

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie Des Procédés



THESE DE DOCTORAT

En Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

**Amélioration de l'efficacité de certains médicaments par
développement de dispersions solides amorphes et/ou de
micro/nano systèmes**

Par

MAKAOUI Nassima

Le Jury proposé :

H. LARIBI	Professeur	Université Blida 1	Présidente
A. BEYAZ	Professeur	Faculté de médecine d'Alger	Examinatrice
H. MOKRANE	Professeur	ENS Kouba	Examinatrice
A. HADJ-ZIANE	Professeur	Université Blida 1	Directrice de thèse
K. BOUTEMAK	Professeur	Université Blida 1	Codirectrice de thèse

RÉSUMÉ

Face à la croissance de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'augmentation des pourcentages de substances médicamenteuses faiblement solubles dans l'eau, certains médicaments sont devenus moins efficaces du point de vue thérapeutique. L'objectif de ce travail est l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de certains médicaments en adoptant deux stratégies ; la première est l'association de l'antibiotique aux NPs de ZnO synthétisés par la méthode sol-gel, afin d'étudier leur impact sur l'amélioration de l'activité antimicrobienne. La caractérisation de ZnO synthétisé réalisée par DRX, IR, Raman, DLS, XPS et MEB-EDX a démontré qu'il présente une structure cristalline hexagonale de type wurtzite et qu'il est présent sous forme de nano-flowers sphériques dont la taille des particules est d'environ 19 nm. Les ZnO NPs ont été associées aux antibiotiques : chlorhydrate de chlortétracycline, spiramycine et azithromycine dihydraté afin d'étudier l'activité sur les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et l'activité antifongique sur les champignons *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus brasiliensis*. La zone d'inhibition des antibiotiques CTC et SPM a été significativement augmentée en présence de ZnO NPs contre toutes les souches microbiennes étudiées. Cela implique que l'effet antimicrobien de l'antibiotique associé au ZnO NPs est plus intéressant que l'antibiotique seul. La deuxième stratégie est la formulation, par évaporation de solvant, de dispersions solides amorphes pour améliorer la dissolution et donc la biodisponibilité de l'acide niflumique, substance appartient à la classe II du BCS et caractérisée par sa faible solubilité, en utilisant comme véhicules les polymères PVP, PEG 1500 et PEG 6000. La caractérisation par IR, DRX, DSC-ATG et MEB-EDX a démontré la réussite de formulation de dispersions solides amorphes qui restent stables après deux ans de fabrication. La dissolution in vitro des différentes dispersions solides formulées a présenté une amélioration qui varie entre 4 à 15 fois plus par rapport aux mélanges physiques et au produit commercial testé.

Mots clés : ZnO, nanoparticules, sol-gel, antibiotiques, dispersion solides amorphes, acide niflumique, substance faiblement soluble dans l'eau, évaporation de solvant.

ABSTRACT

As antibiotic resistance is rising and the number of poorly water-soluble pharmacological components has increased, certain drugs have become less effective over the years. The aim of this work is to improve the therapeutic effectiveness of certain antibiotics by adopting two strategies. The first one is the association of the antibiotic with ZnO NPs synthesized by the sol-gel method, aiming to enhance the antibiotic original antimicrobial activity. The characterization of the synthesized ZnO by using XRD, IR, Raman, DLS, XPS and SEM-EDX techniques showed that it has a hexagonal wurtzite-type crystal structure and is present in the form of spherical nano-flowers with a particle size of around 19 nm. ZnO NPs were combined with three antibiotics, mainly: chlortetracycline hydrochloride, spiramycin and azithromycin dihydrate to study antibacterial activity against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, whereas the antifungal activity was investigated against *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus brasiliensis*. The zone of inhibition of the antibiotics CTC and SPM was significantly increased in the presence of ZnO NPs against all the studied microbial strains. Thus implies that the antimicrobial effect of the antibiotic combined with ZnO NPs is more interesting than the antibiotic alone. The second strategy is the formulation, by solvent evaporation, of amorphous solid dispersions to improve the dissolution and therefore the bioavailability of niflumic acid, a substance belonging to BCS class II and characterized by its low bioavailability, PVP, PEG 1500 and PEG 6000 were used as vehicles. The characterization by IR, XRD, DSC-ATG and SEM-EDX demonstrated the successful formulation of amorphous solid dispersions that remain stable after two years of manufacture. The in vitro dissolution of the various formulated solid dispersions showed an improvement which was 4 to 15 times higher compared with the physical mixtures and the tested commercial product.

Key words: ZnO, nanoparticles, sol-gel, antibiotics, amorphous solid dispersion, niflumic acid, poorly water-soluble drug, solvent evaporation.

ملخص

نظرا لزيادة نسبة المقاومة للمضادات الحيوية وكذلك زيادة نسبة المواد الطبية قليلة الذوبان في الماء، أصبحت بعض الأدوية أقل فعالية. الهدف من هذا العمل هو تحسين الفعالية العلاجية لبعض الأدوية وذلك باعتماد استراتيجيتين. الأولى، دراسة تأثير إضافة المضاد الحيوي لجسيمات أكسيد الزنك النانوية الذي تم تحضيره بطريقة "سول جل" على تحسين نشاط مضادات الميكروبات. اعتمدت عدة تقنيات لدراسة خصائص أكسيد الزنك النانوي مثل: Raman، IR DRX، MEB-EDX، XPS، DLS والتي أظهرت أن له بنية بلورية سداسية من نوع الورزيت وأنه موجود على شكل زهرة نانوية كروية بحيث يبلغ حجم جسيماته حوالي 19 نانومتر. تمت إضافة أكسيد الزنك النانوي إلى المضادات الحيوية التالية: كلورهدرات كلورتتراسكلين، سبيرامسين وأزتروميكسين من أجل دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ضد *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans* و *Aspergillus brasiliensis* و *Saccharomyces cerevisiae*. أظهرت الدراسة زيادة منطقة تثبيط المضادات الحيوية CTC و SPM بشكل ملحوظ في وجود ZnO NPs ضد جميع السلالات الميكروبية التي تمت دراستها. وهذا يعني أن التأثير المضاد للميكروبات للمضادات الحيوية مع ZnO NPs أكثر إثارة للاهتمام من المضاد الحيوي وحده. الاستراتيجية الثانية تتمثل في صياغة التشتت الصلبة غير المتبلورة، التي أعدت عن طريق تبخر المذيب، وذلك لتحسين الذوبان وبالتالي التوافر البيولوجي لحمض النيفلوميك، وهي مادة تنتمي إلى الفئة الثانية من BCS وتتميز بذوبان مائي ضعيف، وذلك باستخدام المركبات PEG 1500، PVP و PEG 6000. أظهر دراسة الخصائص بواسطة IR و DRX و DSC-ATG و SEM-EDX نجاح تركيبات المشتتات الصلبة غير المتبلورة التي ظلت مستقرة حتى بعد عامين من تصنيعها. أظهرت النتائج تحسن الذوبان المائي لمختلف تركيبات المشتتات الصلبة التي تمت صياغتها بقدر يتراوح بين 4 إلى 15 مرة مقارنة بالمخاليط الفيزيائية والمنتج التجاري الذي تم اختباره.

الكلمات المفتاحية: أكسيد الزنك، الجسيمات النانوية، سول جل، المضادات الحيوية، التشتت الصلب غير المتبلور، حمض النيفلوميك، المواد قليلة الذوبان في الماء، تبخر المذيب.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au niveau du Centre de Recherche et de Développement du GROUPE SAIDAL et au niveau du Laboratoire de Génie Chimique du Département Génie des Procédés de l'Université de SAAD DAHLAB BLIDA 1, sous la direction du Professeur Mme HADJ ZIANE Amel et Professeur BOUTEMAK Khalida.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à ma directrice de thèse Pr. HADJ-ZIANE Amel, Chef de Spécialité de Pharmacie Industrielle et Directrice du Laboratoire de Recherche « Génie chimique », qui a accepté de diriger ce travail, pour la confiance qu'elle m'a accordé en toutes circonstances, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien dans les moments les plus difficiles de ma vie et ses précieux conseils afin de bien mener ce travail de recherche. Permettez-moi de vous exprimer l'expression de ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciement s'adressent également au Pr. BOUTEMAK Khalida, Doyenne de la Faculté de Technologie de l'Université de BLIDA1, en acceptant d'être co-directrice de thèse, pour sa gentillesse, sa collaboration, ses précieux conseils et pour le temps qu'elle m'a accordé.

Je tiens à remercier Mr IMOUDACHE Hicham, Pharmacien Maître-assistant au niveau de la Faculté de médecine de l'Université de BLIDA 1 et au Centre de Recherche et de Développement du GROUPE SAIDAL, pour son appui scientifique, son savoir-faire, ses orientations, son aide, sa collaboration dans la réalisation de ce travail de recherche.

L'exprime de ma sincère reconnaissance au Dr MOGHNI Nassiba, Maître de conférence B à l'Université de BLIDA 1, pour son soutien, son aide et sa collaboration dans la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement Pr BOUZID Mohamed de l'Université de BOUMERDES pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie Pr. H. LARIBI, Enseignante chercheur à l'Université de BLIDA 1, en acceptant de juger ce travail de recherche et de présider le jury.

Mes remerciements les plus distingués s'adressent aux membres de jury, Pr A. BEYAZ et Pr. H. MOKRANE pour l'intérêt qu'elles ont accordé en acceptant d'examiner ce modeste travail de recherche, votre participation au jury est un honneur pour moi.

