raison de ces propriétés, le chitosane peut être utilisé dans plusieurs secteurs différents, tels que décrit dans le tableau suivant [10], [23], [24].

**Tableau 1.3 :** Domaines d'application et utilisations potentielles de la chitine et de ses dérivés.

Domaines	Exemples d'application
Pharmaceutique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Supports d'ingrédients pharmaceutiques</li> <li>-Vecteurs non viraux pour la délivrance de gènes</li> <li>-Encapsulation et protection des gènes et des principes actifs</li> <li>-Libération progressive des médicaments</li> <li>-Améliorer l'arrivée des acides nucléiques vers les cibles thérapeutiques</li> </ul>
Biomédical	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fabrication d'échafaudages pour la régénération tissulaire</li> <li>-Barrière du pansement à base de chitine aux infections microbiennes</li> <li>-Développement de points chirurgicaux</li> </ul>
Cosmétique et dermatologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Transporteurs actifs de produits cosmétiques</li> <li>-Produits de soins de la peau, des cheveux et de la bouche</li> <li>-Agents hydratants et anti-âge</li> </ul>

<p>Alimentaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Barrière de protection contre la détérioration des aliments</li> <li>-Additifs de conservation des aliments et formation de biofilm (emballages comestibles)</li> <li>-Composés stabilisants et épaississants</li> <li>Ingrédients prébiotiques (fibres alimentaires)</li> </ul>
<p>Textiles</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fibres antimicrobiennes et non allergènes agents coagulants et floculants pour l'élimination des colorants et des produits chimiques des eaux usées textiles</li> <li>-Agent chélateur qui récupère les métaux lourds de l'eau polluée</li> </ul>
<p>Agriculture</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Agents d'enrobage des semences</li> <li>-Renforcement des défenses des plantes et protection contre les ravageurs et les micro-organismes</li> <li>-Remplacement des pesticides chimiques</li> </ul>
<p>Papier</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Confère de la résistance au papier contre l'humidité</li> <li>-Emballage biodégradable pour emballage alimentaire</li> </ul>
<p>Enzymes-immobilisation</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Support d'immobilisation d'enzymes sur des matériaux à base de chitine et de chitosane (traitement du vin, du sucre et des eaux usées pour l'élimination des polluants).</li> <li>-Fabrication de biocapteurs pour les mesures in situ des contaminants environnementaux et le contrôle des métabolites dans les organes artificiels.</li> </ul>

## I.5.2 Propriétés pharmacologiques (Activité pharmacothérapeutique)

Le chitosane est connu comme étant le seul polysaccharide cationique ayant des applications pharmaco-thérapeutiques étendues [7], tels que :

### I.5.2.1 Agent antimicrobien

Selon le dictionnaire médical Merriam-Webster, un antimicrobien est un agent qui prévient et arrête la croissance des micro-organismes pathogènes ou même les tue[6].

Le chitosan, un polymère naturel, possède un large spectre d'activité antibactérienne [66], ciblant à la fois les souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives [65]. Le chitosane a notamment démontré son efficacité contre les champignons [67]. Cependant, l'activité antimicrobienne du chitosane est limitée par sa faible solubilité [68], qui peut être attribuée à sa structure cristalline rigide. Néanmoins, la présence de groupes aminés libres dans le chitosane offre la possibilité de modifier sa structure par des réactions chimiques contrôlées, ce qui permet d'obtenir des dérivés plus solubles. Divers dérivés du chitosane ont fait l'objet d'études approfondies sur leur activité antimicrobiennes. Ces dérivés ont démontré une activité significativement plus élevée que le chitosane non modifié à un pH de 7[69].

### I.5.2.2 Antioxydant

L'activité antioxydante du chitosane a attiré l'attention des industries alimentaires et pharmaceutiques en raison de son potentiel pour protéger les médicaments et les nutraceutiques contre l'oxydation, qui peut affecter leur efficacité et leur qualité.

Des études ont montré que le chitosane peut agir comme un antioxydant en piégeant les radicaux libres et en réduisant la formation de peroxyde lipidique. En outre, le chitosane peut également interagir avec les métaux de transition pour prévenir la formation de radicaux libres [24]. Le chitosane peut également jouer un rôle en tant qu'agent antitumoral et hypocholestérolémiant. En raison de ses propriétés biologiques uniques et son poids moléculaire, il peut également influencer ces effets.

### I.5.2.3 Agent anti-inflammatoire

Le processus inflammatoire est une réponse physiologique automatique de l'organisme liée à une lésion tissulaire. L'objectif principal de la réponse inflammatoire est d'amener les leucocytes circulants et les protéines plasmatiques sur le site de l'infection ou de la lésion tissulaire, d'éliminer l'agent causal, si possible, et d'entamer le processus de guérison [7].

Le chitosane peut réduire l'inflammation en inhibant la libération de cytokines pro-inflammatoires et en diminuant l'infiltration de cellules inflammatoires dans les tissus et favorise la cicatrisation des plaies.

## I.6 Modification structurelle du chitosane

La modification chimique de la structure du chitosane offre des solutions à divers problèmes rencontrés avec le chitosane non modifié. En effet, les modifications peuvent améliorer les propriétés biologiques du chitosane, notamment en augmentant sa solubilité, sa biodisponibilité, sa biodégradabilité, et sa biocompatibilité [2]. De plus, les dérivés du chitosane modifié sont de très bons vecteurs de médicaments et constituent un matériau prometteur pour le développement de thérapies innovantes. Les études actuelles démontrent que la chitine et le chitosane deviennent solubles dans l'eau et les solvants courants avec une destruction partielle de leur structure cristalline[25], Ainsi, le chitosane modifié et ses dérivés peuvent être appliqués dans divers domaines importants.

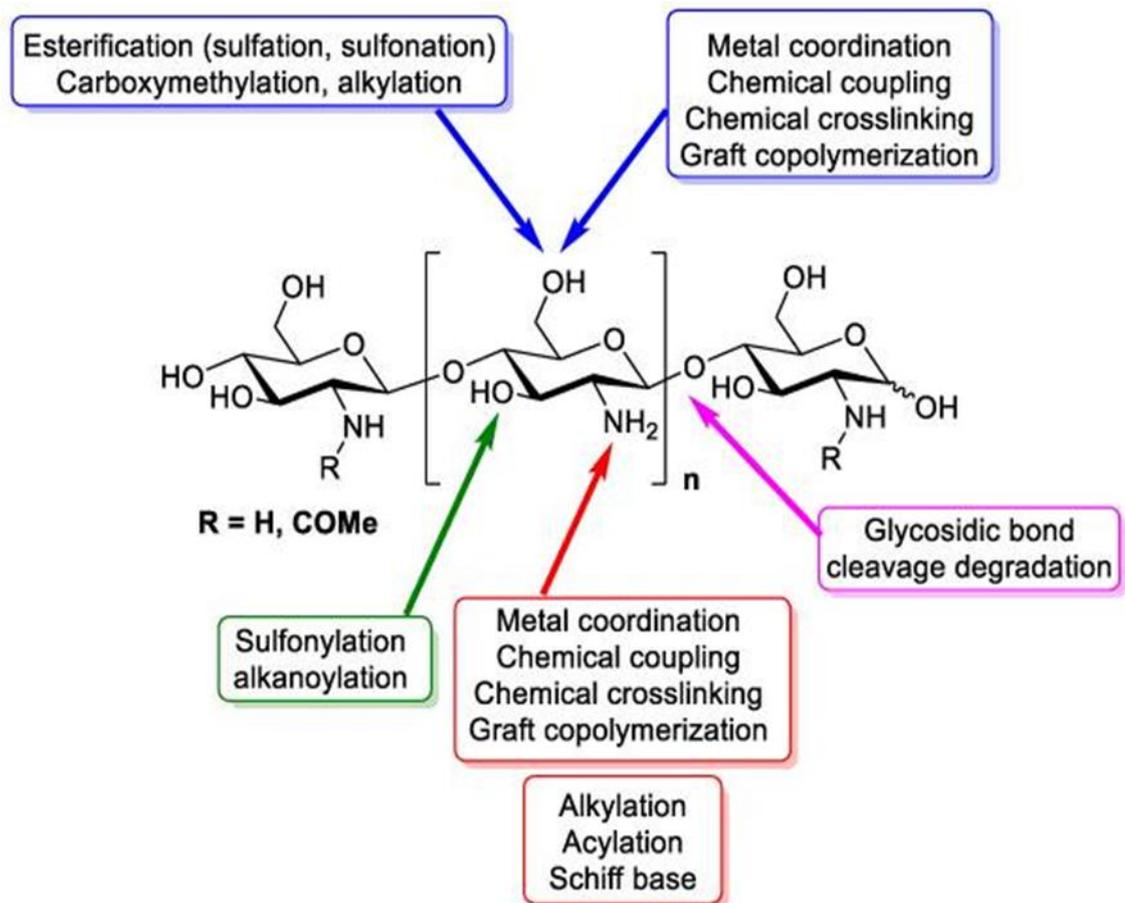
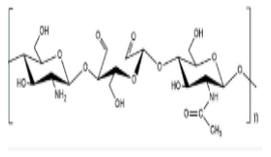
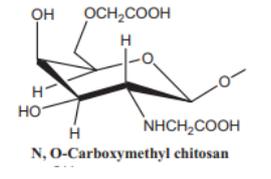
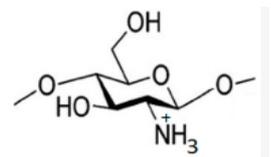
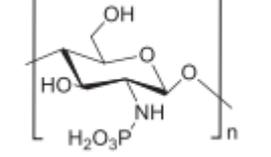
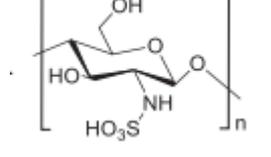


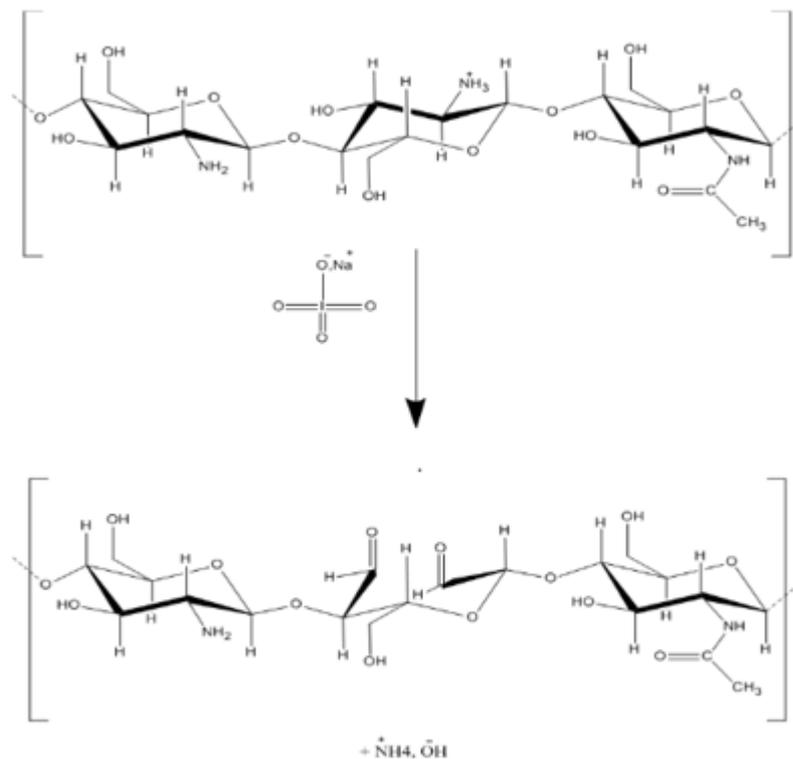
Figure 1.10 : Les groupements modifiables[7]

**Tableau 1.4** : les modifications les plus communément appliquées pour le chitosane[15] .

Modification	Groupelement ajouté	Intérêt	Propriétés
Dialdehydation		Améliore la solubilité et l'activité antimicrobienne	-Activité antimicrobienne -Activité antioxydante
N, O-carboxyméthyl [26]	 N, O-Carboxymethyl chitosan	Amélioration de la solubilité du chitosane et de l'activité antioxydante [7]	-Activité antibactérienne -Antioxydante - Capacité de fixation des lipides -Capacité de rétention de l'humidité
Quaternization [12]		Améliore la solubilité et la stabilité du chitosane	-Adjuvant de vaccin -Cicatrisation des plaies -Activités antimicrobiennes [27]
Phosphorylation [28]		Améliore la solubilité, la capacité du chitosane à former des gels et interagir avec des substances biologiques.	-Activité antioxydante -inhibe la corrosion[7]
Sulfonation [24]		Améliore l'activité antimicrobienne et antitumorale du chitosane.	- favorise la différenciation neuronale[7]

## I.6.1 dialdéhyde chitosane

Le chitosane dialdéhyde, souvent abrégé en DCS, est une forme modifiée du chitosane [38]. Le chitosane dialdéhyde est créé par un processus de modification chimique connu sous le nom d'oxydation périodate. Dans ce processus, le chitosane est traité avec du périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ), qui brise la liaison C2-C3 dans la molécule de chitosane, ce qui entraîne l'introduction de groupes fonctionnels dialdéhydes (-CHO) sur le squelette du chitosane. Cette modification confère plusieurs propriétés uniques au chitosane dialdéhyde, notamment une meilleure solubilité dans l'eau, une plus grande réactivité avec d'autres molécules, une meilleure activité microbiologique et un potentiel d'utilisation accru dans diverses applications [40] [41].



**Figure I.11** : schéma d'oxydation du chitosane par le périodate [39]

L'introduction de groupes dialdéhydes facilite la réticulation du chitosane dialdéhyde avec d'autres molécules ou polymères[40], ce qui permet son utilisation dans les systèmes d'administration de médicaments, les pansements, l'ingénierie tissulaire et d'autres applications biomédicales. La solubilité accrue du chitosane dialdéhyde en fait également un ingrédient précieux pour le développement de diverses formulations dans les industries pharmaceutiques et de soins de santé.

### Conclusion :

Les biopolymères de chitine et de chitosane sont de plus en plus reconnus comme des matériaux prometteurs dans divers secteurs industriels en raison de leurs nombreux avantages, notamment leur faible coût, leur biodégradabilité et leurs propriétés uniques. En particulier, les nanoparticules à base de biopolymères, comme la cellulose et le chitosane (CS), ont suscité un intérêt croissant dans le domaine biomédical pour leur potentiel dans le pronostic, le diagnostic et le traitement de diverses maladies. En tant que nanomatériaux "verts" et respectueux de l'environnement, ces biopolymères offrent de nouvelles perspectives dans le développement de technologies révolutionnaires pour améliorer la santé.

## **Chapitre II**

### II. Introduction

Au cours des deux dernières décennies, les nanoparticules pharmaceutiques ont commencé à être considérées, à l'échelle de la recherche, comme l'un des mécanismes évolutifs d'administration des médicaments.

De nombreuses recherches universitaires ont été lancées pour étudier la sécurité et l'efficacité des nanotechnologies pharmaceutiques [29].

Les hydrogels sont des réseaux polymères tridimensionnels réticulés capables d'adsorber de grands volumes d'eau (le degré de gonflement atteint plusieurs milliers de pour cent) et d'imiter les tissus humains. Les hydrogels d'une taille de 20 à 30 nm (nanogels) sont capables d'incorporer des médicaments hydrophobes dans leur noyau et de les acheminer jusqu'à leur destination, assurant ainsi leur libération prolongée [30]. Ils présentent des avantages par rapport aux systèmes d'administration conventionnels et macroscopiques, ce qui les rend plus pratiques en tant que système d'administration de médicaments par voie transdermique [31].

Ces dernières années, les nanomatériaux utilisés pour les systèmes d'administration de médicaments ont fait l'objet d'une grande attention dans le domaine pharmaceutique. Le chitosane est utilisé comme polysaccharide cationique [22], due à ses performances anti-inflammatoires dans la médecine régénérative et les DDS.

Les NP de CS sont des biomatériaux respectueux de l'environnement qui peuvent être utilisés pour des applications utiles aux niveaux préclinique et clinique [16].

Le but de ce chapitre est de présenter les diverses nanotechnologies utilisées en médecine et de mettre l'accent sur les nanogels à base de chitosane, qui constituent la forme topique d'administration de médicaments étudiée dans notre travail.

### II.1 Historique

En 1960, le physicien Richard Feynman a donné une conférence intitulée "There's Plenty of Room at the Bottom" (Il y a de la place en bas), dans laquelle il suggère la possibilité de manipuler et de contrôler la matière à l'échelle nanométrique [32].

La nanotechnologie a connu un développement important au cours des dernières décennies, et son impact sur le domaine médical a été significatif. Les premières nanoparticules pharmaceutiques ont été développées par l'équipe du Professeur Peter Paul Speiser, de l'Institut Fédéral de Technologie à Zurich, qui avait créé des nanocapsules pour les vaccins en utilisant des particules virales ou antigéniques. Les années suivantes ont vu l'apparition de nanoparticules biodégradables et l'utilisation de polymères tels que l'acide poly(lactique) et le poly(éthylène glycol), d'où son ajout a permis d'améliorer la durée de vie des nanoparticules en circulation dans le sang.