Mes remerciements s'adressent à mes collègues au niveau du Centre de Recherche et de Développement du GROUPE SAIDAL, Mme ALAIMIA Mounia, Melle BOUBEKEUR Sihem, Mr BOULAHLIB Nabil, Mr SLIMANI Rabeh, Mlle KHELIFAOUI Saliha, Mme AISSAOUI Souhila, Mme AMOKRANE Malika, Mme OUAREK Salima, Mme AZINE Kenza, Melle AKKACHE Lynda, Mme CHAHDANE Samia, Melle BELKADI Asma, Mr BOUDA Arezki, Melle REGUEM Hiba, Mr DAHMENE Moussa, Mr Ismail Hacène, Mr NOUR Gharib, tous mes collègues du GROUPE SAIDAL et toute personne qui m'a aidé de près ou de loin.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adresse à ma famille qui m'a soutenue tout au long de ma vie. Mon très cher papa Houcine (الله يرحمه ويجعل مثواه جنة الفردوس), ma très chère maman Fatima El-Zahraa Ramoul, ma sœur Dounia Soumia, mes frères jumeaux Mohammed et Walid, mes neveux Abd El-Hadi et Abd El-Rahmène, à mes chers oncles et à toute la famille MAKAOUI.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ

REMERCIEMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION GÉNÉRALE	19
CHAPITRE 1 : NANOPARTICULES ET RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	23
1.1. Définition	23
1.2. Classification des nanoparticules	24
1.2.1. Nanoparticules organiques	24
1.2.2. Nanoparticules à base de carbone	25
1.2.3. Nanoparticules inorganiques	25
1.3. Méthodes de synthèse des nanoparticules	25
1.3.1. Approche Top Down (TD)	26
1.3.1.1. Broyage mécanique.....	26
1.3.1.2. Ablation laser.....	26
1.3.1.3. Nanolithographie	27
1.3.1.4. Pulvérisation	27
1.3.2. Approche Bottom Up (BU)	27
1.3.2.1. Sol-gel.....	27
1.3.2.2. Dépôt chimique en phase vapeur	28
1.3.2.3. Pyrolyse	28
1.3.2.4. Biosynthèse.....	28
1.4. Oxyde de zinc.....	29
1.5. Applications thérapeutiques des nanoparticules.....	30
1.6. Mécanismes d'action des NPs de ZnO contre les microorganismes pathogènes.....	34
CHAPITRE 2 : DISPERSIONS SOLIDES	35
2.1. Introduction	35
2.2. Définition des dispersions solides	36
2.3. Critères de sélection du polymère	36

2.3.1. Exemples de polymères utilisés dans les dispersions solides	36
2.4. Solubilité	37
2.5. Dissolution	38
2.6. Classification du Système Biopharmaceutique	39
2.7. Classification des dispersions solides	40
2.7.1. Mélange eutectique	40
2.7.2. Solutions solides.....	41
2.7.3. Solutions vitreuses	42
2.8. Générations de dispersions solides.....	42
2.9. Méthodes de préparation des dispersions solides.....	44
2.9.1. Evaporation de solvant (Solvent Evaporation)	45
2.9.2. Séchage par atomisation (Spray Drying)	45
2.9.3. Technologie de Fluide supercritique (Supercritical Fluid Technology)	45
2.9.4. Fusion (Hot-Melt)	46
2.9.5. Extrusion à chaud (Hot-Melt Extrusion)	46
2.9.6. Refroidissement par trempe (Quench Cooling)	46
2.10. Caractérisation des dispersions solides	46
2.11. Produits commercialisés fabriqués à base de dispersion solide amorphe	47
CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES	49
3.1. Introduction	49
3.2. Réactifs et matériel.....	50
3.2.1. Réactifs.....	50
3.2.2. Matériel	51
3.3. Partie « ZnO NPs synthétisées par la méthode sol-gel »	52
3.3.1. Synthèse des NPs de ZnO	52
3.3.2. Caractérisation des NPs de ZnO	53
3.3.2.1. Par DRX.....	53
3.3.2.2. Par Infra Rouge.....	54
3.3.2.3. Par spectroscopie Raman	54
3.3.2.4. Par DLS.....	54
3.3.2.5. Par spectroscopie de photoélectronique à rayon (XPS)	55
3.3.2.6. Par MEB-EDX.....	55

3.3.3. Contrôle physico-chimique des NPs de ZnO synthétisées.....	55
3.3.3.1. Aspect macroscopique	55
3.3.3.2. Solubilité.....	55
3.3.3.3. Identification par réaction chimique	56
3.3.3.4. Perte à la calcination.....	56
3.3.3.5. Teneur en ZnO par complexométrie.....	56
3.3.4. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs associé à certains antibiotiques	57
3.3.5. Formulation d'un gel à base de ZnO NPs synthétisé	59
3.3.6. Evaluation toxicologique de ZnO NPs.....	59
3.3.6.1. Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë (test in vivo)	59
3.3.6.2. Effet irritant/corrosif aigu sur la peau (test in vivo)	60
3.4. Partie « Dispersions solides à bases de l'acide niflumique »	61
3.4.1. Formulation de dispersions solides à base de l'acide niflumique par la méthode «évaporation de solvant »	61
3.4.1.1. Formulation de dispersion solide NIF/PVP (1) et NIF/PVP (2)	62
3.4.1.2. Formulation de dispersion solide NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4)	63
3.4.1.3. Formulation de dispersion solide NIF/PEG 1500 (1) et NIF/PEG 6000 (1)	64
3.4.1.4. Formulation de dispersion solide NIF/PPEG 1500/TA (1) et NIF/PEG 6000/TA (1)	64
3.4.2. Préparation des mélanges physiques	65
3.4.3. Aspect des dispersions solides formulées	65
3.4.4. Solubilité de l'acide niflumique et des dispersions solides formulées.....	65
3.4.5. Caractérisation des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique	66
3.4.5.1. Analyse par Infrarouge	66
3.4.5.2. Analyse par Diffraction des rayons X (DRX)	66
3.4.5.3. Analyse par DSC-ATG.....	66
3.4.5.4. Analyse par MEB-EDX.....	67
3.4.6. Fabrication du produit acide niflumique gélules à base de dispersion solide	67
3.4.7. Teneur de l'acide niflumique dans le médicament à base de dispersion solide gélules	67
3.4.8. Etude comparative des profils de dissolution in vitro des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique, des mélanges physiques et d'un produit commercial.....	69
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	71
4.1. Résultats et discussions de la partie « ZnO NPs synthétisées par la méthode sol-gel »	72
4.1.1. Caractérisation des NPs de ZnO	72

4.1.1.1. Par DRX.....	72
4.1.1.2. Par Infra Rouge.....	73
4.1.1.3. Par spectroscopie Raman.....	74
4.1.1.4. Par DLS.....	75
4.1.1.5. Par spectroscopie de photoélectronique à rayon (XPS)	75
4.1.1.6. Par MEB-EDX.....	76
4.1.2. Contrôle physico-chimique des NPs de ZnO synthétisées.....	77
4.1.3. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs associé à certains antibiotiques	79
4.1.3.1. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs et CTC-ZnO NPs	79
4.1.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs et SPM-ZnO NPs	81
4.1.3.3. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs et AZ-ZnO NPs.....	83
4.1.4. Evaluation toxicologique de ZnO NPs.....	87
4.1.4.1. Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë (test in vivo)	87
4.1.4.2. Effet irritant/corrosif aigu sur la peau (test in vivo)	87
4.1.5. Etude de stabilité des NPs de ZnO synthétisé.....	90
4.2. Résultats et discussions de la partie « Dispersions solides à base de l'acide niflumique » ...	91
4.2.1. Aspect des dispersions solides formulées	91
4.2.2. Solubilité de l'acide niflumique et des dispersions solides formulées.....	92
4.2.3. Caractérisation des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique	94
4.2.3.1. Analyse par IR	94
4.2.3.2. Analyse par DRX.....	97
4.2.3.3. Analyse par DSC-ATG.....	99
4.2.3.4. Analyse par MEB-EDX.....	101
4.2.4. Teneur de l'acide niflumique dans le médicament à base de dispersion solide gélules	102
4.2.5. Etude comparative des profils de dissolution in vitro des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique, des mélanges physiques et d'un produit commercial	104
CONCLUSION GÉNÉRALE	111

REFERENCES

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Evolution historique des nanomatériaux et de la nanotechnologie

Figure 1.2 : Classification des nanoparticules

Figure 1.3 : Méthodes de synthèse des nanoparticules

Figure 1.4 : Schéma de synthèse par la méthode sol-gel

Figure 1.5 : Structures cristallines de ZnO. (a) Rocksalt, (b) Zinc blende et (c) Wurtzite

Figure 1.6 : Développement des antibiotiques et l'apparition de la résistance au fil du temps

Figure 1.7 : Modes d'action des antibiotiques chargés des nanoparticules

Figure 1.8 : Mécanismes d'action suggérés des NPs de ZnO contre les bactéries. (1) Libération des ions Zn^{2+} , (2) Production de ROS et (3) L'internalisation dans la cellule bactérienne et le contact direct provoquent la perte de l'intégrité cellulaire

Figure 2.1 : Distribution estimée des produits commercialisés et en cours de développement, selon le Système de Classification Biopharmaceutique

Figure 2.2. : Schéma de classification biopharmaceutique des substances

Figure 2.3 : Diagramme de phases d'un mélange eutectique

Figure 2.4 : Schéma représentatif de solution solide discontinue

Figure 2.5 : Classification des dispersions solides

Figure 2.6 : Classification des dispersions solides

Figure 2.7 : Différentes techniques utilisées pour la caractérisation des dispersions solides

Figure 3.1 : Montage expérimentale de synthèse des NPs de ZnO

Figure 3.2 : Photos de la formulation de dispersions solides NIF/PVP (2)

Figure 3.3 : Photos de la formulation de dispersion solide NIF/PVP (4)

Figure 3.4 : Photos de la formulation de dispersions solides NIF/PEG 6000/TA (1)

Figure 4.1. : Diffractogramme du ZnO synthétisé et du ZnO standard (JCPDS card No. 36-1451)

Figure 4.2. Spectres IR (a) ZnO commercial et (b) ZnO synthétisé

Figure 4.3. : Spectre Raman du ZnO synthétisé

Figure 4.4. : Profil de distribution de tailles des particules de ZnO synthétisé

Figure 4.5 : Spectres XPS du ZnO synthétisé

Figure 4.6 : Images MEB du ZnO synthétisé

Figure 4.7 : Spectre EDX du ZnO synthétisé

Figure 4.8 : Aspect du ZnO NPs synthétisé

Figure 4.9 : Activité antimicrobienne du ZnO NPs, CTC et CTC-ZnO NPs sur différentes souches