Des recherches ont également montré que les nanoparticules améliorent l'efficacité des médicaments anticancéreux, la biodisponibilité des anti-infectieux et des médicaments de thérapie génique[33].

Enfin, les nanogels sont une invention relativement récente dans le domaine de la nanotechnologie médicale. Les premiers travaux sur les nanogels remontent aux années 1990, mais leur développement n'a vraiment pris son envol que dans les années 2000. Ils sont actuellement utilisés pour la délivrance de médicaments, mais également pour des applications telles que la thérapie génique, la détection de biomarqueurs et l'imagerie médicale[34].

### II.2 Intérêt de la nanotechnologie

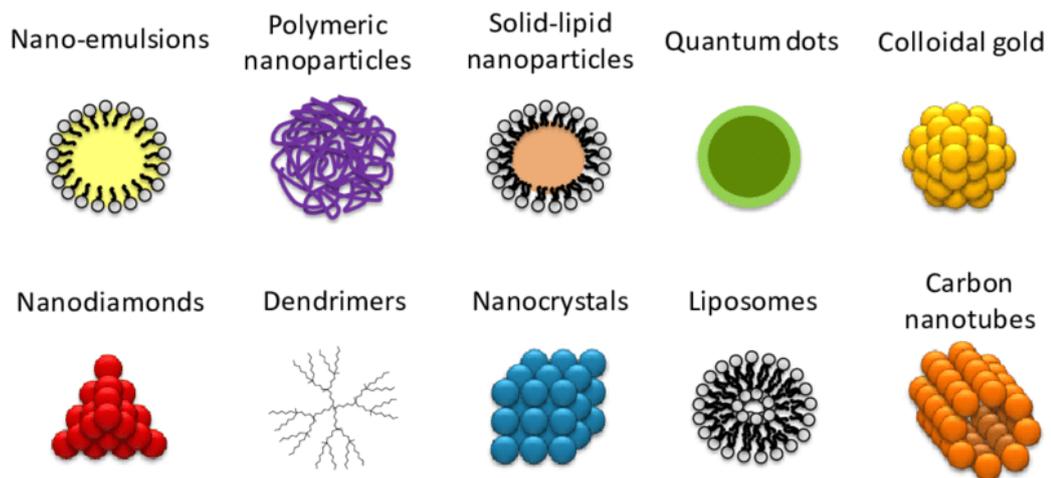
Le design à l'échelle nanométrique offre la possibilité d'améliorer, de modifier ou de changer les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques d'un médicament dans le corps humain, en lui acquérant les avantages suivants :

- Très petite taille (entre 1 et 100 nm)
- Augmente la surface de contact

- Améliorer la solubilité
- Réduire le nombre de prises
- Protéger le médicament contre la dégradation.
- Délivrer le médicament en zones ciblées

### II.3 Les différentes nanotechnologies

Les principales formes de nanoparticules pour les applications biomédicales comprennent : les nanosphères, les nanovésicules, les nanoémulsions, les nanosuspensions, les nanocapsules, les nanoliposomes, les nanocristaux, les micelles, les virosomes, les nanoparticules de protéines, les nanoparticules de lipides solides et les nanoparticules d'hydrates de carbone [16].



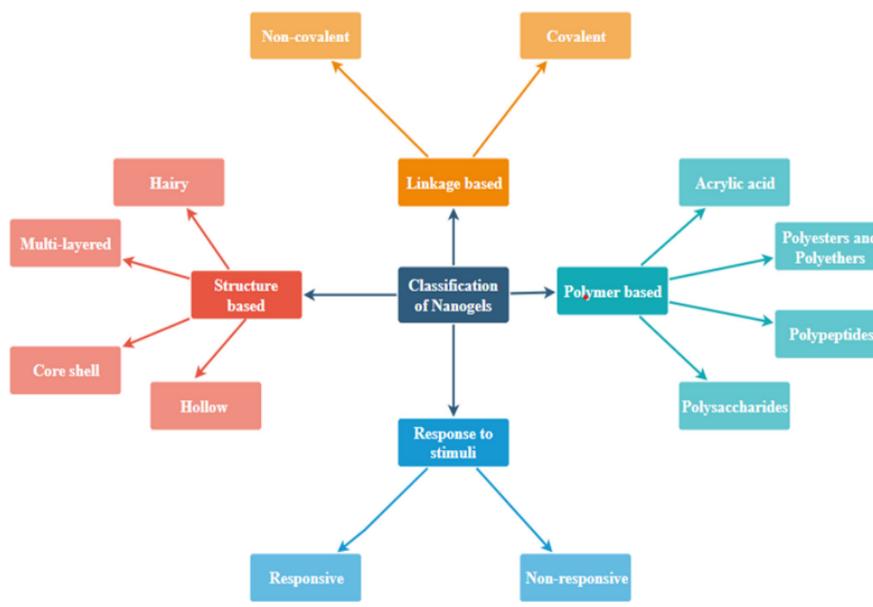
**Figure II.1** : les différentes structure des nanotechnologies les plus communes [35], [36]

#### II.3.1 Les nanogels

Les nanogels sont des hydrogels de taille nanométrique, qui ont la capacité de charger facilement des substances bioactives. Ils associent les avantages des nanoparticules avec ceux des hydrogels, ce qui en fait des candidats prometteurs pour les applications de libération de médicaments.

Les nanogels sont constitués d'un réseau polymère tridimensionnel réticulé (croisé) qui peut encapsuler des médicaments hydrophiles et hydrophobes en raison de leur nature ajustable [34], fabriquées par croisement physique/chimique du polymère. La réticulation interne des polymères permet aux nanogels d'absorber les fluides et de conserver leur intégrité structurale sans subir de dissolution, leur capacité à absorber de grandes quantités d'eau et de fluides biologiques peut être attribuée à la présence de -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -CONH<sub>2</sub>, -CONH, -SO<sub>2</sub>H, etc [37].

**II.3.1.1 Classification des nanogels** Les nanogels ont été classés en fonction du polymère, du lien et des stimuli, comme montré dans la figure ci-dessous



**Figure II.2 :** Classification des nanogels [37]

### A. Classification basée sur le mécanisme de libération à partir de nanogel

➤ **Les nanogels non sensibles :** Ils permettent la diffusion du médicament par gonflement de la matrice nanogel, ce qui dépend de la taille de maille. Ainsi, la libération du médicament du nanogel est principalement influencée par la taille du médicament. Les petites molécules de médicament diffusent facilement, tandis que les

macromolécules, comme les protéines, sont libérées de manière prolongée de la matrice [36].

➤ **Les nanogels sensibles** : Le déclenchement est le moyen de contrôler la libération. Les nanogels ayant un comportement réactif et une libération de médicament déclenchée sont rapportés dans la littérature et sont appelés "nanogels intelligents", comme le montre la figure ci-dessous. Les déclencheurs chimiques ou physiques entraînent une modification de leur comportement de gonflement ou provoquent la dégradation du réseau et de la structure polymériques, ce qui influence le profil de libération du médicament.

➤ **Libération de médicaments à partir de nanogels** : La libération du médicament peut être induite par :

→ Une énergie externe (température) appliquée aux nanogels qui induit une dégradation, un désenfouissement ou une transition structurelle des chaînes de polymères des nanogels, comme illustrée en **(a)**.

→ La modification du pH entraîne la désionisation du réseau de polymères et la libération du médicament lié à l'électricité statique, montrée en **(b)**.

→ La libération du médicament est due à la dégradation des chaînes polymères sensibles à la réduction ou des liaisons transversales, schématisée en **(c)**.

→ La diffusion du médicament à partir des nanogels est due à l'irradiation lumineuse, comme renseignée en **(d)**.

→ Les cations ou poly-ions multivalents de faible poids moléculaire de l'une ou l'autre charge peuvent déplacer les médicaments ayant le même signe de charge des complexes électrostatiques avec le nanogel ionique, comme élucidée en **(e)**.

→ La libération de médicaments due à la dégradation des chaînes ou des liaisons transversales de polymères dégradables par des enzymes, en **(f)**.

→ Libération de médicaments due à la réponse du nanogel au champ magnétique, le schéma **(g)**.

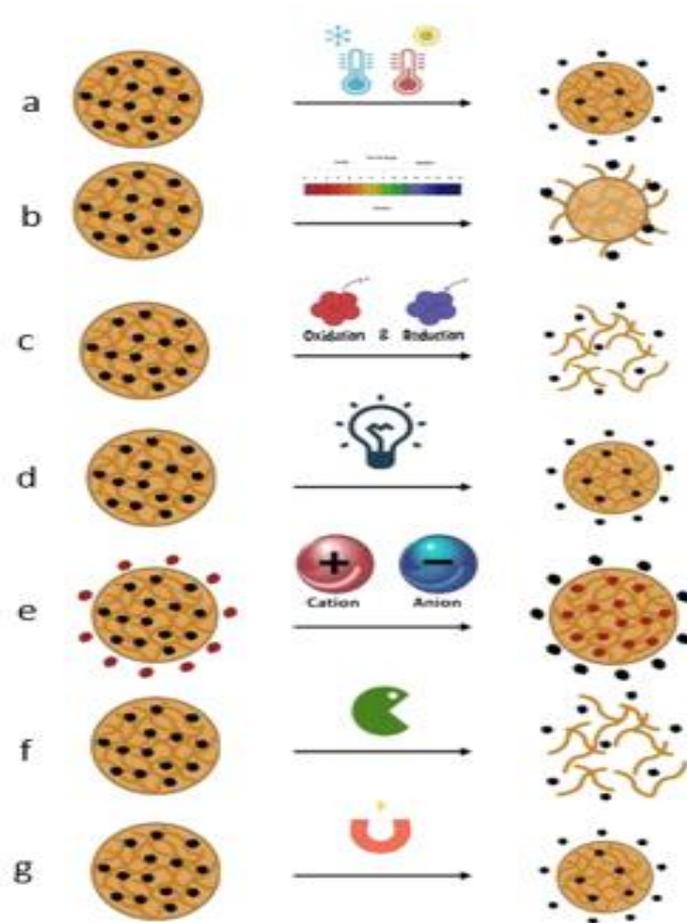


Figure II.3 : Libération de médicaments à partir de nanogels [34]

### B. Classification basée sur la structure des nanogels

En raison de la variété des matériaux utilisés dans la formulation des nanogels, ceux-ci peuvent adopter une grande diversité d'arrangements spatiaux, ce qui leur confère une grande adaptabilité en termes de forme, ou il existe des :

Nanogels poilus (1)      Nanogels multicouches (2)      Nanogels cœur-coquille (3)

Nanogels creux (4)      Nanogels fonctionnalisés (5)

Comme illustré dans la figure ci-dessous :

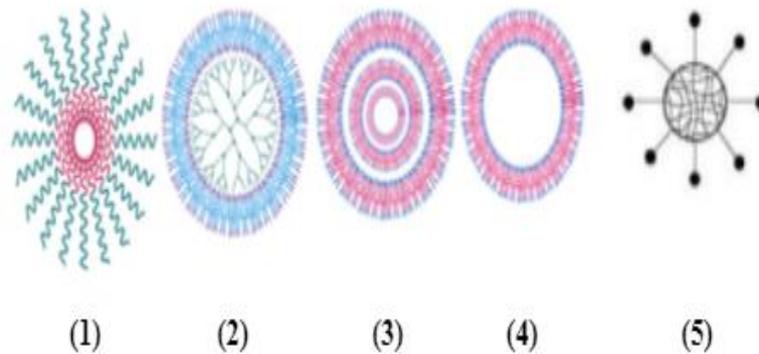


Figure 2-4 : les différentes structures des nanogels [37]

**C. Classification basée sur les techniques de réticulation**

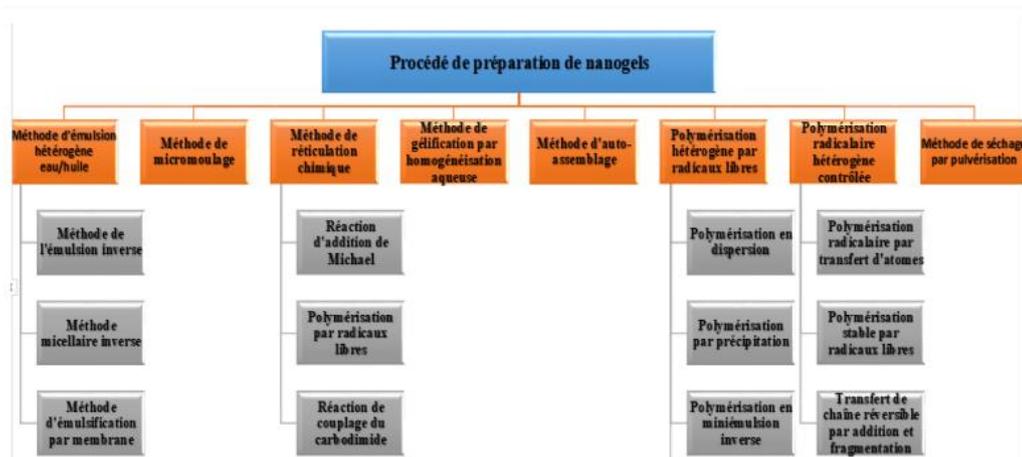
Les nanogels peuvent être physiquement ou chimiquement réticulés.

✓ Les nanogels physiquement réticulés sont formés par des interactions entre les chaînes de polymère et peuvent encapsuler des bio-macromolécules et des substances hydrophobes.

✓ Les nanogels chimiquement réticulés sont préparés avec des liaisons covalentes permanentes qui confèrent une structure poreuse ou micellaire aux nanogels. Diverses approches sont utilisées pour leur synthèse[36].

**II.3.1.2 Préparation des nanogels :**

La figure suivante montre les techniques de préparation des nanogels,



**Figure II.5 :** Schéma des techniques de préparation des nanogels [36]

### **II.4 Les nano-systèmes à base de Chitosane** (encapsulation de bioactifs naturels)

Le chitosane est utilisé comme matériau de base pour les applications nanotechnologiques. La caractéristique la plus importante de ce biopolymère, qui lui permet d'adhérer à l'échafaudage, est sa grande porosité.

Le choix de la voie d'administration dépend de l'objectif thérapeutique (rapidité d'effet, limitation des effets systémiques), des possibilités d'administration chez le malade, des propriétés physico-chimiques et de la taille des molécules (résistance à l'acidité gastrique et aux enzymes digestives, facilité à passer les barrières capillaires ou digestives ...) et des processus d'élimination de ces médicaments (biotransformation intestinale, hépatique).

### **II.5 Voies d'administrations des médicaments :**

Diverses substances, telles que des produits chimiques, des médicaments, des anticorps, des cellules ou d'autres agents, peuvent être administrées par différentes voies d'administration. La sélection de la voie d'administration la plus appropriée est cruciale pour garantir une efficacité et une sécurité optimales. Pour ce faire, il est nécessaire de prendre en compte plusieurs facteurs, tels que l'absorption, la biodisponibilité et le métabolisme de la substance. Ces facteurs peuvent être influencés par les caractéristiques physicochimiques de la substance, la formulation du produit, la voie d'administration et les propriétés physiologiques du patient. Par conséquent, une connaissance approfondie de ces facteurs est essentielle pour optimiser l'efficacité et la sécurité de l'administration de substances.

La littérature scientifique offre une abondance de données sur les différentes voies d'administration disponibles, ce qui permet une sélection éclairée de la voie d'administration appropriée pour une substance donnée.

La **figure 2-6** résume les différentes voies d'administrations des médicaments

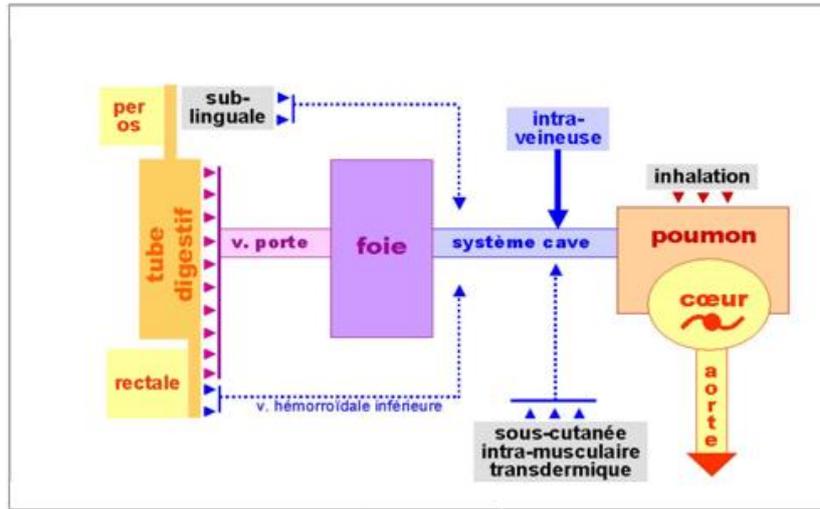


Figure II.6 : différentes voies d'administration des médicaments [38]

### II.5.1 Les voies d'administration cutanée

La voie cutanée correspond à l'administration des médicaments sur la peau, soit pour une action locale, soit pour une action générale (voie percutanée ou transdermique) [39].

La voie transdermique consiste en l'administration d'un médicament à travers la peau afin de produire une action systémique et généralisée. Cette méthode d'administration est utilisée pour permettre une libération contrôlée et prolongée du médicament dans la circulation sanguine, offrant ainsi une alternative pratique aux voies d'administration plus traditionnelles telles que l'oral ou l'injection. Une limite à ce traitement cependant est que la peau est une barrière très efficace [40].

### II.5.2 Les formes galéniques concernées :

Tableau 2.1 : les formes galéniques et la formulation utilisée

Forme galénique	
Forme solides ou semi-solide	Crèmes, gels et pommades dermiques, poudre à usage externes
Formes liquides	Lotions et solutions pour usage externes
Formes adhésives cutanées	Dispositifs transdermique(patchs), emplâtres, pansements

### II.5.3 L'absorption cutanée :

La perméabilité de la peau à un médicament peut varier d'un sujet à l'autre, les paramètres suivants peuvent influencer le degré d'absorption :

- ✓ Le site d'application : l'absorption est faible aux endroits où la peau est fortement kératinisée (plante des pieds, paume des mains).
- ✓ La fréquence d'application : Une application répétée de dispositifs transdermiques sur le même site enlève la couche cornée lors du retrait de l'adhésif, ce qui augmente la perméabilité cutanée. En conséquence, lors de l'application répétée de dispositifs transdermiques, alterner les sites d'application.
  - ✓ L'âge : l'absorption diminue avec l'âge. À savoir...
  - ✓ L'état de la peau : ne pas appliquer un médicament sur une peau lésée (brûlures par exemple) sauf s'il est destiné à traiter spécifiquement la lésion.
  - ✓ La chaleur (température extérieure, fièvre, bains, couverture chauffante, bouillotte : éviter les zones exposées à la chaleur pour éviter tout surdosage.

La pilosité : une pilosité excessive diminue l'absorption. Si nécessaire couper les poils avec des ciseaux ou une tondeuse en prenant garde à ne pas léser la peau (ne pas raser). Il est important de noter que toute substance appliquée sur la peau est susceptible de diffuser dans la circulation sanguine (risque d'effets indésirables et d'interactions).

### Conclusion

Le développement de nanogels pour l'administration transdermique cutanée est une avancée significative dans la formulation de médicaments. Les nanogels sont des systèmes de libération de médicaments précis et contrôlables, offrant une protection contre l'environnement extérieur et une pénétration accrue à travers la peau. En outre, l'utilisation de nanogels permet une libération prolongée des médicaments, ce qui améliore l'efficacité thérapeutique et réduit le nombre d'administrations nécessaires.

L'utilisation de chitosane et d'autres biopolymères est une étape importante vers des thérapies plus sûres et plus efficaces pour les patients.

## **Chapitre III**

### III. Introduction

Le travail pratique a été réalisé au niveau du laboratoire de Génie Chimique du département de Génie Des Procédés de la faculté de technologie, à l'université de Blida 1.

Ce chapitre décrit en détail le matériel, les matières premières et les protocoles expérimentaux utilisés dans notre étude, de plus les différentes méthodes de caractérisation sont également décrites.

Cette étude vise à valoriser les déchets de calamars par extraction du chitosane pur, une substance naturelle. Ensuite, la modification de ses propriétés physico-chimiques afin de l'utiliser pour concevoir un nanogel transdermique.

Les étapes de l'étude ont été réparties comme suit :

- ✓ Collecte des déchets de calamars ;
- ✓ Extraction du chitosane à partir des déchets de calamars
- ✓ Caractérisation du chitosane pour évaluer ses propriétés physico-chimiques
- ✓ Modification chimique des propriétés du chitosane ;
- ✓ Conception d'un nanogel transdermique à base de chitosane extrait et modifié ;
- ✓ Caractérisation des propriétés des différentes formulations de nanogels pour déterminer leurs

propriétés physico-chimiques, telles que sa taille, sa stabilité et la capacité de libération.

### III.1 Matériel

**III.1.1 Appareillage :** Les équipements cités ci-après ont été utilisés

- Balance électronique ;
- Agitateur à plaque chauffante ;
- Homogénéisateur ;
- DLS ;
- UV-visible (spectrophotomètre) ;
- Spectrophotomètre infra rouge ;
- Rhéomètre.

**Les Plumes de calamars :** constituent la matière première utilisée dans notre procédé d'extraction, afin d'obtenir du chitosane.

Elles ont été collectées du littoral Algérien, exactement dans la wilaya de Tipaza, des différentes espèces de calamars présents sur les lieux. La figure ci-dessous illustre leur aspect



**Figure III.1 :** plumes de calamars

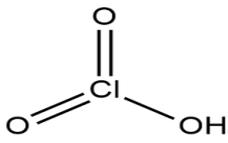
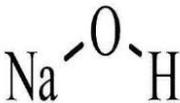
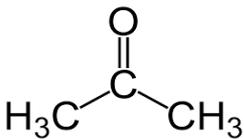
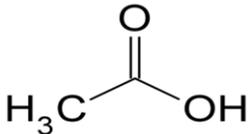
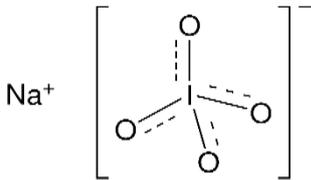
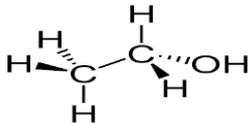
Les plumes collectées ont subi un prétraitement ; elles ont été lavées, mises en ébullition, séchées à l'étuve pendant une nuit, puis broyées à l'aide d'un mortier.

### **III.1.2 Matières premières :**

**Principe actif ; Le chitosane :** c'est un polysaccharide cationique, composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée en  $\beta$ -(1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée).

### **III.1.3 Autres matières utilisées :**

Le **tableau III.1** résume les différentes matières impliquées dans le processus d'extraction du chitosane et la synthèse du chitosane oxydé ainsi que leurs fonctions respectives.

Matières	Structure chimique	Rôle
<p>Acide chlorhydrique</p> <p>HCl</p>	 <p>chloric acid</p>	<p>L'élimination des minéraux et autres impuretés présentes dans les plumes.</p>
<p>Hydroxyde de sodium NaOH</p>		<p>L'élimination des protéines présentes dans les plumes, ainsi dans le processus de désacylation du chitosane</p>
<p>Acétone C3H6O</p>		<p>Dissoudre les impuretés et les résidus de sels, laissant ainsi le chitosane pur.</p>
<p>Acide acétique</p> <p>CH<sub>3</sub>COOH</p>		<p>Solvant pour la dissolution du chitosane, (une dissolution plus rapide par rapport à l'eau ou à d'autres solvants).</p>
<p>L'eau distillée</p> <p>H<sub>2</sub>O</p>		<p>Solvant</p>
<p>Periodate de sodium NaIO<sub>4</sub></p>		<p>Utilisé comme agent réactif analytique.</p>
<p>Ethanol</p> <p>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</p>		<p>Solvant dans le processus d'oxydation, pour préserver la solubilité du chitosane pendant la réaction.</p>

### III.2 Méthodes utilisées :

#### III.2.1 Protocole d'extraction du principe actif (le chitosane)

##### III.2.1.1 Isolation de la chitine

La déminéralisation est effectuée à température ambiante à l'aide dans un bain d'acide chlorhydrique, sous agitation. Un lavage à l'eau distillée a ensuite été effectué jusqu'à neutralité, puis l'échantillon a été séché.

La déprotéinisation a été réalisée par des traitements alcalins avec des solutions d'hydroxyde de sodium à haute température et sous agitation magnétique. Un lavage à l'eau distillée a ensuite été effectué jusqu'à neutralité, puis l'échantillon a été séché.

A ce stade, la chitine isolée des plumes de calmar est parfaitement blanche comme illustré sur la figure ci-dessous :



**Figure III.2:** la poudre de la chitine obtenue (photo original)

La teneur en chitine a été déterminée à partir de la différence de poids entre la matière première et la chitine obtenue après les traitements acide et alcalin.

##### III.2.1.2 Désacétylation de la chitine

La chitine obtenue est ensuite trempée dans une solution d'hydroxyde de sodium sous forte agitation, pendant quelques heures, à une température élevée. Un lavage à l'eau distillée a ensuite été effectué jusqu'à neutralité puis l'échantillon a été séché.

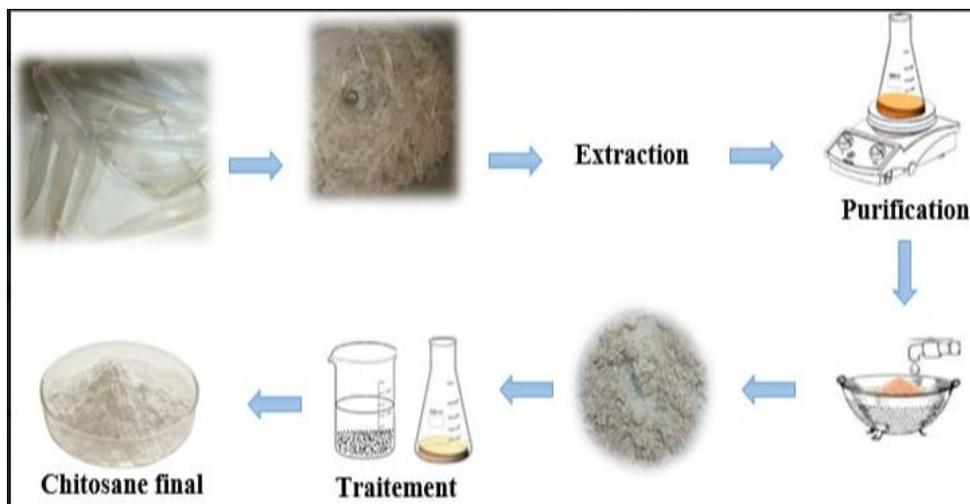
Le chitosane est trempé dans l'acétone pour éliminer toutes impuretés susceptibles d'être présents puis il est séché.



**Figure III.3 :** La poudre du chitosane obtenu (Photo originale)

La teneur en chitosane a été déterminée à partir de la différence de poids entre la chitine et le chitosane obtenue après le traitement alcalin.

Le schéma ci-dessus résume les différentes étapes détaillées auparavant :



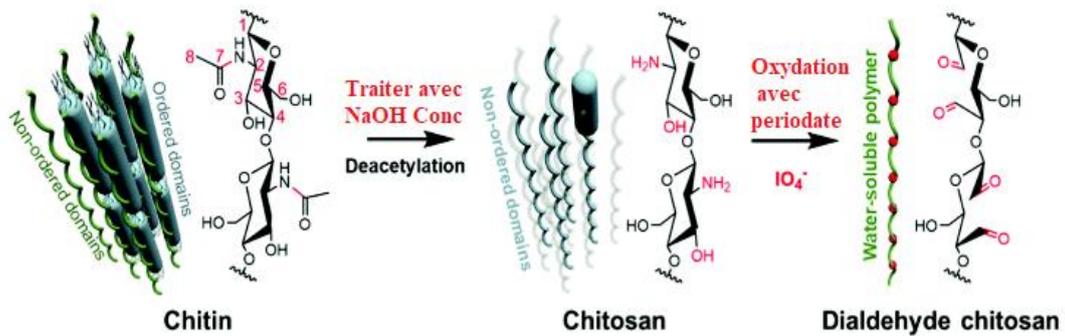
**Figure III.4 :** étapes d'extraction du chitosane

### III.2.2. Protocole de modification par oxydation

Le chitosane oxydé (DCS) a été obtenu en suivant les étapes décrites précédemment dans le littérature [8], mais avec quelques ajustements. Tout d'abord, une certaine quantité de chitosane a été dissoute dans de l'acide acétique à une concentration connue, sous agitation magnétique. Ensuite, la solution de l'agent réactif a été ajoutée goutte à goutte à la solution de chitosane dissous, en veillant à le faire à l'abri de la lumière et à une température bien définie. Après quelques heures, le mélange a été laissé refroidir avant d'être filtré.

Pour précipiter le DCS, un volume d'éthanol a été ajouté sous une agitation vigoureuse.

Le précipité a été récupéré et séché à température ambiante.



**Figure III.5 :** Transformation des groupes fonctionnels de la chitine en chitosane oxydé

### III.2.3. Protocole de formulation des nanogels

Les matières premières et produits chimiques utilisés dans notre partie pratique ont été commercialisés par des fournisseurs agréés. Aucune purification préalable n'a été réalisée.

Le **tableau III.2** énumère les différents produits utilisés :

Matières	Rôle
Chitosane / Chitosane modifié	Principe actif
Acide acétique	Solvant
Eau distillée	Solvant
Amidon	Agent épaississant
Carbopol	Agent gélifiant
Tween 80	Tensioactif
Triéthanolamine	Ajusteur du pH
Propylène glycol	Agent humectant

Le nanogel a été fabriqué en utilisant la méthode de diffusion de solvant en émulsion avec l'ajout d'un agent gélifiant pour former un nanogel. Trois formulations ont été élaborées en suivant le même protocole expérimental, avec la seule différence le principe actif utilisé.

La procédure expérimentale a été basée sur des références bibliographiques [52], [53], avec certaines modifications spécifiques.

### **Etape 1 : La solution du principe actif.**

#### **Pour le chitosane commercial et le chitosane extrait**

Dans un bécher une quantité de chitosane a été dissoute dans l'acide acétique à 1%, et mise sous agitation jusqu'à dissolution complète.

#### **Pour le chitosane modifié**

Dans un bécher une quantité de chitosane modifié a été solubilisée dans de l'eau distillée, et mise sous agitation jusqu'à dissolution complète.

### **Etape 2 : Préparation de la phase aqueuse.**

Le Carbopol est dissous dans de l'eau distillée pour former une solution, qui est ensuite homogénéisée à l'aide d'un ultra-turax jusqu'à obtenir un gel transparent. Sous agitation continue, 2 ml de tween 80 sont ajoutés à la solution.

Une solution d'amidon est incorporée goutte à goutte dans le mélange.

### **Etape 3 : Préparation de la phase organique.**

Le propylène glycol est ajouté progressivement à la solution du principe actif tout en maintenant une agitation constante. Ensuite, la solution est placée dans un bain à ultrasons et soumise à une sonication pendant 10 minutes.

### **Etape 4 : préparation du nanogel**

Dans cette étape, la phase organique est ajoutée goutte à goutte à la phase aqueuse au cours d'une homogénéisation à grande vitesse pendant 30 minutes à 5000 tr/min pour obtenir des nanogouttettes.

### **Etapas 5 :**

Le triéthanolamine est ajoutée avec une agitation continue pour obtenir un nanogel à pH situé entre [4.7 ; 5.75].

### III.2.4. Méthodes de caractérisations du chitosane extrait et modifié

#### III.2.4.1 Analyse spectroscopique FTIR

Les spectres FTIR du Chitosane et le chitosane oxydé préparés ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre FTIR de marque (Schimadzu, série : FTIR-8900, chine) sur une gamme de nombres d'ondes allant de 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Les échantillons analysés ont été préparés sous forme de pastilles de KBr.

#### III.2.4.2 Mesure du degré de désacétylation (DDA)

Les surfaces des pics attribués à 1630  $\text{cm}^{-1}$  pour les groupes amides et à 3446  $\text{cm}^{-1}$  pour les groupes hydroxyles du chitosane ont été mesurées à partir du spectre FTIR du SS-chitosane. Le degré de désacétylation (DD) a été estimé à l'aide de la méthode suivante :

$$\text{DDA} = \left( \frac{100 - (A_{1630} - A_{3446})}{1.33} \right) \times 100 \text{ (Eq III.3.4.4.1)}$$

Avec :  $A_{1655} \text{ cm}^{-1}$  : Absorbance à 1660  $\text{cm}^{-1}$  de la bande d'amide primaire (Amide I).

$A_{3450} \text{ cm}^{-1}$  : Absorbance à 3450  $\text{cm}^{-1}$  de la bande hydroxyle.

Le facteur 1.33 représente ( $A_{1655} \text{ cm}^{-1} / A_{3450} \text{ cm}^{-1}$ ) pour une chitine entièrement N-acétylée.

#### III.2.4.3 Détermination de la solubilité du chitosane extrait et du chitosane modifié

- Chitosane extrait

Cette analyse a été réalisée en dissolvant 200 mg de poudre de chitosane extrait dans de l'eau (200 ml). Le même poids a également été dissous dans 200 ml d'une solution d'acide acétique à 1 %, et une solution d'hydroxyde de sodium NaOH à 1%. La solubilité du chitosane extrait a été déterminée en comparant sa solubilité dans les 3 solvants.

- Chitosane modifié

Cette analyse a été réalisée en dissolvant 200 mg de poudre de chitosane modifié dans de l'eau (200 ml). Le même poids a également été dissous dans 200 ml d'une solution d'acide

acétique à 1 %, une solution d'hydroxyde de sodium NaOH à 1%, et dans de l'éthanol. La solubilité du chitosane extrait a été déterminée en comparant sa solubilité dans les différents solvants [51].