Figure 4.10 : Activité antimicrobienne du ZnO NPs, SPM et SPM-ZnO NPs sur différentes souches

Figure 4.11 : Activité antimicrobienne du ZnO NPs, AZ et AZ-ZnO NPs sur différentes souches

Figure 4.12 : Comparaison des zones d'inhibition du ZnO NPs, antibiotique et ZnO NPs-antibiotique sur les différentes souches microbiennes

Figure 4.13 : Schéma représentative du mécanisme proposé pour l'activité antibactérienne des NPs de ZnO

Figure 4.14 : Photo de l'administration de la dose de ZnO NPs à la souris type NMRI

Figure 4.15 : Photos du test effet irritant du gel ZnO NPs sur les lapins

Figure 4.16 : Aspect des différentes dispersions solides formulées, (a) acide niflumique pur, (b) PVP, (c) NIF/PVP (1), (d) NIF/PVP (2), (e) NIF/PVP (3), (f) NIF/PVP (4), (g) NIF/PEG 1500 (1), (h) NIF/PEG 1500/TA (1), (i) NIF/PEG 6000 (1), (j) NIF/PEG 6000/TA (1) et (k) PEG 6000

Figure 4.17 : Solubilité dans l'eau des différentes dispersions solides formulées, (a) NIF/PVP (1), (b) NIF/PVP (2), (c) NIF/PVP (3), (d) NIF/PVP (4), (e) NIF/PEG 1500/TA (1), (f) NIF/PEG 6000/TA (1) et (g) (h) acide niflumique pur

Figure 4.18 : Spectres infra-rouge, (a) NIF pur, (b) PVP, (c) Mélange physique, (d) NIF/PVP (1), (e) NIF/PVP (2), (f) NIF/PVP (3) et (g) NIF/PVP (4)

Figure 4.19 : Spectres infra-rouge, (a) NIF pur, (b) PEG 1500, (c) NIF/PEG 1500/TA (1), (d) NIF/PEG 1500 (1)

Figure 4.20 : Spectres infra-rouge, (a) NIF pur, (b) PEG 6000, (c) Mélange physique, (d) NIF/PEG 6000/TA (1), (e) NIF/PEG 6000 (1)

Figure 4.21 : Diffractogrammes DRX, (a) à la fabrication et (b) après 02 ans de fabrication, de l'acide niflumique pur et des dispersions solides NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4)

Figure 4.22 : Diffractogrammes DRX, (a) à la fabrication et (b) après 02 ans de la fabrication, de l'acide niflumique pur, PEG 6000 et des dispersions solides NIF/PEG 6000/ TA (1) et NIF/PEG 6000 (1)

Figure 4.23 : Thermogramme DSC-TG de l'acide niflumique pur

Figure 4.24 : Thermogramme DSC-TG du PVP

Figure 4.25 : Thermogramme DSC-TG de la formulation NIF/PVP (1)

Figure 4.26 : Thermogramme DSC-TG de la formulation NIF/PVP (4)

Figure 4.27 : Images MEB, (a) acide niflumique, (b) et (c) Dispersion solide NIF/PVP (4)

Figure 4.28 : Images EDX, (a) acide niflumique, (b) Dispersion solide NIF/PVP (4)

Figure 4.29 : Chromatogrammes HPLC de l'étude de spécificité, (a) phase mobile, (b) placebo, (c) standard acide niflumique, (d) DS NIF/PVP gélules

Figure 4.30 : Chromatogrammes HPLC de l'étude de spécificité, (a) placebo, (b) standard acide niflumique, (c), DS NIF/PEG gélules

Figure 4.31 : Profils de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (1) et NIF/PVP (2)

Figure 4.32 : Profils de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4)

Figure 4.33 : Profils de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules et des dispersions solides NIF/PEG 1500 (1), NIF/PEG 1500/TA (1), NIF/PEG 6000 (1) et NIF/PEG 6000/TA (1)

Figure 4.34 : Histogrammes du taux de dissolution de l'acide niflumique dans chaque produit

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Polymères utilisés dans la formulation de dispersions solides

Tableau 2.2 : Différents termes de solubilité selon l'USP et Ph. Eur.

Tableau 2.3 : Classification des dispersions solides

Tableau 2.4 : Liste des produits commerciaux fabriqués à base de dispersion solide

Tableau 3.1. : Liste des réactifs

Tableau 3.2 : Equipements utilisés

Tableau 3.3. : Milieux de culture utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne

Tableau 4.1. : Résultats du contrôle physico-chimique du ZnO synthétisé

Tableau 4.2. : Résultats de l'activité antimicrobienne ZnO (500 µg/disque), CTC (2500 µg/disque) et CTC-ZnO NPs (500-2500 µg/disque)

Tableau 4.3. : Résultats de l'activité antimicrobienne ZnO (500 µg/disque), SPM (2500 µg/disque) et SPM-ZnO NPs (500-2500 µg/disque)

Tableau 4.4. : Résultats de l'activité antimicrobienne ZnO (500 µg/disque), AZ (1250µg/disque) et AZ-ZnO NPs (500-1250 µg/disque)

Tableau 4.5. : Cotation des réactions cutanées selon l'OCDE N° 404

Tableau 4.6 : Cotation des réactions cutanées sur la peau du 1er lapin

Tableau 4.7 : Cotation des réactions cutanées sur la peau du 2ème et 3ème lapin

Tableau 4.8 : Résultats étude de stabilité de ZnO NPs

Tableau 4.9 : Résultats du dosage par HPLC de l'acide niflumique dans le produit gélules à base de dispersions solides

Tableau 4.10 : Taux de dissolution du produit commercial d'acide niflunique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (1) gélules et NIF/PVP (2) gélules, à différents temps de prélèvement

Tableau 4.11 : Taux de dissolution du produit commercial d'acide niflunique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (3) gélules et NIF/PVP (4) gélules, à différents temps de prélèvement

Tableau 4.12 : Taux de dissolution du produit commercial d'acide niflunique gélules et des dispersions solides NIF/PEG 1500 (1) gélules, NIF/PEG 1500/TA (1) gélules, NIF/PEG 6000 (1) gélules et NIF/PEG 6000/TA (1) gélules, à différents temps de prélèvement

ABRÉVIATIONS

ATB:	Antibiotique
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
Ag :	Argent
AINS :	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
Al ₂ O ₃ :	Alumine ou Oxyde d'Aluminium
Au :	Or
AZ :	Azithromycine dihydraté
BCS :	Biopharmaceutical Classification System
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CRD :	Centre de Recherche et de Développement
CTC :	Chlorhydrate de Chlortétracycline
Cu :	Cuivre
DLS :	Dynamic light scattering
DRX:	X-ray Diffraction
DSA :	Dispersion Solide Amorphe
DSC :	Differential Scanning Calorimetry
EDS :	Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EMA :	European Medicines Agency
FDA :	Food and Drug Administration
Fe :	Fer
Fe ₂ O ₃ :	Oxyde de fer (III)
Fe ₃ O ₄ :	Oxyde de Fer (II, III) ou Tétr oxyde de trifer ou la magnénite
HPC :	Hydroxypropylcellulose
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
HPMC:	Hydroxypropylmethylcellulose
IR :	Infra Rouge
MEB-EDX :	Microscope electronique à balayage- Energy Dispersive X-ray spectrometry
MRSE :	<i>Staphylococcus epidermidis résistant à la méthicilline</i>
MSSA :	<i>Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline</i>

Nd:YAG :	Laser Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet
NIF :	Acide niflumique
NMRI:	Naval Medical Research Institute
NPs :	Nanoparticules
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PDA :	Photo Diode Array
PEG :	Polyéthylène glycol
Ph. Eur. :	Pharmacopée Européenne
Pt :	Platine
PVP :	Povidone
RESS :	Rapid Expansion of Supercritical Solution
ROS :	Reactive Oxygen Species
SARM :	Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
SiO ₂ :	Dioxyde de silice
SPM :	Spiramycine
TA :	Tensioactif « Tween 80 »
TGA :	Thermogravimetric analysis
Ti:Sapphire :	Laser Titane:Saphir
TiO ₂ :	Dioxyde de titane
UATR :	Universal Attenuated Total Reflectance
USP :	United States Pharmacopeia
UV :	Ultra-Violet
UV-Vis :	UltraViolet-Visible
XPS :	X-ray photoelectron spectroscopy
ZI:	Zone d’Inhibition
Zn ⁺² :	Zinc en ion
ZnO :	Oxyde de zinc

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Parmi les principaux défis auxquels sont confrontés les fabricants des médicaments est l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de certains médicaments. En effet, la croissance de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'augmentation du pourcentage des substances médicamenteuses faiblement solubles dans l'eau rendent certains médicaments moins efficaces.

L'émergence de nouvelles bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique et de sécurité environnementale [1-2]. L'utilisation inappropriée des antibiotiques ainsi que l'administration des antibiotiques aux bétails contribuent à la croissance de la résistance aux médicaments, ce qui constitue une menace pour l'Homme [3-4]

D'une part, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a annoncé que la résistance aux antibiotiques figure parmi les dix principales menaces pour la santé publique [5-7]. Aux Etats-Unis, les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont responsables de plus de 2,8 millions d'infections et 35 900 décès par an [5] [8]. Au 21^{ème} siècle, les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques telles que la tuberculose, la méningite et la pneumonie, sont toujours l'unes des principales menaces pour la santé humaine, présentant un sérieux problème pour le traitement et constituant une cause de mortalité élevée. Par ailleurs, les ecchymoses, les lésions cutanées et les brûlures présentent également un risque élevé d'infections bactériennes, ce qui peut entraîner par la suite la mort des cellules tissulaires, la nécrose des tissus et une régénération difficile de la peau. [9]

L'ostéomyélite est une infection difficile à traiter de l'os et de la moelle osseuse, elle est causée principalement par la bactérie à Gram positif « *Staphylococcus aureus* » résistante à la méthicylline, incurable par les différents antibiotiques, ce qui nécessite généralement une intervention chirurgicale. [10]

Les nanotechnologies ont intégré plusieurs disciplines qui jouent un rôle très important dans la médecine «Formulation et délivrance de médicament au niveau du site pathogène». Les nanoparticules sont actuellement utilisées comme vecteurs de médicaments et en imagerie pour pouvoir contrôler la libération des médicaments et réduire leur toxicité [11]. A cause de leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques uniques, les nanoparticules sont utilisées dans plusieurs domaines, tels que : les dispositifs biomédicaux, l'assainissement de l'environnement, la

cosmétique, les énergies renouvelables, la catalyse, les industries spatiales et les industries chimiques [3] [12]

Les nanoparticules métalliques de platine (Pt), d'argent (Ag) et d'or (Au) sont utilisées dans les capteurs de diagnostic et les médicaments antimicrobiens [1] [13-14]. Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent détecter les métastases dans les ganglions lymphatiques [1] [15]. Les nanoparticules d'argent ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leurs propriétés antibactériennes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antitumorales uniques ; elles sont utilisées en médecine et en cosmétologie [1] [16-17]. Les nanoparticules d'oxyde de zinc sont actuellement utilisées dans les nano-cosmétiques et les nano-pharmaceutiques par voie topique en raison de leur efficacité antibactérienne contre les bactéries à Gram positives et à Gram négatives ainsi que leur efficacité fongicide et anti-inflammatoire. [18-19]

Face au problème de croissance rapide de la résistance aux antibiotiques et étant donné que le développement de nouvelles molécules est un processus très long, coûteux et incertain [1], le recours au développement de nouveaux médicaments « antibiotiques combinés aux nanoparticules métalliques » peut s'avérer plus efficace et est devenu une alternative attrayante. Les combinaisons « antibiotiques-nanoparticules » présentent l'avantage de réduire le dosage des deux constituants, atténuant ainsi les effets secondaires, et la petite taille des nanoparticules permettra la pénétration facile des cellules et des biofilms bactériens par rapport aux médicaments antibiotiques seuls. [5] [20-22]

Les *céphalosporines* présentent une large classe d'antibiotiques contre les bactéries à Gram négatives et à Gram positives [1]. Cependant, selon l'OMS les infections sanguines causées par *Escherichia coli* deviennent de plus en plus résistantes même aux *céphalosporines* de 3^{ème} génération. [1] [23]. L'étude menée par S.A. Vorobyev *et al.* (2023) sur la combinaison des AgNPs avec certains antibiotiques de la famille de *céphalosporines*, à savoir : ceftriaxone disodique, céfotaxime sodique, céfazoline sodique et céfopérazone sodique, a démontré l'amélioration des activités antibactériennes des combinaisons contre l'*Escherichia coli* par rapport aux antibiotiques purs. [1]

Plusieurs études réalisées sur la combinaison « antibiotique-ZnO NPs » ont démontré que l'efficacité antimicrobienne des antibiotiques chloramphénicol [24] et méropénème [25] augmente en présence de ZnO NPs. Notant aussi que selon Bhande *et al.* (2013), la combinaison de ZnO NPs avec l'antibiotique « Ampicilline » de la famille β -lactamines a augmenté l'effet bactéricide,

ces résultats prometteurs peuvent être explorés comme nouvelle thérapie pour le traitement des infections urinaires. [26]

D'autre part, la faible solubilité aqueuse de plusieurs substances médicamenteuses présente actuellement un autre défi aux développeurs des médicaments administrés par voie orale. En effet, selon la littérature plus de 75 % des produits en cours de développement et environ 40 % des médicaments commercialisés sont faiblement solubles dans l'eau. [27-28] Cette faible solubilité limite la dissolution du médicament dans le tractus gastro-intestinal, ce qui peut affecter sa biodisponibilité et réduire son efficacité, d'où la nécessité d'augmenter sa posologie qui peut entraîner une toxicité. [29-30]

Pour surmonter le problème de la faible solubilité aqueuse des substances appartenant à la classe II et IV du Système de Classification Biopharmaceutique (BCS), plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer la biodisponibilité orale des médicaments et maintenir leur stabilité. Parmi les techniques citées dans la littérature : la formation des sels, la complexation par les Cyclodextrines, l'utilisation de co-solvants, l'utilisation de surfactants, la réduction de la taille des particules, la formulation de dispersion solide et autres. [31-32]

La technique des dispersions solides amorphes (SDA) est l'une des techniques les plus prometteuses pour surmonter les difficultés liées à la faible solubilité aqueuse des médicaments. Actuellement, plusieurs médicaments fabriqués à base de dispersions solides amorphes sont mises sur le marché et approuvés par le FDA et/ou l'EMA tels que : ORKAMBI[®] (traitement de la mucoviscidose, maladie héréditaire qui a des effets graves sur les poumons), Venclexta[®] (anticancéreux, utilisé pour le traitement d'une leucémie), Epclusa[®] (utilisé dans le traitement de l'hépatite C chronique), Norvir[®] (antirétroviral, utilisé pour le traitement de l'infection par le VIH), CRESTOR[®] (hypolipidémiant, permet d'abaisser les taux de cholestérol et de triglycérides). [27] [33]

Notre travail est scindé en deux parties, la première concerne la synthèse de ZnO NPs et l'étude de l'impact de l'association « antibiotique-ZnO NPs » sur l'amélioration de l'activité antimicrobienne par rapport à l'antibiotique seul, et la deuxième partie présente la formulation de dispersions solides amorphes à base de l'acide niflumique, substance anti-inflammatoire faiblement soluble dans l'eau, et l'étude comparative de l'amélioration de la dissolutions de ces dispersions comparé à un produit commercial.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres, le premier chapitre est dédié à une synthèse bibliographique sur les nanoparticules et le deuxième sur les dispersions solides. Le troisième chapitre est consacré à décrire tous le matériel et les méthodes utilisés pour la synthèse, la caractérisation, le contrôle physico-chimique, l'étude toxicologique des NPs de ZnO et l'étude de l'efficacité antimicrobienne de l'antibiotique associé à ZnO NPs ainsi que ceux utilisés pour la formulation, la caractérisation des dispersions solides formulées et l'étude des profils de dissolution des dispersions solides formulées par rapport à un produit commercial. Le dernier chapitre présente les résultats obtenus avec des interprétations et des discussions.

Enfin, cette thèse sera achevée par une conclusion générale dans laquelle l'accent sera mis sur les résultats clés auxquels l'étude a pu aboutir avec des perspectives et des recommandations pour la continuité dans cet axe de recherche.

CHAPITRE 1

NANOPARTICULES ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

CHAPITRE 1

NANOPARTICLES ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

1.1. Définition

La nanotechnologie est le miracle des domaines de la science, de l'ingénierie et de la technologie. Selon la littérature, elle a commencé, par le discours du physicien Richard Feynman, en 1959, lors d'un congrès de la Société Américaine de physique. Cependant, le terme « nanotechnologie » a été inventé en 1974, par le professeur Japonais Norio Taniguchi. [34] [35].

Nano vient du mot grec "nanos", qui signifie petite taille (10^{-9} m) [36]. Les nanoparticules sont de très petites particules, dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm. Elles présentent des propriétés et des caractéristiques chimiques, biologiques et physiques différentes de celles des particules correspondantes à plus grande échelle et ce, à cause de leur taille réduite et de leur rapport surface/volume élevé. [37-41]

Les nanoparticules d'origine naturelle existent dans l'environnement, elles sont présentes dans le sol, les eaux souterraines, les océans, l'atmosphère et autres (incendies de forêt, les éruptions volcaniques, les minéraux argileux et les tempêtes de poussière dans le désert). [37]

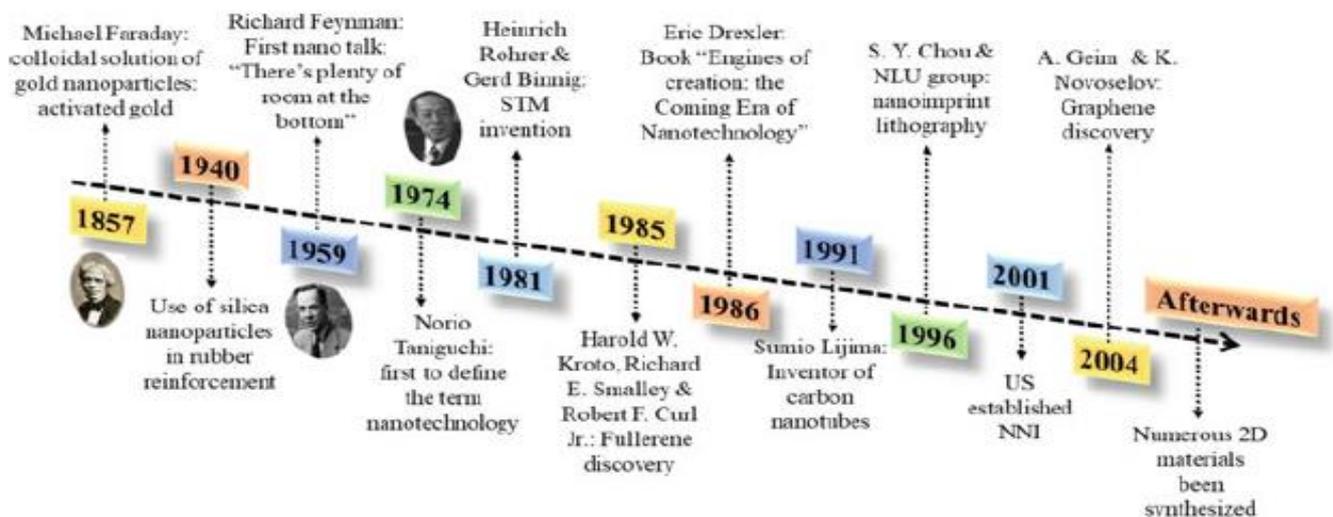


Figure 1.1: Evolution historique des nanomatériaux et de la nanotechnologie [42]