### III.2.4.4 Mesure du potentiel zêta du chitosane extrait et modifié

Pour déterminer la charge électrique des particules de  $\beta$ -Chitosane extrait et du  $\beta$ -chitosane oxydé dans une solution, 35 mg de  $\beta$ -Chitosane extrait /  $\beta$ - Chitosane oxydé ont été dissous dans 15 ml d'acide acétique à 1% pour le chitosane extrait et modifié.

Un volume de chaque solution a été injecté dans une cellule (Glod-Plating, 6 mm), qui est placée dans le SZ-100 (HORIBA-SCIENTIFIC) pour lancer la mesure.

### III.2.4.5 Degré d'oxydation DCA

La teneur en unités de chitosane contenant les groupes dialdéhydes a été calculée à partir de l'équation [8] :

$$ALD\% = \frac{C1 \cdot V2 - C2 \cdot V1}{m/M} \quad (\text{Eq III.3.4.8.1})$$

Où : C1 (mol/L) et V1 (L) sont la concentration et le volume de la solution de NaOH,

C2 (mol/L) et V2 (L) sont la concentration et le volume de la solution de HCl, respectivement ; m-masse de l'échantillon (g), M-poids moléculaire de l'unité répétée dans le chitosane dialdéhyde.

### III.2.4.6 Evaluation de l'activité antioxydante :

#### Capacité de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) des radicaux.

L'activité antioxydante du  $\beta$ -Chitosane extrait et celle du  $\beta$ -chitosane modifié a été évaluée en utilisant la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Ce dernier est un radical libre largement utilisé pour évaluer la capacité d'un composé à neutraliser les radicaux libres et à agir comme un antioxydant [7], [25].

Le principe de cette méthode repose sur la couleur du DPPH un composé violet foncé qui devient jaune lorsqu'il est réduit par un antioxydant efficace. L'intensité de la décoloration est directement liée à l'activité antioxydante du composé testé.

Pour évaluer l'activité antioxydante du  $\beta$ -Chitosane extrait par la méthode du DPPH, on a procédé comme suit :

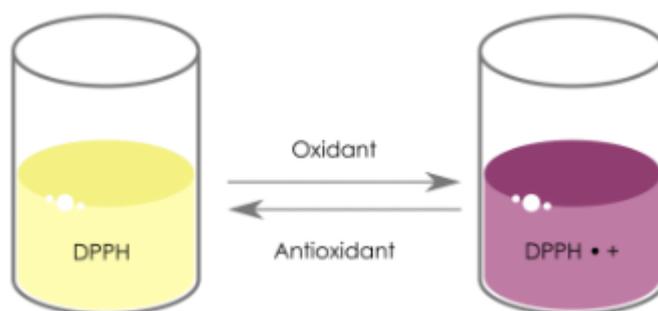
1. Une quantité de  $\beta$ -Chitosane extraite est dissoute dans un mélange d'acide acétique à 1% et d'éthanol, formant ainsi une solution mère avec une concentration initiale, une série de dilutions réalisées à partir de la concentration initiale.

2. La solution de DPPH est préparée par la dissolution d'une masse définie de DPPH dans un volume approprié d'éthanol.

3. Des volumes de solution de  $\beta$ -Chitosane extraite et de DPPH ont été mélangés et incubés dans l'obscurité pendant minimum 30 min.

4. La diminution de l'absorbance ou la décoloration du mélange est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à  $\lambda = 517 \text{ nm}$

Une diminution de l'absorbance ou une décoloration plus importante du mélange contenant le  $\beta$ -Chitosane indiquerait une activité antioxydante plus élevée. Les résultats peuvent être exprimés en termes de pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par rapport au contrôle négatif.



**Figure III.6 :** Capacité antioxydante par coloration

L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été évaluée et calculée via l'équation suivante [14], [25] :

$$I\% = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \text{ (Eq III.3.4.7.1)}$$

Abs Control : 2ml DPPH + 1ml (Ethanol + Acide acétique 1%),

Abs Sample : Echantillon

### III.2.4.7 Evaluation de l'activité antimicrobienne

**Les propriétés antibactériennes des deux molécules ainsi que des trois gels ont été examinées pour déterminer leur efficacité contre les infections bactériennes :**

Cette étude a été réalisée par la méthode de diffusion en puits AWDT (Agar Well Diffusion Test).

**Les souches bactériennes utilisées :**

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Mme Professeur Laribi). Les bactéries ont été réactivées en bouillon Nutritif (BN), et incubées à 37°C pendant 24 H pour s'assurer de leurs puretés.

- **Les champignons utilisés :** *Aspergillus Niger*
- **Le renouvellement et l'enrichissement des souches**

Le renouvellement et l'enrichissement a été effectué par ensemencement des souches dans le BN à 37°C pendant 18 heures d'incubation pour obtenir une culture jeune

- **Méthode de diffusion en puits (AWDT)**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu Mueller-Hinton (MH) semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester.

Dans Cette méthode l'écoulement des boites des pétris par le milieu MH semi solide a été réalisé, après solidification on 'a étalé les souches bactériennes, après un repos de 5 min des puits de 6mm de diamètre ont été réalisés sur les boites de pétri à l'aide des pipettes pasteurs stériles. Une quantité du gel de chitosane extrait, des 3 gels formulé et du chitosane oxydé Ont été déposés dans les puits après diffusion pendant 2 à 3 h a températures du labo, les boites ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 -48 h [69] [70] [71].

### III.2.5 Méthodes de caractérisations des nanogels

Afin de mettre en évidence les propriétés organoleptiques, physico-chimiques et rhéologiques, une étude de caractérisation a été réalisée :

#### III.2.5.1 Evaluation des paramètres organoleptiques

Le nanogel a été soumis à une analyse visuelle comprenant l'observation de sa couleur, son aspect, son odeur, son apparence et la présence éventuelle d'agrégats. Ces caractéristiques ont été examinées attentivement afin de déterminer l'apparence générale et la qualité du nanogel.

#### III.2.5.2 Mesures du pH

Le pH de la formulation a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Pour ce faire, 1 g de gel a été dissous dans 100 ml d'eau distillée et la solution a été conservée pendant 2 heures. L'objectif était de déterminer si le pH du gel se rapprochait du pH normal de la peau, afin d'éviter toute irritation potentielle [54].

Le maintien d'un pH approprié est essentiel pour assurer la compatibilité cutanée du gel.

#### III.2.5.3 Mesure du potentiel Zêta

Le potentiel zêta de la formulation choisie a été évalué à l'aide de la technique de Diffusion de la Lumière Dynamique (DLS), utilisant l'appareil illustré dans la figure **III.4.5**.

Cette mesure du potentiel zêta permet de prédire et de contrôler la stabilité de la dispersion des nanogels. Des valeurs élevées du potentiel zêta indiquent une dispersion plus stable.

Les échantillons de solution du gel dilué ont été placés dans une cellule de type GOLD PLATING de 6 mm, Toutes les mesures ont été effectuées à 25 °C [58] – [60].

### III.2.5.4 La taille des particules

La taille des particules du nanogel préparé a été évaluée à l'aide de la spectroscopie de corrélation de photons (PCS) utilisant un zétasizer (Ver. 6.20 Malvern Instruments Ltd.). Cette technique analyse les fluctuations de la diffusion de la lumière résultant du mouvement Brownien des gouttelettes du nanogel.

Pour effectuer cette mesure, une solution diluée du gel a été soigneusement préparée sous agitation vigoureuse et la diffusion de la lumière a été mesurée à 25°C sous un angle de 90°C [58] – [60].



**Figure III.8** Appareil de Diffraction dynamique de la lumière SZ-100 (HORIBA-SCIENTIFIC).

### III.2.5.5 Etude de la capacité d'étalement

La capacité d'étalement est une caractéristique essentielle d'un nanogel destiné à une application transdermique. Elle se réfère à la capacité du gel à s'étendre facilement sur une zone étendue lorsqu'il est appliqué sur la peau ou sur la zone affectée. Cette capacité d'étalement joue un rôle crucial dans l'efficacité thérapeutique de la formulation [61].

Pour évaluer la capacité d'étalement du gel, on mesure le diamètre d'étalement du gel (0.5 g) entre deux plaques horizontales de dimensions 20 cm × 20 cm après une minute de temps. Différents poids standards, variant entre 20 et 500 g, sont appliqués sur la plaque supérieure pour déterminer la capacité d'étalement. Le diamètre du cercle étalé est mesuré en centimètres, et le résultat final est obtenu en prenant la moyenne de trois déterminations.

### III.2.5.6 Etude du comportement rhéologique

Les propriétés rhéologiques des nanogels formulés ont été étudiées à l'aide d'un rhéomètre Brookfield à une température ambiante de  $25 \pm 1$  °C. Les mesures ont été réalisées à trois taux de cisaillement différents (en tours par minute) et la viscosité a été exprimée en milli pascal-seconde (mPa·s) [58], [62], [59], [60].

- **Détermination de la viscosité**

Pour ce faire, une certaine quantité de nanogel a été placée dans l'appareil et soumise à une rotation à une vitesse constante de 2,5 tr/min [55] – [57].

La viscosité a été déterminée en observant la lecture sur le cadran gradué de l'appareil. Cette mesure de viscosité permet d'évaluer la consistance et la fluidité des nanogels.

### III.2.5.7 Taux d'encapsulation

#### A. Chitosane commercial et chitosane extrait

Une quantité de nanogel a été dissoute dans 10 ml d'une solution d'acide acétique à 1% et centrifugée à 5 000 rpm pendant 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Eppendorf). Ensuite, 1 ml du surnageant a été prélevé. La solution surnageante diluée a été analysée à une longueur d'onde de 210 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Shimadzu 1800), par rapport à un blanc contenant une solution d'acide acétique à 1% [59], [63].

#### B. Chitosane oxydé

Une quantité de nanogel a été dissoute dans 10 ml d'eau distillée, et centrifugée à 5 000 rpm pendant 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Eppendorf). Ensuite, 1 ml du surnageant a été prélevé. La solution surnageante diluée a été analysée à une longueur d'onde de 199 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Shimadzu 1800), par rapport à un blanc contenant de l'eau distillée.

La quantité de principe actif présente dans le nanogel a été déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage standard préalablement établie pour le chitosane et le chitosane oxydé dans de l'acide acétique et de l'eau respectivement. Les taux d'encapsulation ont été calculés en utilisant l'équation de la droite de la courbe standard pour l'absorbance observée, en utilisant la formule suivante :

$$TE\% = \frac{\text{Concentration du sernageant}}{\text{Concentration initiale}} \times 100 \quad (\text{Eq III.3.4.8})$$

TE : Taux d'Encapsulation.

### III.2.5.8 Test d'adhérence

Le test du pouvoir collant est effectué en attachant 1 gramme de nanogel sur une plaque en verre avec une autre plaque en verre.

Le nanogel est appliquée entre les deux plaques, puis pressée avec une charge de 1 kg pendant 5 minutes. Après ce temps, la charge est relâchée et l'heure à laquelle les deux plaques sont relâchées est enregistrée [64].

## **Chapitre IV**

## IV. Introduction

Ce chapitre regroupe les différents résultats obtenus dans la présente étude et qui s'articulent sur les points suivants :

1. Caractérisation de la chitine, le chitosane extrait et le chitosane modifié.
2. Discussion des résultats de l'analyse structurale des molécules (extrait et modifié).
3. Caractérisation par des méthodes physico-chimiques et détermination des caractéristiques organoleptiques et rhéologiques des nanogels.
4. Etude de la stabilité par mesures des tailles et potentiels zêta.
5. Etude de l'activité microbiologique.

### IV.1 Rendement de l'extraction

#### IV.1.1 La chitine

L'extraction chimique de chitine consiste en 2 étapes principales : déminéralisation, et dé-protéinisation. Le rendement massique après l'extraction de chitine est égal 63.5%.

#### IV.1.2 Le chitosane

L'étape suivante consiste à effectuer la désacétylation de la chitine préparée. Pour ce faire, la chitine est traitée avec une solution basique de NaOH. Après cette réaction, on obtient du chitosane qui présente une légère coloration jaunâtre. Le rendement massique obtenu suite à la désacétylation est de 55,3%.

### IV.2 Identification de la chitine et du chitosane

#### IV.2.1 La chitine

La chitine est caractérisée par une bande large ayant deux sommets. Le premier obtenu à **3447 cm<sup>-1</sup>** est attribué aux vibrations d'allongement des groupements **hydroxyles (OH)**.

Le second à **3266 cm<sup>-1</sup>** est attribué aux vibrations d'allongement des groupements **amines (NH)**.

La bande caractéristique de la chitine à  $1658\text{ cm}^{-1}$ , représentant le contenu en groupement acétyle, est attribuée aux vibrations de déformation de C=O. (Paulino et al., 2006).

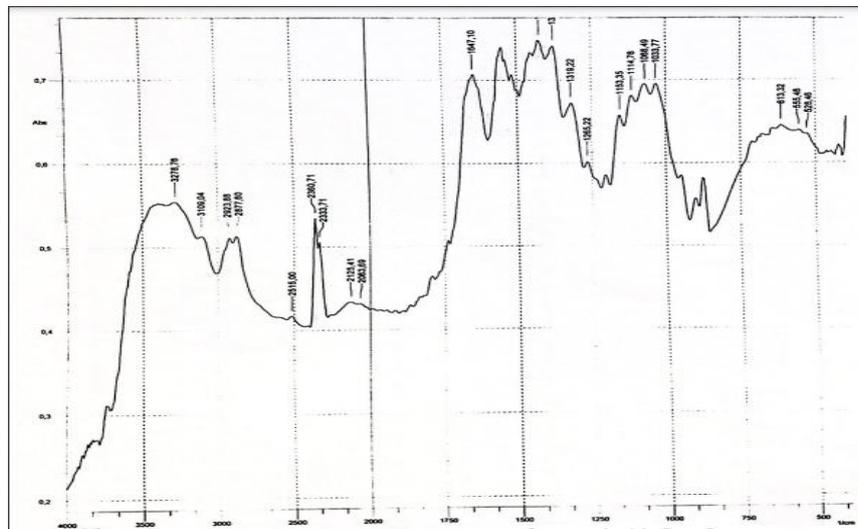
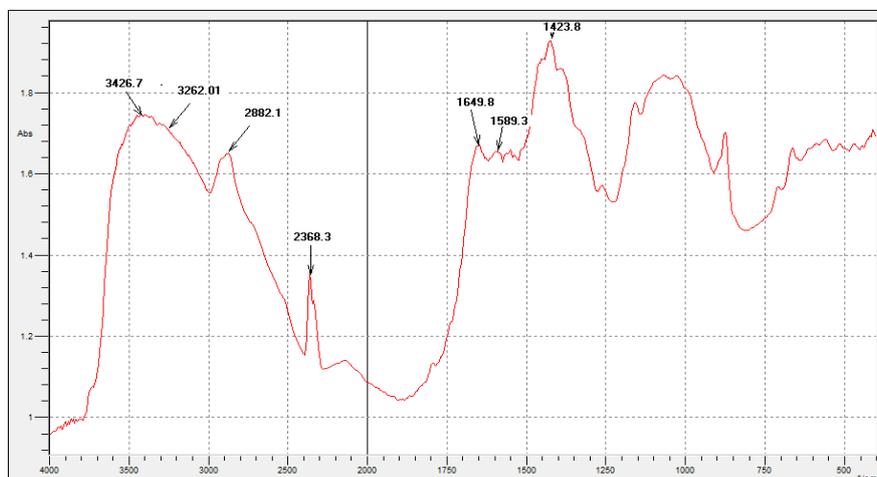


Figure IV.1 : Spectre infrarouge de la chitine

#### IV.2.2 Le chitosane

Selon les données de la littérature et en se référant au spectre du chitosane obtenu, tel que représenté dans la figure IV.2.2, les pics de CS à  $3359$  et  $3282\text{ cm}^{-1}$  sont liés à l'étirement O-H et N-H, respectivement. Les bandes apparues à  $1589$  et  $1647\text{ cm}^{-1}$  étant associées à la vibration d'étirement C-O, à la flexion N-H de l'amide secondaire et à l'étirement C--O des groupes amides, respectivement

La désacétylation effective de la chitine est traduite par le déplacement de la bande amide. Il est présent à  $1552\text{ cm}^{-1}$  dans la chitine vers  $1589\text{ cm}^{-1}$  dans le chitosane, où cette bande est moins intense.



**Figure IV.2** : Spectre infrarouge du chitosane

### **IV.3 Détermination du degré de désacétylation**

La spectroscopie infrarouge est la technique la plus utilisée pour la détermination du degré de désacétylation. Elle est peu coûteuse et rapide. Elle a l'avantage de permettre l'analyse de l'échantillon à l'état solide.[70]

Les absorbances aux fréquences théoriques 1655  $\text{cm}^{-1}$  et 3450  $\text{cm}^{-1}$  sont responsables de la détermination du degré de désacétylation. Le rapport d'absorbance ( $A_{1655}/A_{3450}$ ) donne de meilleurs résultats pour les DDA compris entre 0 et 97 %

Les fréquences obtenues (1647  $\text{cm}^{-1}$  pour le groupe carbonyle représenté par l'amide I et 3447  $\text{cm}^{-1}$  pour le groupe hydroxyle) sont proches de celles théoriques. En se basant sur les valeurs d'absorbance de nos deux bandes, l'équation (III.4.1) nous a permis d'obtenir un degré de désacétylation de 80 %.

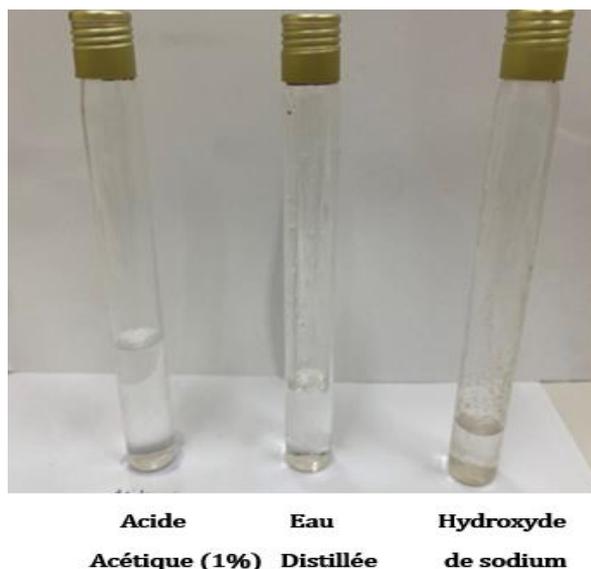
### **IV.4 Détermination de la solubilité**

#### **IV.4.1 Solubilité du chitosane extrait**

Au cours de cette étude, nous avons choisi l'acide acétique (AcOH) à 1% comme solvant pour dissoudre le chitosane dans un milieu légèrement acide, l'eau distillée pour le milieu neutre, et l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1%, pour le milieu basique.

Lorsque la poudre de chitosane est introduite dans une solution d'acide acétique à 1%, elle se dissout entièrement, formant une solution claire et légèrement visqueuse. Cette dissolution complète est attribuée à l'interaction entre les groupes amines du chitosane qui subissent une protonation en un milieu acide, et favorise la solubilité du polymère [71].

En revanche, dans les milieux neutre et basique, la poudre de chitosane ne se dissout pas. Cela est dû à la nature hydrophobe du chitosane, qui le rend insoluble dans les solvants polaires tels que l'eau à pH neutre ou basique. Les liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires présentes dans la structure du chitosane favorisant l'agrégation des molécules, ce qui limite sa solubilité dans ces conditions [72].



**Figure IV.3 :** Test de solubilité du chitosane extrait

#### **IV.4.2 Solubilité du chitosane modifié**

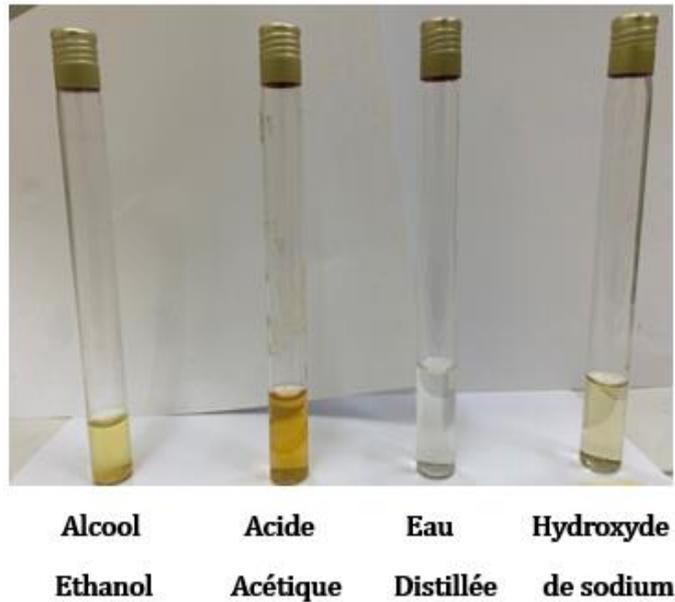
Le chitosane oxydé présente les caractéristiques suivantes en termes de solubilité dans différents solvants et qui peut être expliquée en considérant les interactions entre les groupes fonctionnels du chitosane oxydé (l'aldéhyde) et les molécules du solvant :

Dans le cas de l'eau, le chitosane oxydé présente une bonne solubilité en raison de la formation de liaisons hydrogène entre les groupes fonctionnels aldéhyde (polaires) et les molécules d'eau. Tout en restant transparents.

Dans l'acide acétique, la solubilité du chitosane oxydé est également favorisée par les interactions avec les groupes acétyle de l'acide acétique, en formant des liaisons hydrogène avec les groupements aldéhydes du chitosane modifié. On remarque une couleur jaune

L'hydroxyde de sodium (NaOH) est une base forte et réagit avec les groupes aldéhydes du chitosane oxydé. Cette réaction peut entraîner la formation de sels de sodium, qui sont solubles dans l'eau.

En revanche, l'éthanol est un solvant organique qui présente des propriétés différentes de l'eau et de l'acide acétique. Les groupes aldéhydes du chitosane oxydé ont une affinité moindre pour l'éthanol, ce qui rend le chitosane oxydé insoluble dans ce solvant. On remarque une couleur jaunâtre.

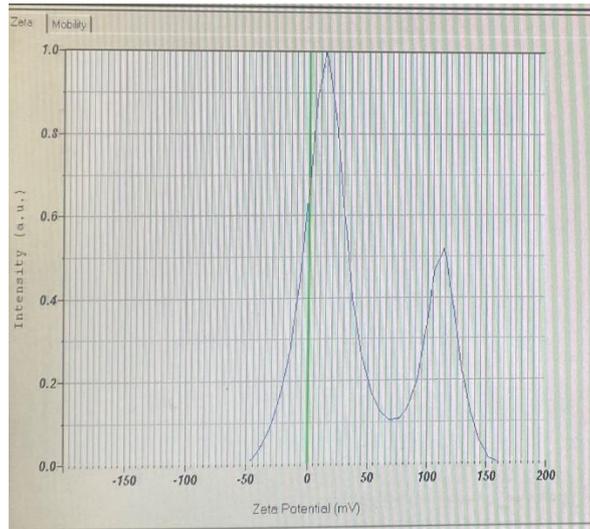


**Figure IV.4 :** Test de solubilité du chitosane modifié

#### **IV.5 Mesure du potentiel zêta**

L'effet de charge de surface des particules de  $\beta$ -Chitosane extrait a été évalué à l'aide de la mesure du potentiel zêta. La figure (IV.4) présente un pic représentatif du potentiel zêta du  $\beta$ -Chitosane extrait. Les résultats de cette étude confirment le caractère cationique du  $\beta$ -Chitosane extrait, ce qui signifie que les particules de chitosane présentent une charge positive à leur surface, la valeur du potentiel zêta est de 49.8mV.

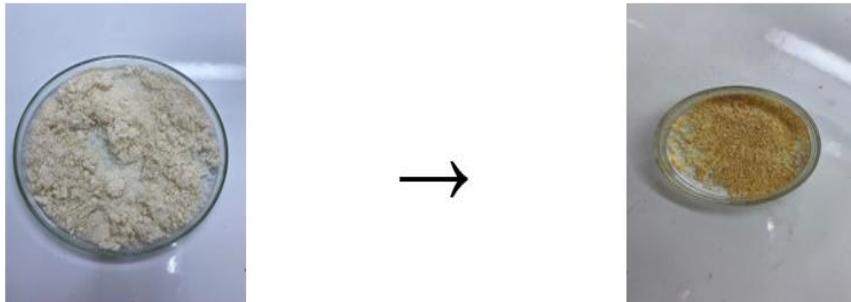
Cette charge positive peut avoir des implications importantes sur les interactions des deux Chitosane avec d'autres composés ou systèmes. Par exemple, en raison de sa charge positive, l'effet antibactérien du  $\beta$ -Chitosane a été rapporté en raison de la forte densité des groupes aminés  $-NH_3^+$  qui confèrent une charge positive au polymère, Elle est attribuée à la formation de complexes polyélectrolytiques avec les peptidoglycanes négatifs de la paroi cellulaire bactérienne. Cette interaction peut perturber les parois cellulaires et inhiber la croissance bactérienne. Il a également été démontré qu'une charge positive des particules est souhaitable pour empêcher l'agrégation des particules et pour promouvoir l'interaction électrostatique avec la charge négative globale des cellules microbiennes ; Le  $\beta$ -chitosane interagit avec la membrane cellulaire pour modifier sa perméabilité, empêchant ainsi l'entrée de certains nutriments[4], [69].



**Figure IV.5 :** Mesure du potentiel zêta du  $\beta$ -Chitosane extrait

#### IV.6 Degré d'oxydation DCA

Le degré d'oxydation, exprimé par le rendement de la préparation du chitosane oxydé à partir du chitosane extrait, a été de 56%. Le polymère obtenu conserve des propriétés visuelles similaires à celles du chitosane extrait, à l'exception de sa couleur qui est jaune, comme le montre l'illustration figurant ci-dessous.



**Figure IV.6 :** Comparaison de l'aspect visuel entre le chitosane extrait et le chitosane oxydé.

#### IV.7 Analyse spectroscopique par FTIR

Dans le spectre du DCS, présenté ci-dessous, un nouveau pic net à 1629  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) a été formé, qui était lié aux groupes aldéhydes, confirmant l'oxydation du CS (Wu et al.,

2018). En outre, les bandes à 3426 et 3262  $\text{cm}^{-1}$  se sont déplacées à 3395 et 3250  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement, bénéficiant de l'ouverture de la structure cyclique du chitosane. Les intensités des pics dans la plage de 1453-1260  $\text{cm}^{-1}$  (étirement C-O-C) et 1060-990  $\text{cm}^{-1}$  étaient inférieures à celles du CS, indiquant des changements significatifs des anneaux glucosidiques résultant de l'ouverture et de l'oxydation de C2 et C3 dans les molécules de CS[51], [11], [8].

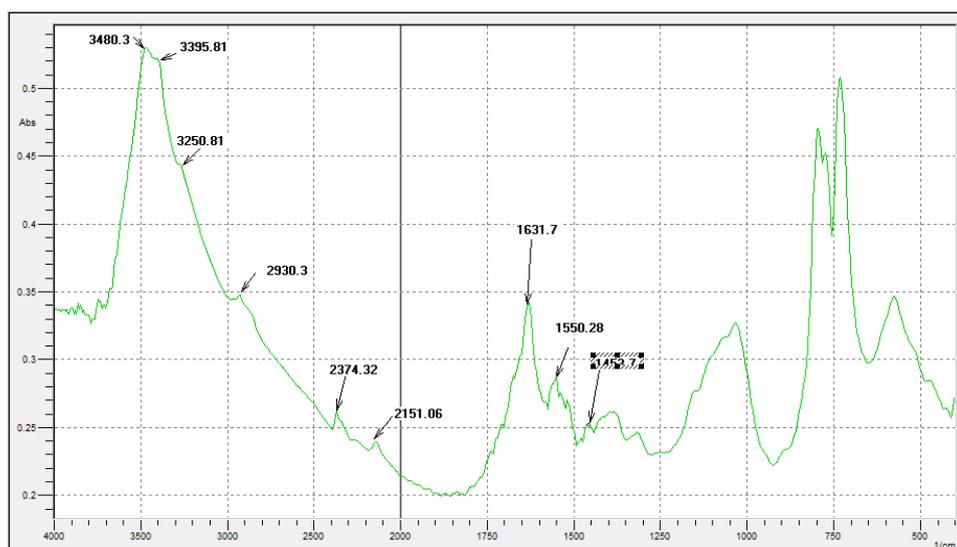


Figure IV.7 : spectre infrarouge du chitosane oxydé

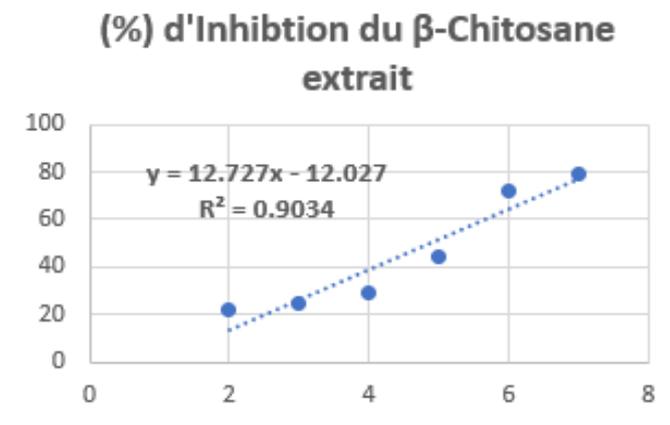
## IV.8 Activité antioxydante

### IV.8.1 Chitosane extrait

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité du  $\beta$ -Chitosane extrait des plumes de calmars à piéger les radicaux libres DPPH à différentes concentrations (2 à 7  $\text{mg/ml}$ ).

Comme illustré sur la figure IV.6.1, les résultats ont démontré que le  $\beta$ -Chitosane présente une activité antioxydante significative contre le radical DPPH, indépendamment de sa concentration. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH était supérieur à 70% à une concentration de 6  $\text{mg/ml}$  pour le  $\beta$ -Chitosane.

Ces résultats indiquent que le  $\beta$ -Chitosane extrait possède une activité antioxydante, ce qui explique ses effets bénéfiques sur la santé en termes d'antioxydants et d'activité antibactérienne.



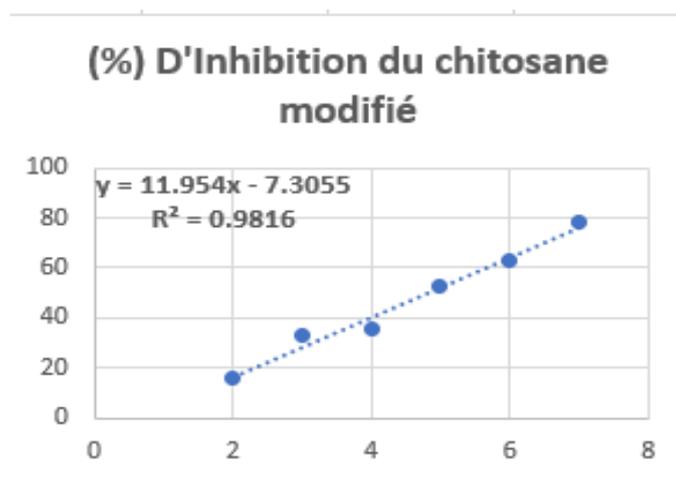
**Figure IV.8 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par le  $\beta$ -Chitosane extrait

#### IV.8.2 Chitosane modifié

D'après les résultats illustrés dans la figure IV.6.2, on remarque que le  $\beta$ -chitosane modifié garde son activité antioxydante importante contre le DPPH, indépendamment de sa concentration.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est supérieur à 70% à une concentration de 7 mg/ml pour le  $\beta$ -Chitosane modifié.

Ces résultats indiquent que le  $\beta$ -Chitosane modifié possède une activité antioxydante,



**IV.9 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par le  $\beta$ -Chitosane modifié

On a obtenu des  $I_{50}$  de 2.98 et de 3.12 pour les deux chitosane extrait et oxydé respectivement.

### IV.9 Activité antimicrobienne

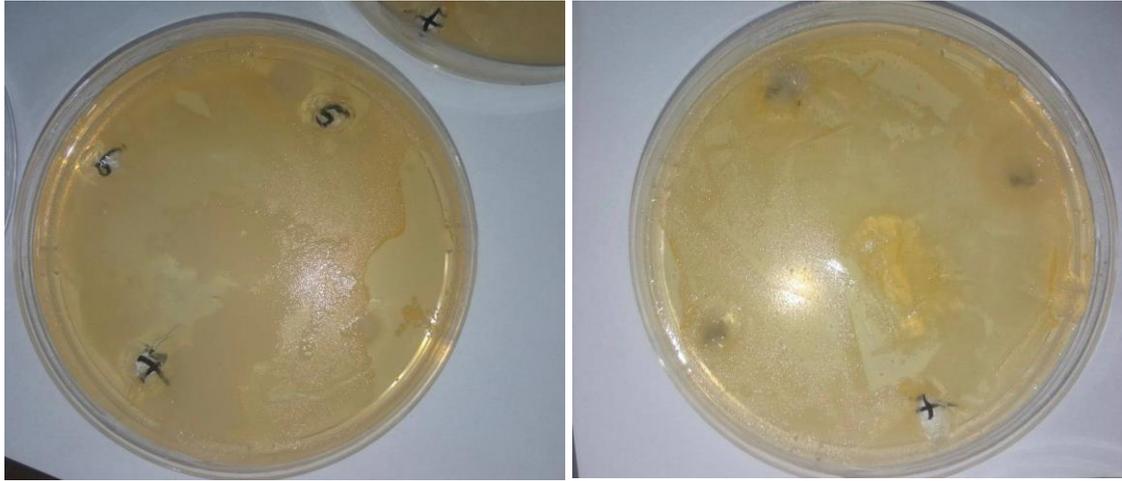
#### Pouvoir antibactérien du gel de chitosane, chitosane oxydé et les 3 formulations par méthode des puits AWDT

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien et antifongique du chitosane, par la méthode de diffusion en puits. Pour cela un milieu gélosé (MH) est utilisé pour le test. L'activité antibactérienne du chitosane est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits, contenant le gel du chitosane, les 3 gels formulés et le chitosane modifié à tester vis-à-vis de 4 germes, *Escherichia coli* (Gram -) et *staphylococcus aureus* (Gram+), *pseudomonas aeruginosa* (**Gram-**) et *Bacillus sp* (Gram+).