1.2. Classification des nanoparticules

Les nanoparticules sont généralement classées en fonction de leur morphologie, de leurs dimensions, de leur composition, ...etc. Trois morphologies de nanoparticules ont été identifiées, à savoir : sphérique, cristalline et plate. Les NPs sont également classées en quatre types en fonction de leur dimension : 0 dimension tels que nanosphères et les points quantiques, 1D comprend les films minces (utilisés dans les mécanismes de capteurs des appareils électroniques), 2D qui comprend les NPs de deuxième génération telles que les nanotubes de carbone et 3D tels que les dendrimères [43-44]

Selon leur structure chimique, les nanoparticules sont généralement classées en trois catégories : organiques, à base de carbone et inorganiques. [34] [37] [43] [45]

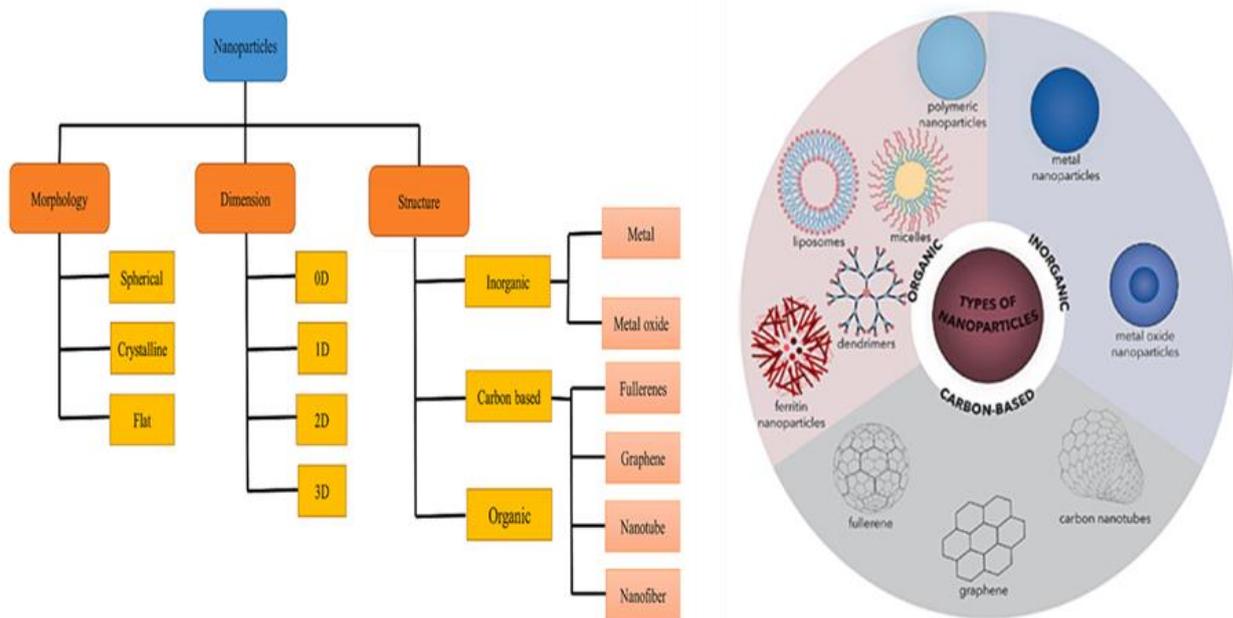


Figure 1.2 : Classification des nanoparticules [34] [45]

1.2.1. Nanoparticules organiques

Cette catégorie comprend les nanoparticules composées de matières organiques tels que les polymères, les protéines, les sucres et les lipides. [46] Les nanoparticules organiques les plus utilisées sont les micelles, les liposomes, la ferritine et les dendrimères. Elles sont utilisées dans le domaine médical et biomédical comme vecteurs pour l'administration ciblée de médicaments ou agents de contraste en imagerie. [43] [46-47]

1.2.2. Nanoparticules à base de carbone

Appelées nanocarbones ou nanomatériaux de carbone, comprennent : les nanotubes de carbone, les fullerènes, le graphène, les nano-fibres de carbone et les points quantiques de carbone (carbon quantum dots). Elles sont utilisées en domaine biomédical, en médecine, en électronique et en énergie. [37] [47-48]

1.2.3. Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques ne contenant pas de carbone, elles se composent généralement de métal ou d'oxyde métallique. Elles possèdent des propriétés et des caractéristiques antibactériennes, sensibilité aux ultraviolets, électriques, thermiques et catalytiques uniques par rapport aux métaux et semi-conducteurs en vrac [37]. Les NPs d'or (Au) sont utilisées comme marqueurs optiques dans le diagnostic médical ou comme agent de traitement contre le cancer, le fer, le nickel et le cobalt comme catalyseurs, l'aluminium comme combustible et le cuivre en électronique. [47]

Les oxydes métalliques nanométriques ont été créés pour modifier les propriétés des NPs métalliques. Les ions négatifs d'oxygène réagissent avec les ions métalliques positifs pour former des composés ioniques d'oxyde métallique. Contrairement aux nanoparticules de fer, l'oxyde de fer (Fe_2O_3) s'oxyde facilement en nanoparticules de fer (Fe), ce qui augmente leur réactivité et leur efficacité. [37] [49] Les oxydes métalliques nanométriques les plus utilisés sont Al_2O_3 , ZnO, TiO_2 et SiO_2 . [37] [47] [50-52]

1.3. Méthodes de synthèse des nanoparticules

Trois méthodes de synthèse des nanoparticules sont décrites dans la littérature, à savoir : les méthodes chimiques, biologiques et physiques. Les plus utilisées sont les méthodes chimiques puis arrivent en deuxième position les méthodes biologiques puis les méthodes physiques. [53]

Ces méthodes sont classées en deux grandes catégories, à savoir : l'approche descendante (Top Down) et l'approche ascendante (Bottom up). [53-55]

L'approche descendante (Top down) comme indique son nom, c'est la miniaturisation, elle consiste à fractionner ou décomposer les grands systèmes ou matériaux en entité de taille nanométriques, par contre l'approche ascendante (Bottom up) consiste à former ou à construire de nanoparticules à partir de molécules plus petites telles que les atomes. [53-54]

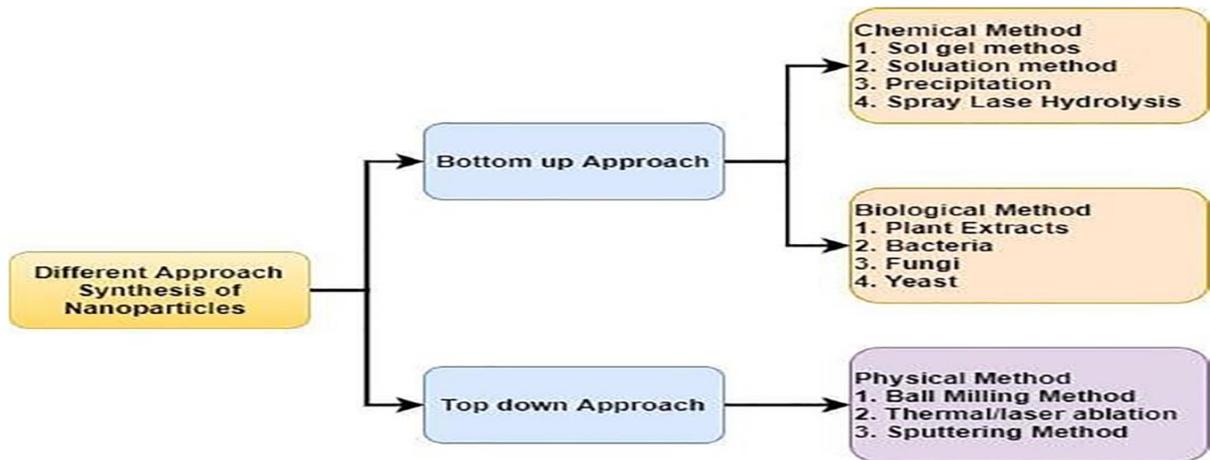


Figure 1.3 : Méthodes de synthèse des nanoparticules [56]

1.3.1. Approche Top Down (TD)

1.3.1.1. Broyage mécanique

C'est une technique très utilisée, elle est simple, économique, rentable et écologique pour produire des matériaux nanométriques à partir des matériaux en vrac. Elle consiste à les broyer à l'aide d'un broyeur à billes. Les nanomatériaux de carbone broyés à billes sont considérés comme une nouvelle classe de nanomatériaux, utilisées pour l'assainissement de l'environnement, le stockage de l'énergie et autres. [37] [44] [57]

1.3.1.2. Ablation laser

L'application de la méthode « Ablation laser » dans les liquides pour la synthèse de nanomatériaux est récente, elle a été lancée par Henglein en 1993. [37] [58]

Elle est utilisée pour fabriquer les nanoparticules à partir d'un matériau en vrac qui est irradié avec un laser à impulsions (Nd:YAG, Ti:Sapphire et un laser à vapeur de cuivre), ce qui entraîne une suspension de nanoparticules. [42]

Le mécanisme d'ablation laser dépend des propriétés physiques des métaux et du milieu. Il s'agit d'une méthode complexe qui consiste à vaporiser un matériau à l'aide d'un laser puissant dans un environnement liquide ou gazeux, la substance vaporisée se condense pour former des nanoparticules. [37] [58]

Les conditions tels que : la durée, la longueur d'onde, la puissance du laser et le milieu influent sur les nanoparticules synthétisées. La méthode d'ablation laser convient à la fabrication de nanoparticules homogènes et monodispersées avec un taux de production élevé. [42]

1.3.1.3. Nanolithographie

C'est la fabrication des motifs à l'échelle nanométrique sur une surface. Il existe plusieurs techniques telles que lithographies : à sonde à balayage, optique, multi-photonique, nano-implosion et par faisceau d'électrons. Les capteurs, les puces mémoires et les microprocesseurs sont des composants nanométriques fabriqués par la méthode nanolithographie. [37] [44] [59]

1.3.1.4. Pulvérisation

La pulvérisation est le dépôt d'une couche fine des nanoparticules sur une surface en éjectant des particules par collision avec des ions, suivi d'un traitement thermique [44]. Le processus de pulvérisation consiste à bombarder le matériau avec des particules à haute énergie (ions) pour produire des NPs. [37]

Les paramètres de pulvérisation tels que, la température, l'épaisseur de la couche, l'énergie des ions et la composition du matériau influent sur la forme et la dimension des nanoparticules formées. [37] [44]

1.3.2. Approche Bottom Up (BU)

1.3.2.1. Sol-gel

Cette une méthode de chimie douce simple et pratique, elle est généralement utilisée pour la synthèse des nanoparticules d'oxyde métallique [37] [42]. Elle permet la fabrication d'une grande variété de nanomatériaux, y compris les matériaux multicomposants (verre, céramique, film, fibre, matériaux composites, ...etc.). [48] [60]

Les mots « sol » et « gel » ont été utilisés pour la première fois en 1845, par M. Ebelman. [42]

Il s'agit de préparation de solutions contenant des composés métalliques comme source d'oxydes. Ces composés subissent une hydrolyse et une polycondensation à température basse, puis se solidifient en gel humide. [61]

La récupération des nanoparticules synthétisées s'effectue par diverses méthodes telles que la sédimentation, la filtration et la centrifugation, ensuite, le résidu est récupéré après séchage. [37] [44]

Les matériaux de départ et les conditions de traitement donnent lieu à une large gamme de matériaux fonctionnels. [61]

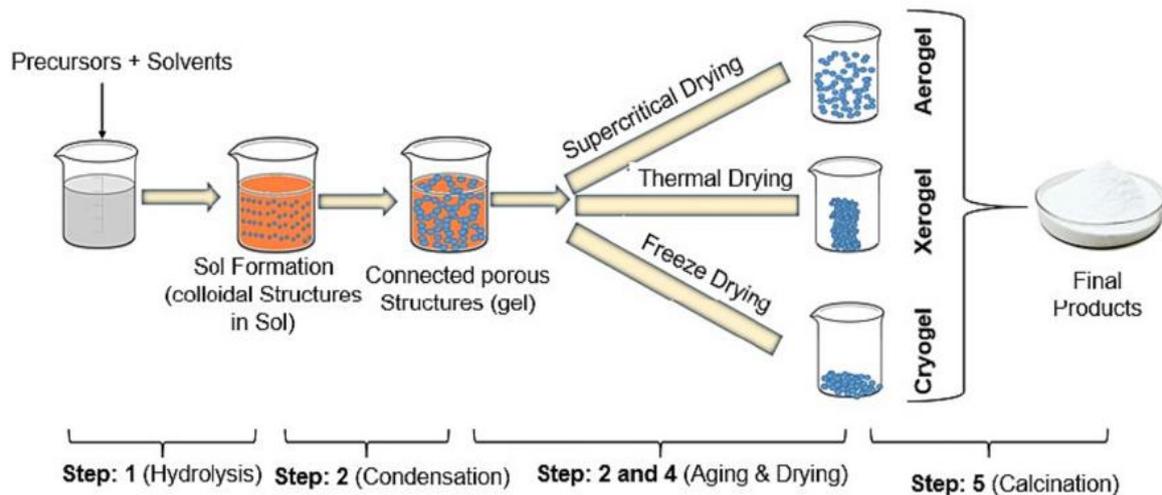


Figure 1.4 : Schéma de synthèse par la méthode sol-gel [53]

1.3.2.2. Dépôt chimique en phase vapeur

Contrairement à la méthode physique en phase vapeur, l'approche de dépôt chimique en phase vapeur implique la réaction des vapeurs chimiques contenant des précurseurs volatils avec le matériau. Le film mince du matériau est déposé sur un substrat. Cette approche est très utilisée pour la fabrication des semi-conducteurs. [37] [42] [62]

1.3.2.3. Pyrolyse

La pyrolyse est une transformation chimique ou décomposition d'un matériau à une température élevée et dans une atmosphère inerte. La pyrolyse par pulvérisation consiste à éjecter des précurseurs de nanoparticules sous forme de vapeur à l'aide d'un nébuliseur dans le réacteur chaud. Tandis que la méthode de pyrolyse au laser implique que les précurseurs absorbent l'énergie du laser pour la préparation des nanoparticules. Pour la pyrolyse à la flamme, les précurseurs liquides sont directement pulvérisés dans la flamme. [42]

1.3.2.4. Biosynthèse

C'est une approche de synthèse rentable, écologique et verte, implique l'utilisation de différents micro-organismes (tels que les bactéries, les champignons, les levures, les microalgues et les virus) et produits végétaux (plantes) pour la synthèse de nanoparticules. Le processus de synthèse biologique ne nécessite ni de température élevée, ni de pression, ni l'utilisation de produits chimiques toxiques. [37] [42]

1.4. Oxyde de zinc

Le zinc est un oligo-élément essentiel dans l'organisme, il joue un rôle vital dans diverses fonctions physiologiques, telles que l'activation des enzymes pour la synthèse et la digestion des protéines et des acides nucléiques, les processus antioxydants, la coagulation du sang et le métabolisme osseux [45] [63]. Le Zn^{2+} est un antagoniste du Ca^{2+} intracellulaire, il est indispensable pour l'expression des gènes et dans l'immunité. La carence en zinc se manifeste par des troubles cutanés et muqueux, des troubles digestifs et immunitaires, un retard à la cicatrisation et diminution de la croissance et du développement chez les enfants. [64]

Le zinc a été isolé et identifié la première fois en 1746, par réduction de la calamine et du charbon, par le pharmacien et le chimiste « Andreas Marggraf » qui a décrit par la suite la théorie et méthode de production du zinc. [65]

L'oxyde de zinc « ZnO » est un semi-conducteur qui possède une bande interdite élevée de 3,37 eV à température ambiante et de 3,34 eV à basse température et une énergie de liaison de l'exciton de 60 meV, assez élevée par rapport à GaN et GaAs, ce qui lui confère des propriétés électriques et optiques particulières permettant son utilisation dans le domaine optoélectronique (diodes électroluminescentes, les photodétecteurs et les diodes laser). [66-68]

L'oxyde de zinc appartient au groupe II-IV, se cristallise dans une structure cubique de zinc-blende ou hexagonale de wurtzite. Il est présent en trois structures cristallines à savoir : wurtzite, blende et rocksalt, dont la structure wurtzite est considérée comme la plus stable, elle appartient au groupe d'espace $P63mc$ (ou C_{6v}^4). [66] [69-70]

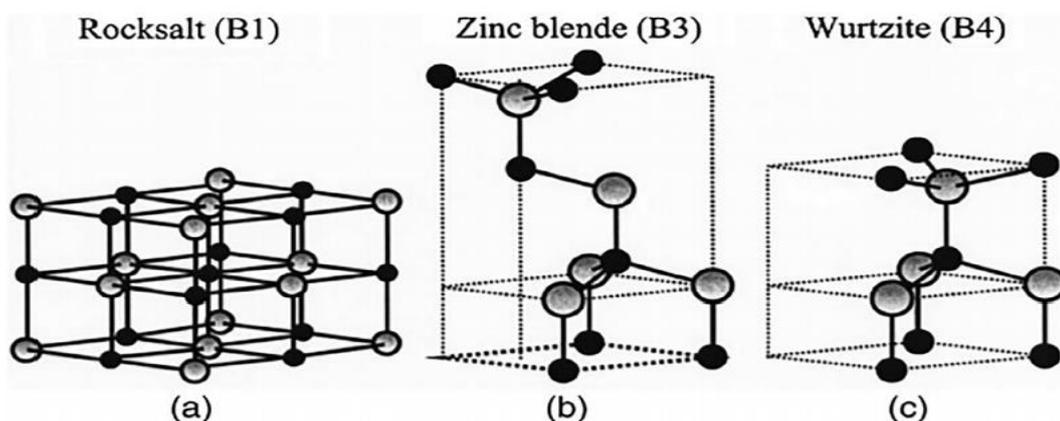


Figure 1.5 : Structures cristallines de ZnO. (a) Rocksalt, (b) Zinc blende et (c) Wurtzite [69]

Plusieurs méthodes de Synthèse de ZnO NPs sont décrites dans la littérature, telles que : la méthode hydrothermale, la méthode de dépôt en phase vapeur, la méthode sol-gel et la méthode de co-précipitation. [66] [68] [71]

Les NP de ZnO sont largement utilisées dans l'industrie, l'agriculture, le domaine biomédical, en cosmétologie et dans les thérapies antivirales, anticancéreuses et antibactériennes. [72-73]

1.5. Applications thérapeutiques des nanoparticules

Ces dernières années, l'émergence rapide de la résistance aux antibiotiques, a rendu certains traitements inefficaces. La résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation majeure, signalée comme une urgence de santé mondiale et un défi pour les chercheurs afin de développer de nouvelles thérapies novatrices. Selon les statistiques disponibles, la résistance aux antibiotiques est responsable de plus de 700 000 morts par an, ce chiffre peut atteindre 10 millions morts d'ici 2050. De plus, les infections dues aux bactéries résistantes aux antibiotiques telles que celles causées par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*, entraînent l'hospitalisation des patients avec une charge financière importante. [45] [74-75]

Selon l'inserm (2017), en France plus de 750 000 patients contractent une infection nosocomiale, soit une personne sur vingt, les bactéries responsables de plus de 50 % des infections nosocomiales sont : *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%), *Staphylococcus aureus* (16%) et *Escherichia coli* (26%). Ces infections sont la cause directe de 4 000 décès. [76-77]