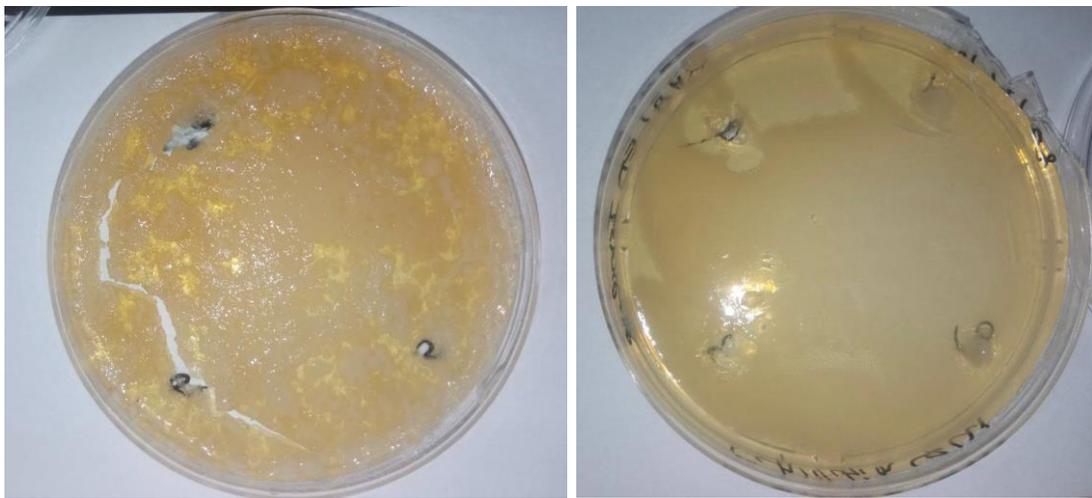
**Tableau IV.1** : diamètre d'inhibition des souches en fonction des antibactériens utilisés

Souches microbiennes	Formulation à base de Chitosane oxydé	Formulation à base de Chitosane extrait	Formulation à base de Chitosane commercial	Gel de chitosane à 1%	Gel de chitosane à 0.5 %	Chitosane oxydé à 0.1%	Chitosane oxydé à 0.5 %
Activité bactérienne				mesure de la zone D'inhibition (mm)			
<i>E coli</i>	Bonne	Présence $\geq$	Faible	32	5	Faible	20
<i>Staphylococcus auréus</i>	Bonne	Présence	Présence	20	8	8	30
<i>Bacillus sp</i>	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	4	6
<i>Pseudomonas aéroginsosa</i>	Faible	Présence	Faible	8	Faible	Faible	Faible
Activité antifongique							
<i>Aspergillus Niger</i>	Bonne	Bonne	Présence	$\geq 40$	Présence	Faible	$\geq 40$

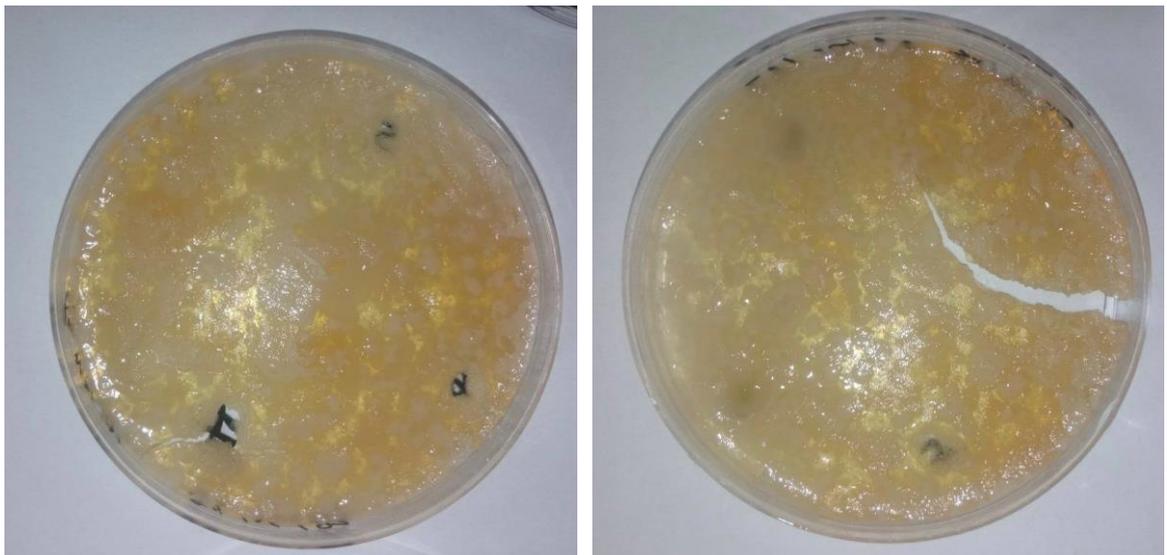
Les figures ci-dessous regroupent les résultats des tests microbiologiques de nos candidats antibactériens.



*Staphylococcus aureus*



*E coli*

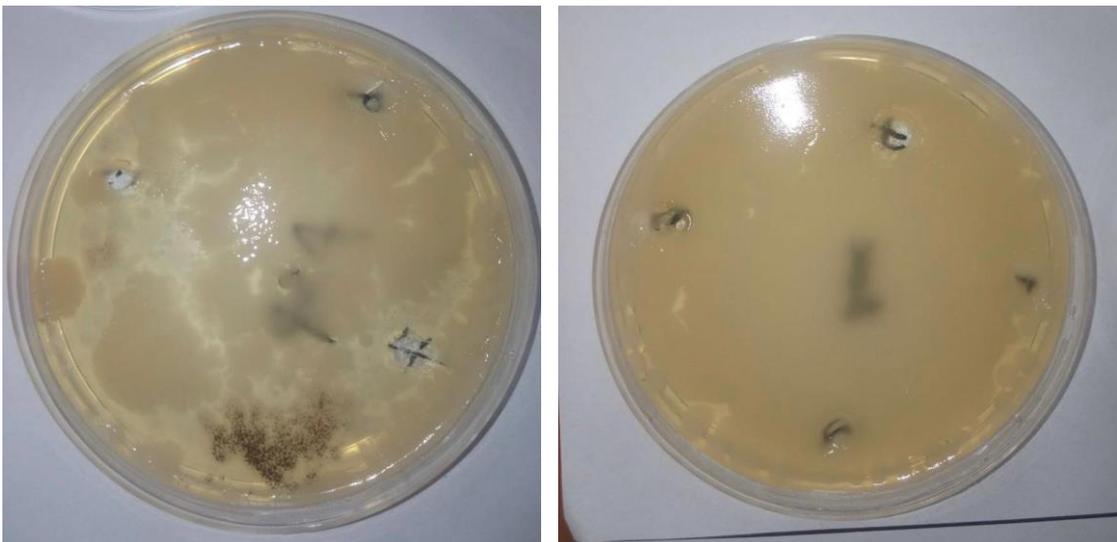


*Bacillus sp*



*Pseudomonas aëroginosa*

**Figure IV.10 :** Résultats du pouvoir antibactérien contre les bactéries



*Aspergillus Niger*

**Figure IV.11 :** Résultats du pouvoir antibactérien contre les champignons

Les puits 1,2,3 respectivement sont aux gels formulés par chitosane oxydé, chitosane extrait, et chitosane commercial.

Les puits 4 et 5 sont ceux du gel de chitosane a 1% et 0.5% , respectivement.

Et les puits 6 et 7 sont ceux de la solution de chitosane oxydé à 0.1% et 0.5%, respectivement

Les résultats obtenus dans ce test ont confirmé la sensibilité accrue des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif à l'action du chitosane, ce qui est cohérent avec

les résultats précédemment rapportés dans la littérature scientifique [76], [70] [75], [77], [78]. De manière intéressante, une amélioration de la sensibilité du chitosane oxydé envers les bactéries à Gram négatif par rapport au chitosane extrait a été observée, tout en conservant sa sensibilité aux bactéries à Gram positif. Ces observations suggèrent que l'oxydation du chitosane pourrait renforcer son activité antibactérienne, confirment ce qui a été dit dans le littérature [52], [11], [79], notamment contre les bactéries à Gram négatif.

De plus, il est important de souligner que la concentration optimale de chitosane n'a pas encore été déterminée dans cette étude. Par conséquent, il convient de poursuivre les recherches en testant différentes concentrations et en évaluant l'activité antibactérienne sur d'autres types de bactéries. Cette approche permettrait de mieux comprendre les effets du chitosane et d'optimiser son utilisation comme agent antimicrobien.

Ces résultats encourageants obtenus, notamment la présence d'activité antimicrobienne dans le gel formulé avec le chitosane oxydé par rapport aux autres gels, soulignent le potentiel de l'oxydation du chitosane pour améliorer ses propriétés antibactériennes. Cela ouvre la voie à de futures études visant à évaluer l'efficacité du chitosane oxydé sur une plus large gamme de microorganismes pathogènes. De telles investigations approfondies permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'action du chitosane oxydé et d'exploiter pleinement son potentiel dans le développement de produits antimicrobiens efficaces [80].

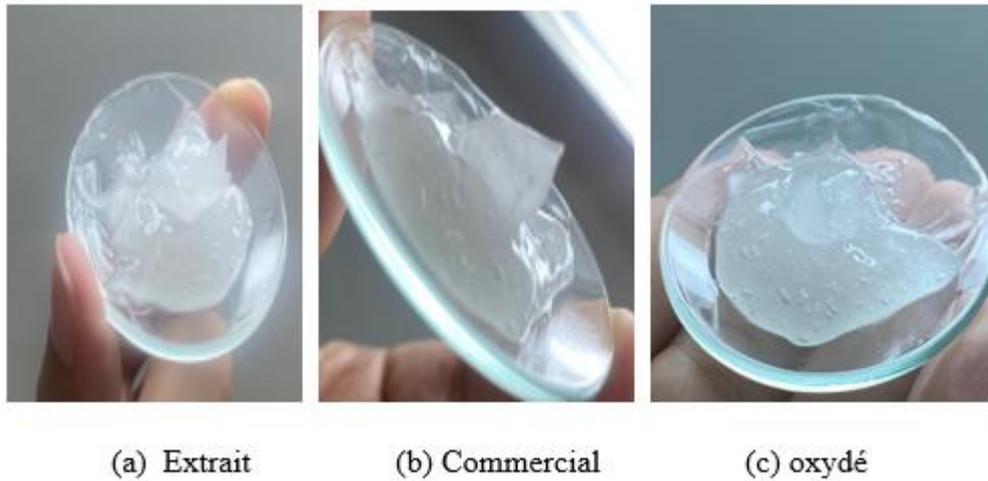
Il convient de noter que l'activité antibactérienne du chitosane est influencée par divers facteurs tels que l'origine biologique du chitosane, le degré de désacétylation, le poids moléculaire, ainsi que les conditions environnementales et la structure chimique spécifique du chitosane utilisé. Par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des propriétés fonctionnelles du chitosane et de son mode d'action contre les microorganismes ciblés.

#### **IV.10 Etude macroscopique**

L'observation de l'aspect a été réalisée par inspection des changements de forme, de couleur et d'odeur des préparations [80], après 24h de la préparation et après 1 mois.

##### **Après 24h**

1. Les formulations obtenues sont transparentes, dépourvues de coloration.
2. Les trois préparations ne présentent aucune odeur.
3. Les formulations ont une consistance épaisse et gélifiée, avec des textures identiques pour les deux gels de chitosane extrait et commercial, mais moins légère par rapport à celle du chitosane oxydé, qui peut s'expliquer par sa nature liquide.
4. Les différentes préparations étaient homogènes, aucun agrégat ni précipité n'a été observé, comme le montre la figure ci-dessous :



**Figure IV.12 :** Aspects des trois nanogels après 24h

### Après 1 mois

Après 1 mois de conservation, on a soulevé les remarques suivantes :

1. Les textures des nanogels ont été maintenues, comme le montre la figure ci-dessous.
2. Aucun agrégat, précipité ou séparation n'a été observé pour les trois formulations, leur aspect est resté homogène.



(a) Oxydé

(b) Extrait

(c) Commercial

**Figure IV.13 :** Aspects des trois nanogels après un mois de stockage

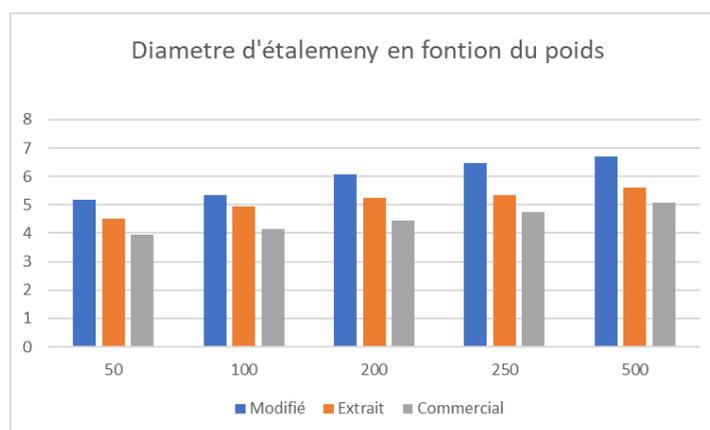
### IV.11 Mesure du pH

La mesure du pH est essentielle car elle peut avoir des répercussions tant sur les aspects technologiques que thérapeutiques d'une préparation cutanée, et ainsi influencer la stabilité physique des formulations. La peau a une tolérance au pH comprise entre 4,5 et 6.7 [63] [71].

Les résultats de l'analyse du pH indiquent que toutes les formulations ont un pH égal à 7. Cela signifie que les formulations ne respectent pas la plage de tolérance du pH requise. Cependant, étant donné que le pH est neutre, elles sont considérées comme sûres à utiliser [64].

### IV.12 Etude de la capacité d'étalement

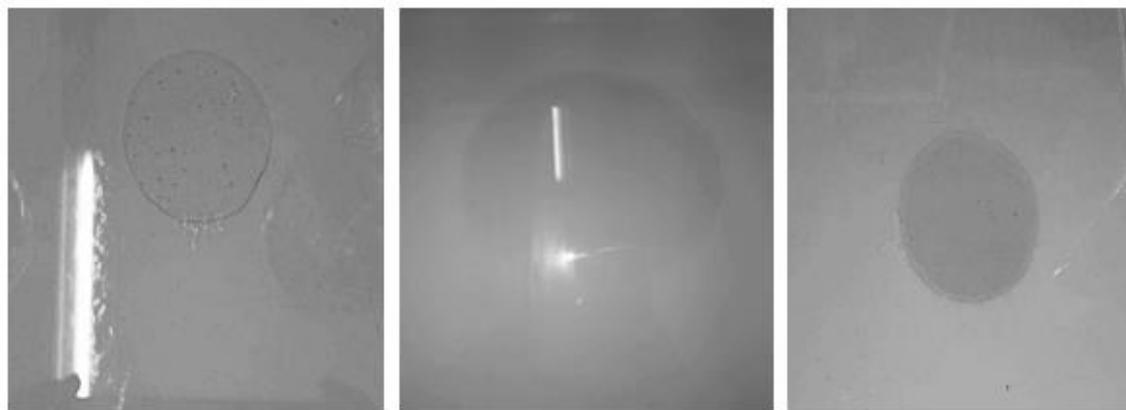
Les résultats obtenus après la réalisation du test d'étalement sont représentés par l'histogramme ci-dessous :



**Figure IV.14 :** Histogramme des diamètres d'étalement des trois nanogels en fonction du poids

Le test d'étalement a été réalisé pour évaluer la capacité de la préparation à se propager uniformément sur la peau, ce qui est essentiel pour une administration efficace des ingrédients médicinaux [73]. Les exigences en matière d'étalement satisfaisant pour les préparations topiques se situent généralement entre 5 et 7 cm (Sari et al.). Nous constatons que nos résultats sont conformes à ces exigences, avec les trois formulations présentant une distance d'étalement comprise entre 4 et 6,7 cm [61].

La figure suivante illustre les diamètres d'étalement des trois nanogels



(a) Gel à base de chito commercial (b) gel à base de chito d'oxydé (c) gel à base de chito extrait

**Figure IV.15 :** Les tests d'étalement pour les trois nanogels

### IV.13 Taille des particules

L'analyse par diffusion de la lumière est une technique permettant de caractériser la distribution granulométrique des échantillons. Dans notre étude, nous avons utilisé un analyseur de nanoparticules laser (Horiba scientific SZ-100) pour déterminer la taille des particules, comme mentionné précédemment. La figure suivante présente les résultats obtenus en termes de diamètres des particules.