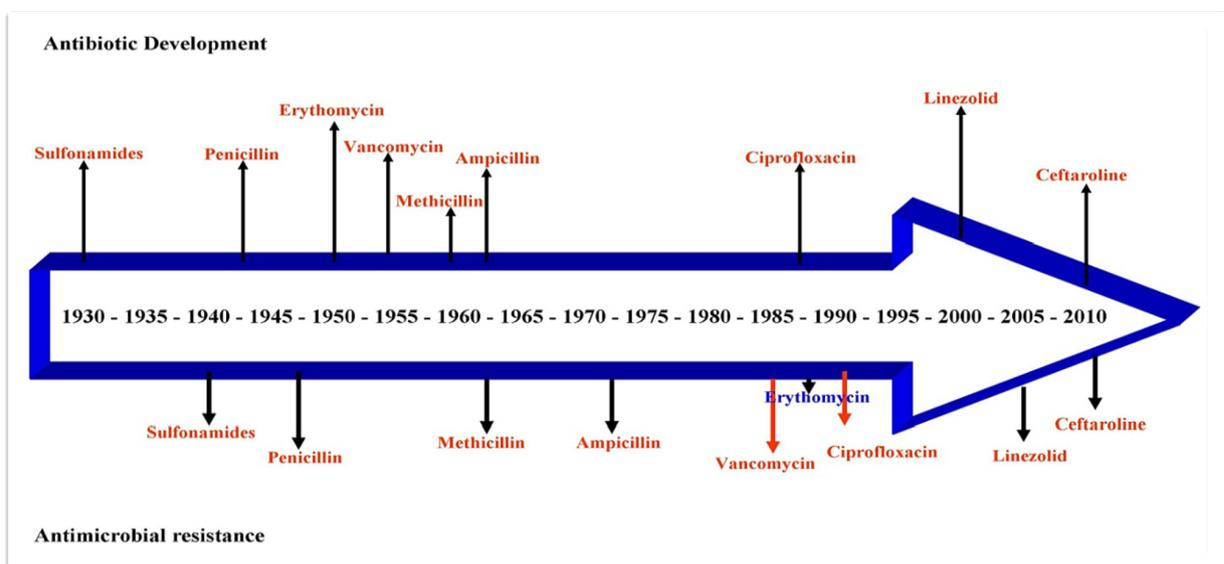


Figure 1.6 : Développement des antibiotiques et l'apparition de la résistance au fil du temps [78]

Les nanoparticules ont fait l'objet de plusieurs recherches et études pour application dans le domaine de la médecine, elles sont utilisées comme :

- Nano-vecteurs de médicaments ou de gènes :

Les nanoparticules permettent la délivrance des médicaments aux sites cibles en évitant la dispersion du médicament dans l'organisme (sans toucher les tissus sains), en augmentant les concentrations actives et la biodisponibilité du médicament tout en réduisant sa toxicité. Le Myocet liposomal dont la substance active est le doxorubicine, est un médicament anticancéreux utilisé avec un autre médicament pour le traitement des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique, Il agit sur l'ADN des cellules en les empêchant de dupliquer l'ADN et de fabriquer des protéines, dont les cellules cancéreuses ne peuvent se diviser et finissent par mourir. Le médicament Caelyx pegylated liposomal contient la substance active « chlorhydrate de doxorubicine » encapsulé dans des liposomes contenant en surface du « Méthoxypolyéthylène glycol », fabriqué par le procédé « Pégylation » qui permet de protéger les liposomes d'une détection par le système phagocytaire mononucléaire, ce qui augmente leur durée de vie dans le sang. Il est utilisé pour le traitement du cancer du sein métastatique, le cancer de l'ovaire avancé chez les femmes, le sarcome de Kaposi chez les patients atteints du SIDA et le myélome multiple (cancer des cellules de la moelle osseuse). [79-81] En thérapie génique, dans la phase I d'une étude clinique, le gène E1A d'adénovirus encapsulé dans un liposome pegylé a été injecté une fois par semaine dans la cavité thoracique ou péritonéale de 18 patientes atteintes d'un cancer avancé du sein (n 5 6) ou de l'ovaire (n 5 12) a montré des résultats prometteurs favorisant le passage à la phase II de l'étude clinique. Plusieurs produits sont en cours d'études. [79] [82]

D'autres utilisations des NPs sont citées dans la littérature telle que l'ablation thermique, le diagnostic in vivo et l'imagerie.

Cependant, les nanoparticules inorganiques (les métaux et les oxydes métalliques) sont plus prometteurs et ont suscitées une grande attention en tant que nano-véhicules à cause de leurs caractéristiques dans la protection, la biodisponibilité, le transport et la pénétration du médicament au site cible et en tant que nano-biocides à cause de leurs propriétés et efficacité antimicrobienne, capables de détruire ou d'inhiber la croissance des agents pathogènes résistants aux antibiotiques. [45]

Les revêtements de surface à base d'oxyde métallique nanométrique se sont révélés comme méthode alternative efficace contre les infections nosocomiales. [76]

La taille nanométrique des oxydes métalliques présente un effet important sur leur activité antimicrobienne. Leur efficacité est liée à leur potentiel à pénétrer et perturber la membrane des

cellules microbiennes. Trois mécanismes d'action des NPs des oxydes métalliques contre les bactéries sont décrits dans la littérature, à savoir : la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), la libération d'ions et le contact direct avec la paroi des bactéries. [45] [76] [78] [83-84]

Les NPs métalliques telles que l'or (Au), l'argent (Ag), le cuivre (Cu) et les NPs d'oxyde métallique telles que l'oxyde de zinc (ZnO), l'oxyde de titane (TiO₂), l'oxyde de magnésium (MgO) et l'oxyde de fer (Fe₃O₄) sont les plus utilisées pour la thérapie antibactérienne. [45] [74] [85]

Les NPs de ZnO sont largement utilisées dans le domaine médical, leurs propriétés justifient leur utilisation dans nombreuses applications biomédicales, telles que l'ingénierie tissulaire, les systèmes d'administration de médicaments, les revêtements antimicrobiens, l'imagerie et en thérapie antibactérienne. [45]

Les NPs de ZnO ont un large spectre d'activité antimicrobienne contre plusieurs pathogènes tels que : *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* et *Escherichia coli* [83]. Selon les études réalisées, le ZnO NPs a présenté un effet bactéricide contre le *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (MSSA), le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et le *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méthicilline (MRSE). [86]

Le ZnO NPs endommage les cellules bactériennes par perturbation de leur potentiel et leur intégrité et par production des ROS. [83] [87]

Les nanoparticules de ZnO ont démontré un potentiel considérable en tant qu'agents antimicrobiens présentant des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales en raison de leur taille nanométrique, leur grande surface, leur réactivité élevée de surface et leur capacité à absorber le rayonnement UV [88-89]

De ce fait, parmi les stratégies adoptées pour lutter contre la résistance aux antibiotiques est l'association des antibiotiques aux NPs d'oxydes métalliques. [74] Plusieurs études ont montré que l'activité antibactérienne de plusieurs antibiotiques a été améliorée en présence des NPs de ZnO. La figure ci-dessous illustre l'action des antibiotiques chargés de nanoparticules

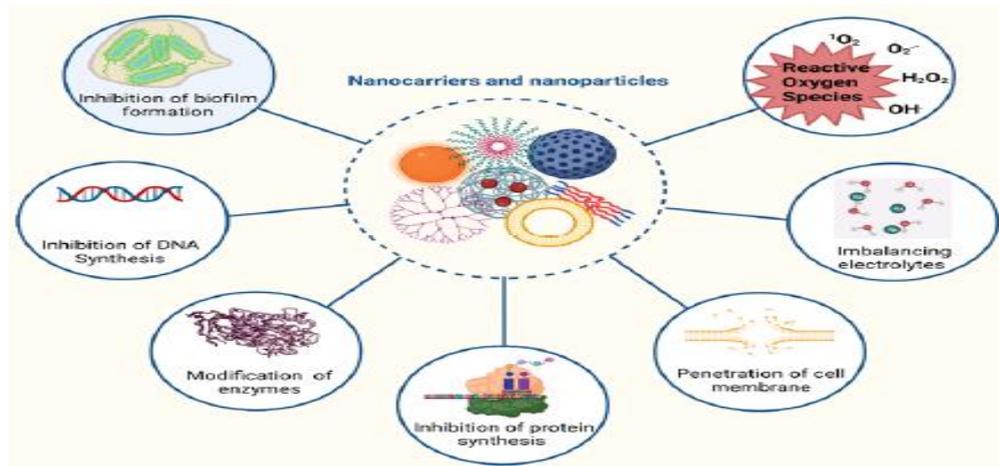


Figure 1.7 : Modes d'action des antibiotiques chargés des nanoparticules [90]

Thati et al. (2010) ont observé une amélioration de l'activité antibactérienne contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, des antibiotiques β -lactamines (pénicilline et amoxicilline/acide clavulanique), amikacine et céphalosporines (céfalexine, céfotaxime, et ceftazidime) associés aux ZnO NPs [74]

Sharma et al. (2015) ont noté la présence d'un effet antibactérien synergique ou additif lors de la combinaison du ZnO NPs avec « ciprofloxacine » et « ampicilline ». [91]

Abo Shama et al. (2020) ont noté un bon effet synergique entre les antibiotiques : azithromycine, oxacilline, céfotaxime, céfuroxime, fosfomycine et oxytétracycline et les NPs de ZnO, contre les bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. [92]

Abdelghafar et al. (2022) ont démontré l'amélioration de l'activité antibactérienne des antibiotiques : methicilline, céftriaxone, céfotaxime, tetracycline, ciprofloxacine, gentamicine, erythromycine, azithromycine, vancomycine, clindamycine et chloramphenicol en présence de ZnO NPs contre la bactérie *Staphylococcus aureus*. [93]

Sharif et al. (2021) ont montré que le ZnO NPs a présenté un effet synergique avec l'antibiotique « Lévofloxacine » contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA). [94]

Al-Taie et al (2022) ont constaté l'amélioration de l'activité antibactérienne de l'antibiotique « Ceftriaxone » contre la bactérie *Escherichia coli*, en présence de ZnO NPs. [95]

Ces résultats prometteurs ouvrent la voie vers une future thérapie antibactérienne combinée pour lutter contre la résistance des bactéries aux antibiotiques conventionnels.