**Tableau IV.2 :** taille des particules dans le nanogel de chitosane commercial

Semaine	01	02	03
Taille (nm)	510.4	281.9	305

**Tableau IV.3 :** taille des particules dans le nanogel de chitosane extrait

Semaine	01	02	03
Taille (nm)	273.7	134	163.1

**Tableau IV.4 :** taille des particules dans le nanogel de chitosane oxydé

Semaine	01	02	03
Taille (nm)	415.9	128.0	225

L'analyse des résultats obtenus en termes de tailles de particules a mis en évidence une répartition granulométrique bimodale avec des populations situées aux alentours de 500nm et une autre population de l'ordre de 100nm et c'est cette dernière qui confère le caractère nanométrique au gel. Une bonne homogénéisation permet d'éviter cet écart afin d'obtenir une répartition homogène de l'ordre de 100 à 150nm, on suggère dans ce contexte d'utiliser les ondes ultrasonores qui permettent de bien disperser les particules.

#### IV.14 potentiels zêta

La détermination du potentiel zêta permet d'évaluer la stabilité des nanoparticules présentes dans les nanogels. Les résultats obtenus fournissent des informations sur les interactions électrostatiques et les forces de répulsion entre les particules, ce qui influence la stabilité globale du système. Les mesures de potentiel zêta sont en accord avec les normes et les critères établis pour garantir la qualité et la fiabilité des nanogels.

**Tableau IV.5:** taille des particules dans le nanogel de chitosane commercial

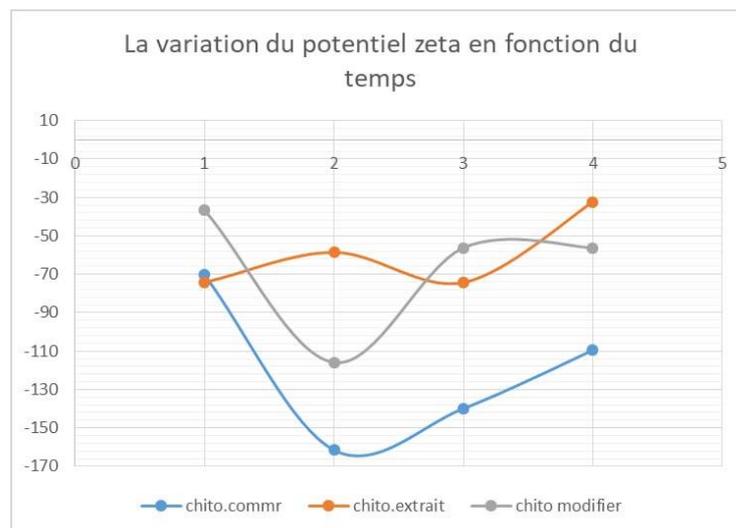
Semaine	01	02	03	04
Potentiel zêta (mV)	-70.3	-161.5	-139.9	-109.5

**Tableau IV.6 :** taille des particules dans le nanogel de chitosane oxydé

Semaine	01	02	03	04
Potentiel zêta (mV)	-36.3	-115.9	-56.2	-32.2

**Tableau IV.7 :** taille des particules dans le nanogel de chitosane extrait

Semaine	01	02	03	04
Potentiel zêta (mV)	-74.2	-58.6	-74.9	-56.2

**Figure IV.16 :** Variation du potentiel zêta en fonction du temps

Les mesures du potentiel zêta des trois nanogels indiquent des valeurs inférieures à -30 mV ou supérieures à +30 mV, ce qui suggère que les trois nanogels sont stables pendant la durée de l'étude estimée à 3 semaines

### IV.15 Test d'adhérence

Selon les exigences, le nanogel présente est considéré comme présentant une bonne adhérence s'il peut adhérer pendant sur une surface plus d'une seconde [61], [64], [73]. Les résultats des tests montrent que les trois formulations présentent une adhérence satisfaisante, avec un temps d'adhérence supérieur à une seconde, comme illustré sur le tableau ci-dessous.

**Tableau IV.8 :** Résultat du test d'adhérence des nanogels

Formulation	01	02	03
Adhérence (s)	1.40 ± 0.03	1.20± 0.01	1.50±0.04

D'après les résultats obtenus, on remarque une amélioration dans le temps d'adhérence du chitosane extrait et celui du chitosane modifié par rapport au commercial, le chitosane extrait est considéré comme étant le meilleur.

### IV.16 Taux d'encapsulation

Les résultats indiquent des taux d'encapsulation différents pour les 3 nanogels. Une amélioration remarquable du taux d'encapsulation est observée pour le nanogel contenant le chitosane modifié comme principe actif par rapport aux 2 autres nanogels, ceci peut être dû à la différence des masses moléculaire des 3 nanogels, et se répercute sur le mécanisme d'encapsulation entre les chaînes macromoléculaires.

**Tableau IV.9 :** Résultat Du taux d'encapsulation des nanogels

Formulation	Commercial	Extrait	Oxydé
Taux d'Encapsulation(%)	48.50%	31.00%	64.64%

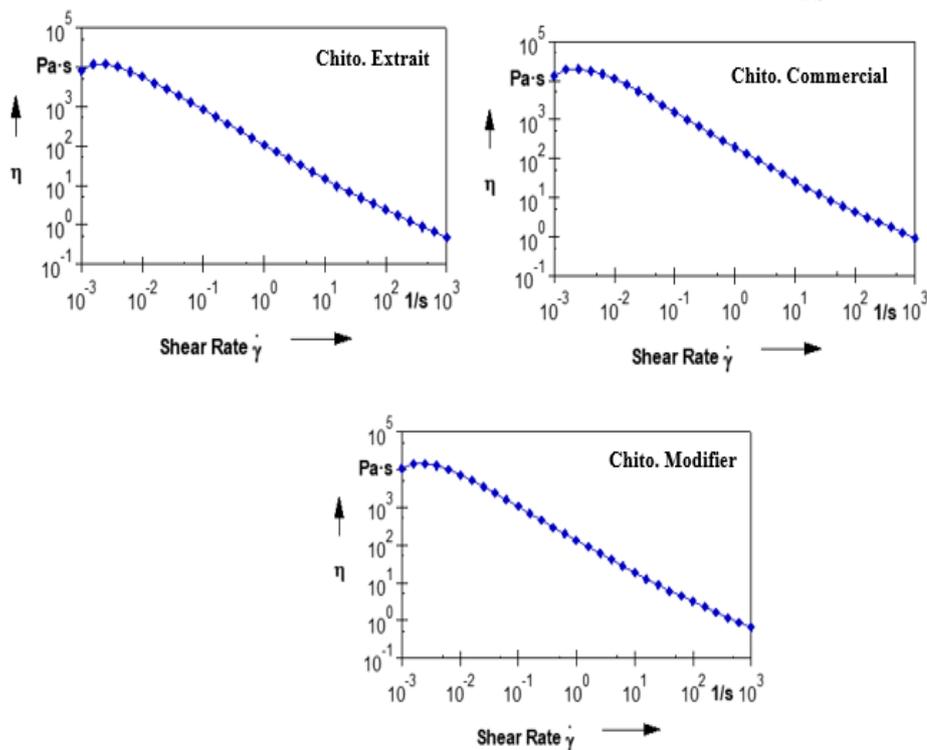
### IV.17 Etude rhéologique

La viscosité est l'un des paramètres importants pour évaluer la qualité d'un excipient utilisé comme épaississant dans la formulation, ce qui affecte le comportement rhéologique directement [74], [53], [75].

**Tableau IV.10**, représente la viscosité des différents nanogels :

Formulation	Gel chitosane	Nanogel commercial	Nanogel Extrait	Nanogel Modifier
Viscosité (Pa.s)	1.6	19900	11900	14400

Les courbes d'écoulement présentées représentent les changements de viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement dans une plage allant de  $10^{-3}$  à  $10^3$  s<sup>-1</sup>, en régime continu. Les figures ci-dessous en illustrent :



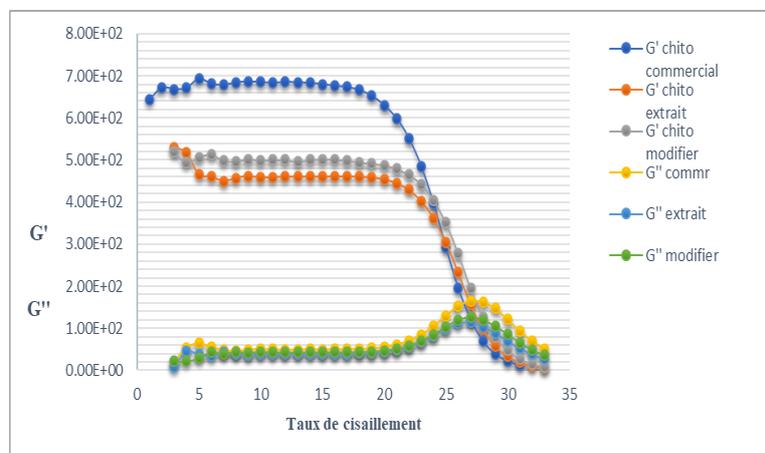
**Figure IV.17** : Courbes d'écoulement des nanogels préparé

A partir des résultats obtenus on peut remarquer que les trois nanogels présentent des comportements rhéofluidifiants non Newtoniens similaires. Cela signifie que leur viscosité diminue à mesure que la vitesse de cisaillement augmente, ce qui est bénéfique pour les formulations topiques, car ce comportement permet une meilleure répartition et adhérence du gel sur la zone d'application. Cela favorise une rétention prolongée du gel sur la peau, ce qui peut contribuer à une efficacité thérapeutique accrue des principes actifs incorporés.

La similitude des courbes d'écoulement suggère que les trois nanogels ont des propriétés rhéologiques comparables.

Il est également intéressant de noter que les trois nanogels ont des viscosités presque identiques, ce qui suggère une cohérence dans les formulations. Cette similarité peut faciliter la fabrication et l'utilisation pratique des nanogels.

La figure ci-dessus, présente les propriétés viscoélastiques, en étudiant la variation du module de stockage ( $G'$ ) en fonction de la déformation (le taux de cisaillement) par rhéologie, pour estimer le comportement viscoélastique des nanogels



**Figure IV.18 :** Variation de module de stockage ( $G'$ ) et ( $G''$ ) en fonction du taux de cisaillement des trois nanogels formulés.

Les résultats obtenus, par utilisation du même protocole expérimental pour les trois formulations, mettent en évidence leur caractère gélifiant. Il est clair que ces formulations présentent un comportement élastique, avec un module de stockage ( $G'$ ) toujours supérieur au module de perte ( $G''$ ), ce qui témoigne de leurs propriétés de viscosité et d'élasticité. Il est

intéressant de noter que le module de stockage ( $G'$ ) des trois nanogels reste constant jusqu'à ce qu'ils atteignent une contrainte de cisaillement critique ( $> 25\%$ ), où la structure des nanogels se démêle et adopte un comportement plastique.

## **Conclusion générale**

# Conclusion générale

L'objectif de cette présente étude est la production d'une matière première « le chitosane » à partir des plumes de calamar considérées comme déchets non respectueuses de l'environnement

Afin d'améliorer certaines de ses propriétés telles que la solubilité et l'activité antibactérienne, une fonctionnalisation a été réalisée par oxydation afin de d'introduire de nouvel groupement hydrophile et enfin l'utilisation de ces biomatériaux comme matières premières dans la formulation des nanogels antiseptiques

A l'issue de cette étude, les points suivants ont été soulevés :

✓ La méthode d'extraction par solvant a permis d'obtenir des rendements de l'ordre de 53%, et DDA de 80% ont été obtenus. Le chitosane obtenu était similaire à celui commercial du point de vue solubilité, aspect et couleur.

✓ La réaction d'oxydation au periodate de sodium s'avère très efficace. En effet par spectroscopie UV et FTIR, on a pu identifier les nouveaux groupements fonctionnels caractéristiques par la présence des groupes aldéhydes avec un degré d'oxydation de 56 %.

✓ Par le procédé de fabrication optimisé, trois nanogels ont été élaborés et ont présenté une texture visqueuse avec un comportement Non-Newtonien, justifié par une étude rhéologique. Du point de vue aspect, la couleur est translucide et brillante. Le meilleur taux d'encapsulation a été enregistré pour le nanogel formulés avec le chitosane oxydé comme principe actif avec un taux de 64.64%, puis le chitosane commercial avec un taux de 48.50 %. Le chitosane extrait à partir des plumes de calamar, le taux d'encapsulation est très faible. Les trois formulations ont montré une bonne capacité à s'étaler sur la peau, le nanogel à base de chitosane modifié s'est avéré le meilleur sur ce point.

✓ Par analyse granulométrique, les particules dispersés dans le gel ont présenté un diamètre moyen compris entre 100 et 500nm, ce diamètre peut être réduit par une bonne homogénéisation aux ondes ultrasonores.

✓ Un suivi des valeurs du potentiel zêta pendant 4 semaines a donné des valeurs supérieures à 30mV, ce qui met en évidence la stabilité de nos formulations pendant toute la durée de l'étude.

✓ L'analyse de l'activité antibactérienne a montré que l'introduction des nouveaux groupements améliore nettement ce pouvoir. Néanmoins, le résultat trouvé n'était pas très

# Conclusion générale

significatif, ce qui suggère que cette partie doit être mieux exploitée. La mise en évidence de la concentration du chitosane sur le pouvoir antibactérien pourrait résoudre ce problème.

Enfin, cette étude est loin d'être achevée, elle n'est qu'à son début. Toutefois les résultats semblent très encourageants et s'alignent bien avec les préoccupations des pouvoirs publics afin de produire des matières premières à partir des ressources naturelles et réduire les factures de l'importation. Il faudra dans les prochaines étapes s'orienter vers :

- ✓ Optimisation des conditions d'extraction en vue d'amélioration du rendement par planification expérimentale.
- ✓ Modification du chitosane par d'autres moyens chimiques et/ou physiques
- ✓ Dans le volet formulation, optimiser aussi les conditions de préparation avec une bonne homogénéisation.
- ✓ Mise en évidence des activités biologiques et thérapeutiques du chitosane pour des applications dans le secteur pharmaceutique et cosmétique.

Cette étude n'est qu'une goutte dans un océan, fort passionnant d'un intérêt non seulement économique mais aussi environnemental.

## **Références bibliographiques**

- [1] C.-Y. Huang, C.-H. Kuo, C.-H. Wu, M.-W. Ku, and P.-W. Chen, 'Extraction of crude chitosans from squid (*Illex argentinus*) pen by a compressional puffing-pretreatment process and evaluation of their antibacterial activity', *Food Chem.*, vol. 254, pp. 217–223, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.018.
- [2] A. Saravanan *et al.*, 'A review on extraction of polysaccharides from crustacean wastes and their environmental applications', *Environ. Res.*, vol. 221, p. 115306, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.115306.
- [3] K. Mohan *et al.*, 'Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review', *Carbohydr. Polym.*, vol. 287, p. 119349, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119349.
- [4] L.-H. Hassiba, L. Yasmine, S. Zineb, B. Ahmed, and A. Kenza, 'Beta-Chitosane as a Treatment for Ulcerative Colitis: Therapeutic Effectiveness and Possible Mechanisms of Action', *J. Biomed. Res. Environ. Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 114–124, Mar. 2021, doi: 10.37871/jbres1199.
- [5] K. Pathak *et al.*, 'Biomedical Applications of Quaternized Chitosan', *Polymers*, vol. 13, no. 15, Art. no. 15, Jan. 2021, doi: 10.3390/polym13152514.
- [6] M. A. Matica, F. L. Aachmann, A. Tøndervik, H. Sletta, and V. Ostafe, 'Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, Art. no. 23, Jan. 2019, doi: 10.3390/ijms20235889.
- [7] F. Luan *et al.*, 'Antioxidant Activity and Antifungal Activity of Chitosan Derivatives with Propane Sulfonate Groups', *Polymers*, vol. 10, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2018, doi: 10.3390/polym10040395.
- [8] K. Wegrzynowska-Drzymalska *et al.*, 'Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Chitosan as a New Approach for Biomedical Applications', *Materials*, vol. 13, no. 15, Art. no. 15, Jan. 2020, doi: 10.3390/ma13153413.
- [9] M. Ziegler-Borowska, 'Magnetic nanoparticles coated with aminated starch for HSA immobilization- simple and fast polymer surface functionalization', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 136, pp. 106–114, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.044.
- [10] H. El Knidri, R. Belaabed, A. Addaou, A. Laajeb, and A. Lahsini, 'Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, pp. 1181–1189, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139.
- [11] S. Grabska-Zielińska, A. Sionkowska, E. Olewnik-Kruszkowska, K. Reczyńska, and E. Pamuła, 'Is Dialdehyde Chitosan a Good Substance to Modify Physicochemical Properties of Biopolymeric Materials?', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, Art. no. 7, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22073391.
- [12] I. M. N. Vold and B. E. Christensen, 'Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions', *Carbohydr. Res.*, vol. 340, no. 4, pp. 679–684, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.carres.2005.01.002.
- [13] Y. Lv, Z. Long, C. Song, L. Dai, H. He, and P. Wang, 'Preparation of Dialdehyde Chitosan and its Application in Green Synthesis of Silver Nanoparticles', *BioResources*, vol. 8, no. 4, pp. 6161–6172, Oct. 2013, doi: 10.15376/biores.8.4.6161-6172.
- [14] N. Yadav, D. Mudgal, R. Anand, S. Jindal, and V. Mishra, 'Recent development in nanoencapsulation and delivery of natural bioactives through chitosan scaffolds for various biological applications', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 220, pp. 537–572, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.098.
- [15] R. Rajput, J. Narkhede, and J. B. Naik, 'Nanogels as nanocarriers for drug delivery: A review', *ADMET DMPK*, vol. 8, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2020, doi: 10.5599/admet.724.
- [16] X. Di, X. Liang, C. Shen, Y. Pei, B. Wu, and Z. He, 'Carbohydrates Used in Polymeric Systems for Drug Delivery: From Structures to Applications', *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14040739.
- [17] P. Marinard, D. Blouin, A. Patry, E. Boulfroy, and I. Legault, 'Étude sur le potentiel d'utilisation du chitosane comme facteur de croissance et de protection des plants contre le gel et les maladies - Considération sur les propriétés phytosanitaires et antifongiques du chitosane et de ses dérivés'.
- [18] *Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application*. Presses Univ. Franche-Comté, 2009.

- [19] 'ZEMMOURI.Hassiba.pdf'. Accessed: Mar. 25, 2023. [Online]. Available: <http://repository.enp.edu.dz/jspui/bitstream/123456789/8734/1/ZEMMOURI.Hassiba.pdf>
- [20] I. Aranaz *et al.*, 'Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications', *Polymers*, vol. 13, no. 19, p. 3256, Sep. 2021, doi: 10.3390/polym13193256.
- [21] 'Chitine & Chitosanes', *Chitine et chitosane*. <http://alpha-chitin.fr/chitine-chitosanes/> (accessed Apr. 02, 2023).
- [22] I. Hamed, F. Özogul, and J. M. Regenstien, 'Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review', *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 48, pp. 40–50, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2015.11.007.
- [23] '17470.pdf'. Accessed: May 02, 2023. [Online]. Available: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00087/19828/17470.pdf>
- [24] N. Mati-Baouche, 'Conception of thermal insulators based on sunflower stem and polysaccharidic binder', 2015.
- [25] S. Pu, J. Li, L. Sun, L. Zhong, and Q. Ma, 'An in vitro comparison of the antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles', *Carbohydr. Polym.*, vol. 211, pp. 161–172, May 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.02.007.
- [26] E. Jin, M. Wu, S. Wang, Z. Qiao, M. Li, and W. Linghu, 'Preparation and application performance of graft-quaternization double modified chitosan electrospun antibacterial nanofibers', *Mater. Today Commun.*, vol. 31, p. 103712, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.103712.
- [27] E. M. Khalaf *et al.*, 'Recent progressions in biomedical and pharmaceutical applications of chitosan nanoparticles: A comprehensive review', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 231, p. 123354, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123354.
- [28] E. S. Abdou, K. S. A. Nagy, and M. Z. Elsabee, 'Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources', *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 5, pp. 1359–1367, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.051.
- [29] H. EL Knidri, J. Dahmani, A. Addaou, A. Laajeb, and A. Lahsini, 'Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 139, pp. 1092–1102, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.079.
- [30] J. A. Vázquez *et al.*, 'An integral and sustainable valorisation strategy of squid pen by-products', *J. Clean. Prod.*, vol. 201, pp. 207–218, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.316.
- [31] H. T.-T. Nguyen, T. N. Tran, A. C. Ha, and P. D. Huynh, 'Impact of Deacetylation Degree on Properties of Chitosan for Formation of Electrospun Nanoparticles', *J. Nanotechnol.*, vol. 2022, pp. 1–11, May 2022, doi: 10.1155/2022/2288892.
- [32] Y. Geng *et al.*, 'Recent advances in carboxymethyl chitosan-based materials for biomedical applications', *Carbohydr. Polym.*, vol. 305, p. 120555, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120555.
- [33] M. Zhang, F. Zhang, C. Li, H. An, T. Wan, and P. Zhang, 'Application of Chitosan and Its Derivative Polymers in Clinical Medicine and Agriculture', *Polymers*, vol. 14, no. 5, Art. no. 5, Jan. 2022, doi: 10.3390/polym14050958.
- [34] A. Elamri, K. Zdiri, M. Hamdaoui, and O. Harzallah, 'Chitosan: A biopolymer for textile processes and products', *Text. Res. J.*, vol. 93, no. 5–6, pp. 1456–1484, Mar. 2023, doi: 10.1177/00405175221127315.
- [35] M. A. Sajid, S. A. Shahzad, F. Hussain, W. G. Skene, Z. A. Khan, and M. Yar, 'Synthetic modifications of chitin and chitosan as multipurpose biopolymers: A review', *Synth. Commun.*, vol. 48, no. 15, pp. 1893–1908, Aug. 2018, doi: 10.1080/00397911.2018.1465096.
- [36] A. Nawaz, M. Atif, I. Naz, A. Khan, F. Naz, and N. Ali, 'Comparative robustness and sustainability of in-situ prepared antimony nanoarchitectonics in chitosan/synthesized carboxymethyl chitosan in environmental remediation perspective', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 235, p. 123591, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123591.

- [37] X. Wei *et al.*, 'Quaternized chitosan/cellulose composites as enhanced hemostatic and antibacterial sponges for wound healing', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 210, pp. 271–281, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.007.
- [38] N. Subhadrappa *et al.*, 'Preparation of phosphorylated chitosan from gladius of the squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830) and its in vitro antioxidant activity', *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, vol. 1, no. 2, pp. 148–155, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.bcdf.2013.03.001.
- [39] H. Besheir, 'Conception et caractérisation de nanoparticules polymères thérapeutiques destinées au traitement des tumeurs cérébrales', Apr. 2017, Accessed: Apr. 04, 2023. [Online]. Available: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/19546>
- [40] V. Smagina, P. Yudaev, A. Kuskov, and E. Chistyakov, 'Polymeric Gel Systems Cytotoxicity and Drug Release as Key Features for their Effective Application in Various Fields of Addressed Pharmaceuticals Delivery', *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15030830.
- [41] 'Historique des nanomatériaux et des nanotechnologies - ECHA'. <https://euon.echa.europa.eu/fr/url> (accessed Apr. 04, 2023).
- [42] S. Jordanovska, 'Les nanoparticules dans l'industrie Pharmaceutique : comparaison des méthodes de fabrication'.
- [43] S. Ahmed, K. Alhareth, and N. Mignet, 'Advancement in nanogel formulations provides controlled drug release', *Int. J. Pharm.*, vol. 584, p. 119435, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119435.
- [44] C. Fornaguera and C. Solans, 'Methods for the In Vitro Characterization of Nanomedicines—Biological Component Interaction', *J. Pers. Med.*, vol. 7, p. 2, Jan. 2017, doi: 10.3390/jpm7010002.
- [45] L. Kumari and H. R. Badwaik, 'Polysaccharide-based nanogels for drug and gene delivery', in *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*, Elsevier, 2019, pp. 497–557. doi: 10.1016/B978-0-08-102553-6.00018-0.
- [46] S. Shah, N. Rangaraj, K. Laxmikeshav, and S. Sampathi, "Nanogels as drug carriers – Introduction, chemical aspects, release mechanisms and potential applications", *Int. J. Pharm.*, vol. 581, p. 119268, May 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119268.
- [47] 'Étapes du devenir du médicament'. <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament> (accessed Apr. 24, 2023).
- [48] 'OMEDIT\_CUTANEE.pdf'. Accessed: Apr. 24, 2023. [Online]. Available: [https://www.omedit-paysdelaloire.fr/wp-content/uploads/2021/02/OMEDIT\\_CUTANEE.pdf](https://www.omedit-paysdelaloire.fr/wp-content/uploads/2021/02/OMEDIT_CUTANEE.pdf)
- [49] 'Cours8D3Voiesdadministrationdesmdicaments.pdf'. Accessed: Apr. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.ortrafr.ch/data/documents/Cours8D3Voiesdadministrationdesmdicaments.pdf>
- [50] J. Brugnerotto, J. Lizardi-Mendoza, F. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrieres, and M. Rinaudo, 'An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization', *POLYMER*, vol. 42, pp. 3569–3580, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(00)00713-8.
- [51] 'Approche pour modélisation des conditions expérimentales de traitement d'un sous produit de la pêche (Beta-chitosane)'. Accessed: Jun. 12, 2023. [Online]. Available: <https://di.univ-blida.dz/jspui/bitstream/123456789/12462/1/memoire%20%281%29-converted.pdf>
- [52] S. Chen *et al.*, 'A strong, antimildew, and fully bio-based adhesive fabricated by soybean meal and dialdehyde chitosan', *Ind. Crops Prod.*, vol. 194, p. 116277, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.indcrop.2023.116277.
- [53] T. Pandey, N. Sharma, N. Gupta, D. Rajput, and K. Tripathi, 'Fabrication of Nanogel for Topical Drug Delivery of Montelukast', *Asian J. Pharm. Res. Dev.*, vol. 10, no. 6, pp. 53–60, Dec. 2022, doi: 10.22270/ajprd.v10i6.1190.
- [54] Y. R. Muniraj S N\* Nagaraja T. S, Bharathi D. R, 'PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANO GEL DRUG DELIVERY SYSTEM CONTAINING CLOTRIMAZOLE AN ANTI-FUNGAL DRUG"', Aug. 2020, doi: 10.5281/zenodo.3970394.

- [55] S. A. Algharib *et al.*, 'Designing, structural determination and biological effects of rifaximin loaded chitosan- carboxymethyl chitosan nanogel', *Carbohydr. Polym.*, vol. 248, p. 116782, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116782.
- [56] M. Hesani, A. Gholipour-Kanani, M. Lotfi, and M. Shafiee, 'The synthesis and characterization of core-shell nanogels based on alginate and chitosan for the controlled delivery of mupirocin', *Biochem. Eng. J.*, vol. 190, p. 108742, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.bej.2022.108742.
- [57] D. S. Mahaparale and M. Akotkhane, 'A Review on : Nanogels', *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 42, no. 3, Art. no. 3, Jun. 2023.
- [58] A. Alam, A. I. Foudah, M. A. Salkini, M. Raish, and J. Sawale, 'Herbal Fennel Essential Oil Nanogel: Formulation, Characterization and Antibacterial Activity against *Staphylococcus aureus*', *Gels*, vol. 8, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/gels8110736.
- [59] A. Ahmad *et al.*, 'Synthesis and Evaluation of Finasteride-Loaded HPMC-Based Nanogels for Transdermal Delivery: A Versatile Nanoscopic Platform', *BioMed Res. Int.*, vol. 2022, pp. 1–22, Jul. 2022, doi: 10.1155/2022/2426960.
- [60] M. S. Shaikh and M. A. Kale, 'Formulation and molecular docking simulation study of luliconazole nanosuspension–based nanogel for transdermal drug delivery using modified polymer', *Mater. Today Chem.*, vol. 18, p. 100364, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.mtchem.2020.100364.
- [61] Mr. S. Chopade, K. Sheeba, P. Ajit, and P. Sayali, 'FORMULATION DEVELOPMENT AND EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF TOPICAL TENOXICAM NANO GEL ON ANIMAL MODEL', Aug. 2019.
- [62] T. Wuryandari, N. Sugihartini, and K. Kintoko, 'Emulgel Formulation of Purified Extract of Moringa (*Moringa oleifera* L.) Leaf', *Folia Medica Indones.*, vol. 55, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2019, doi: 10.20473/fmi.v55i1.24329.
- [63] P. Sahu, S. K. Kashaw, V. Kashaw, J. P. Shabaaz, and R. Dahiya, 'Synthesis and ex vivo evaluation of PLGA chitosan surface modulated double walled transdermal Pluronic nanogel for the controlled delivery of Temozolomide', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 187, pp. 742–754, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.129.
- [64] P. K. Desu, B. Karmakar, V. Kondi, O. N. Tiwari, and G. Halder, 'Optimizing formulation of green tea extract-loaded chitosan nanogel', *Biomass Convers. Biorefinery*, Feb. 2022, doi: 10.1007/s13399-022-02453-w.
- [65] 'EMULGEL-NOVEL TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEM–A COMPREHENSIVE REVIEW | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH', Nov. 30, 2016. <https://ijpsr.com/bft-article/emulgel-novel-topical-drug-delivery-system-a-comprehensive-review/> (accessed Jun. 17, 2023).
- [66] M. Bassetti, A. Carnelutti, and M. Peghin, 'Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in gram-negative bacterial infections', *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, vol. 15, no. 1, pp. 55–65, Jan. 2017, doi: 10.1080/14787210.2017.1251840.
- [67] P. Zou *et al.*, 'Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides', *Food Chem.*, vol. 190, pp. 1174–1181, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.076.
- [68] D.-H. Ngo *et al.*, 'Biological effects of chitosan and its derivatives', *Food Hydrocoll.*, vol. 51, pp. 200–216, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.05.023.
- [69] Y. Xie, X. Liu, and Q. Chen, 'Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity', *Carbohydr. Polym.*, vol. 69, no. 1, pp. 142–147, May 2007, doi: 10.1016/j.carbpol.2006.09.010.
- [70] L. G. Confederat, C. G. Tuchilus, M. Dragan, M. Sha'at, and O. M. Dragostin, 'Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review', *Molecules*, vol. 26, no. 12, Art. no. 12, Jan. 2021, doi: 10.3390/molecules26123694.
- [71] P. Eaton, J. C. Fernandes, E. Pereira, M. E. Pintado, and F. Xavier Malcata, 'Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*', *Ultramicroscopy*, vol. 108, no. 10, pp. 1128–1134, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.ultramic.2008.04.015.

- [72] T. Truong, R. Hausler, F. Monette, and P. Niquette, 'Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique', *Rev. Sci. Eau J. Water Sci.*, vol. 20, no. 3, pp. 253–262, 2007, doi: 10.7202/016170ar.
- [73] A. T. Paulino, J. I. Simionato, J. C. Garcia, and J. Nozaki, 'Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides', *Carbohydr. Polym.*, vol. 64, no. 1, pp. 98–103, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.10.032.
- [74] C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, and Y. Du, 'Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity', *Carbohydr. Polym.*, vol. 63, no. 3, pp. 367–374, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.09.023.
- [75] 'Antibacterial action of chitosan: Food Biotechnology: Vol 6, No 3'. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905439209549838> (accessed Jul. 04, 2023).
- [76] C. Wu, Z. Zhi, M. Duan, J. Sun, H. Jiang, and J. Pang, 'Insights into the formation of carboxymethyl chitosan-nisin nanogels for sustainable antibacterial activity', *Food Chem.*, vol. 402, p. 134260, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134260.
- [77] L.-Y. Zheng and J.-F. Zhu, 'Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights', *Carbohydr. Polym.*, vol. 54, no. 4, pp. 527–530, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.carbpol.2003.07.009.
- [78] 'H. No, S. Meyers, (1995) Preparation and characterization of chitin and chitosan-A review. Journal of Aquatic Food Product Technology. 4(2) 27-52. - References - Scientific Research Publishing'. [https://www.scirp.org/\(S\(vtj3fa45qm1ean45vffcz55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2353](https://www.scirp.org/(S(vtj3fa45qm1ean45vffcz55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2353) (accessed Jul. 04, 2023).
- [79] P. Bam, A. Bhatta, and G. Krishnamoorthy, 'Design of biostable scaffold based on collagen crosslinked by dialdehyde chitosan with presence of gallic acid', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 836–844, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.017.
- [80] W. H. Mohammed, W. K. Ali, and M. J. Al-Awady, 'Evaluation of in vitro drug release kinetics and antibacterial activity of vancomycin HCl-loaded nanogel for topical application', *J Pharm Sci*, vol. 10, 2018.
- [81] N. P. A. D. Wijayanti, P. Yustiantara, and I. Widiyantara, 'Optimization of Glyceryl Polyacrylate in Nanoemulgel of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Rind Fraction', *Biomed. Pharmacol. J.*, vol. 14, pp. 1051–1057, Jun. 2021, doi: 10.13005/bpj/2208.
- [82] M. Taha *et al.*, 'Nanogels as Potential Delivery Vehicles in Improving the Therapeutic Efficacy of Phytopharmaceuticals', *Polymers*, vol. 14, no. 19, Art. no. 19, Jan. 2022, doi: 10.3390/polym14194141.
- [83] A. O. Abioye, S. Issah, and A. T. Kola-Mustapha, 'Ex vivo skin permeation and retention studies on chitosan–ibuprofen–gellan ternary nanogel prepared by in situ ionic gelation technique—a tool for controlled transdermal delivery of ibuprofen', *Int. J. Pharm.*, vol. 490, no. 1–2, pp. 112–130, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.030.