1.6. Mécanisme d'action des NPs de ZnO contre les microorganismes pathogènes

Les NPs de ZnO sont très stables dans les conditions physiologiques, cependant, dans un pH légèrement acide, elles subissent une dissolution rapide en ions Zn^{2+} [45] [35] [96]. Les NPs de ZnO chargées positivement interagissent avec la paroi cellulaire ou la membrane microbienne chargée négativement par le biais de forces électrostatiques. Les NPs de ZnO se fixent alors à la surface, ce qui conduit à l'internalisation et l'accumulation des NPs à l'intérieur de la cellule bactérienne et provoque la perte de l'intégrité cellulaire, la fuite des composants intracellulaires et la mort de la cellule [45] [67] [88] [96-97]. D'autre part, les NPs de ZnO génèrent des espèces réactives à l'oxygène (ROS), tels que le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde et l'ion hydroxyle qui provoquent un stress oxydatif par peroxydation des lipides, une perturbation et dommages à l'ADN, une inhibition du métabolisme énergétique et de la respiration cellulaire. [88] [96-97], comme illustré ci-dessous :

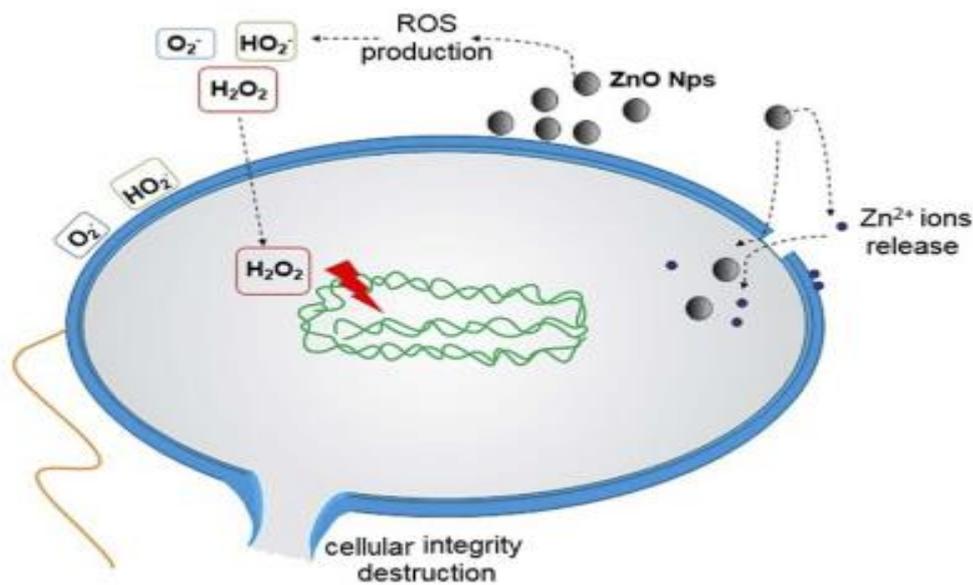


Figure 1.8 : Mécanismes d'action suggérés des NPs de ZnO contre les bactéries. (1) Libération des ions Zn^{2+} , (2) Production de ROS et (3) L'internalisation dans la cellule bactérienne et le contact direct provoquent la perte de l'intégrité cellulaire. [67]

CHAPITRE 2

DISPERSIONS SOLIDES

CHAPITRE 2

DISPERSIONS SOLIDES

2.1. Introduction

L'amélioration de la solubilité des médicaments peu solubles dans l'eau représente un défi majeur pour les chercheurs dans l'industrie pharmaceutique, car ils ont tendance à présenter une faible biodisponibilité orale. Il est estimé qu'environ 40 % des produits commercialisés et 90 % des molécules en cours de développement sont peu solubles dans l'eau. Les laboratoires pharmaceutiques examinent chaque année des milliers de nouvelles molécules, mais plusieurs d'entre elles sont abandonnées à cause de leur faible solubilité aqueuse. [98-101]

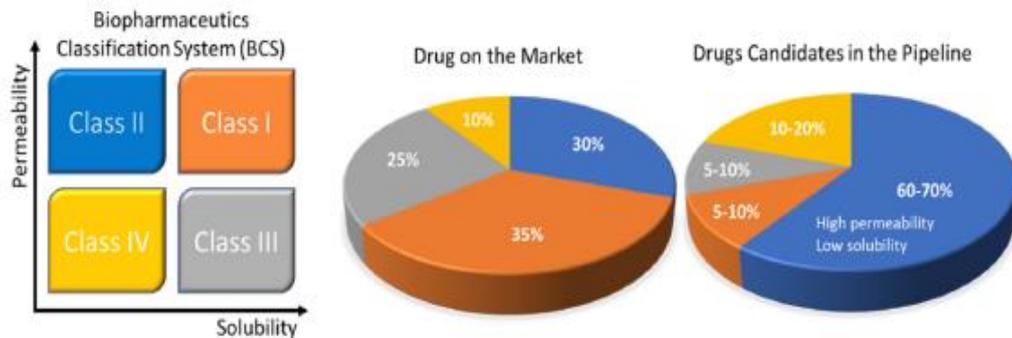


Figure 2.1 : Distribution estimée des produits commercialisés et en cours de développement, selon le Système de Classification Biopharmaceutique [33]

Le médicament administré par voie orale doit être dissout dans les fluides gastro-intestinaux aqueux en quantité suffisante pour avoir un effet thérapeutique. La substance médicamenteuse doit être dissoute dans les fluides gastro-intestinaux dans un premier temps puis traverser la membrane GI pour gagner la circulation sanguine et atteindre à la fin la cible en quantité suffisante. Si la solubilité du médicament dans les fluides gastro-intestinaux n'est pas suffisante, l'absorption sera limitée, ce qui affectera la biodisponibilité et donc l'effet thérapeutique du médicament. [98]

Plusieurs techniques ont été décrites dans la littérature en vue d'augmenter la concentration de la substance active dans les fluides gastro-intestinaux et améliorer la biodisponibilité du médicament telles que : la méthode du co-solvant, la micronisation, l'utilisation des tensioactifs et la complexation. La formulation de « Dispersion solides » et plus particulièrement « Dispersion solides amorphes » s'est avérée comme étant la stratégie la plus prometteuse. [98] [100-101]

2.2. Définition des dispersions solides

Le terme "dispersion solide" a été défini par Chiou et Riegelmann en 1971, comme « une dispersion d'une ou plusieurs substances actives dans un support inerte à l'état solide, préparée par fusion, solvant ou fusion-solvant ». [98] [101]

La dispersion solide est le mélange moléculaire de la substance active faiblement hydrosoluble dans un support hydrophile (amorphe ou cristallin), qui entraîne souvent une augmentation du taux de dissolution et une super-saturation du médicament lorsque ce système est exposé à l'eau. Cela revient à plusieurs facteurs tels que l'amélioration de la mouillabilité de la substance active par le polymère, la réduction de la taille des particules, la séparation des particules individuelles de la substance par les particules de polymère et la prévention subséquente de la précipitation du médicament au contact des milieux aqueux. [98]

2.3. Critères de sélection du polymère

La sélection du support présente un effet important sur la réussite de la formulation de dispersion solide. [102]

Les supports manifestent un rôle crucial dans la formulation des dispersions solides. Ils peuvent être hydrophiles, hydrophobes ou gonflables à l'eau. Ils peuvent être utilisés comme retardateurs ou améliorateurs de libération de la substance active.

La dissolution des substances médicamenteuses faiblement solubles dans l'eau dépend également de la nature du support utilisé.

Le support utilisé dans la formulation des dispersions solides doit être :

- Soluble dans l'eau et dans divers solvants.
- Inerte pharmacologiquement et non toxique.
- Stable à la chaleur.
- Compatible avec la substance active. [103-104]

2.3.1. Exemples de polymères utilisés dans les dispersions solides

Plusieurs supports ont été utilisés dans la formulation de dispersions solides, ils déterminent les propriétés finales de la formulation. [105]

Le tableau ci-dessous représente quelques polymères utilisés dans la formulation des dispersions solides.

Tableau 2.1 : Polymères utilisés dans la formulation de dispersions solides

Polymère	Substance active	Technique	Référence
Compritrol 888 ATO	Metformine HCl	Evaporation du solvant	[104]
Dextrin	Amlodipine micronisé	Séchage par atomisation	[104]
Eudragit S100	Berberine HCl	Evaporation du solvant	[104]
Mannitol	Diazepam	Séchage par atomisation	[104]
Poloxamer 188	Losartan potassium	Extrusion à chaud	[104]
Poloxamer F68/P85	Docetaxel	Lyophilisation	[105]
Soluplus	Telmisartan	Extrusion à chaud	[104]
		Séchage par atomisation	[104]
	Carbamazepine	Extrusion à chaud	[102]
	Sorafenib	Séchage par atomisation	[105]
HPMC	Everolimus	Co-precipitation	[105]
HPMC AS	Paclitaxel	Evaporation du solvant	[105]
HPMC : Silice mesoporeuse	Indomethacine	Extrusion à chaud	[104]
HPMC / PEG	Docetaxel	Evaporation du solvant	[105]
Hydroxypropyl cellulose	β -carotene	Extrusion à chaud	[102]
Povidone K 12	Cyclosporine A	Extrusion à chaud	[102]
Povidone K 30	Bicalutamide	Evaporation du solvant	[105]
	Raloxifene	Séchage par atomisation	[105]
Povidone K 17	Oridonin	Fluide supercritique	[105]
Polyéthylène glycol	Etoposide	Fusion	[105]
CO ₂ /Menthol	Letrozol	Fluide supercritique	[105]

2.4. Solubilité

La solubilité du médicament reste l'un des aspects les plus délicats lors du développement des formulations, elle est déterminante pour la biodisponibilité et donc l'absorption du médicament dans le tractus gastro-intestinal. [100] [103]

La solubilité d'une substance est la quantité qui passe en solution lorsque l'équilibre est atteint entre la solution et l'excès (la substance non dissoute à une température et pression données). La substance à dissoudre est appelée « soluté » et le liquide dans lequel le soluté est dissous est

appelé « solvant », formant ensemble une « solution ». [103] [106] Donc, c'est la quantité de soluté dissoute dans un volume donné de solvant [33]

Le tableau ci-dessous présente les différents termes de solubilités utilisés par l'USP et la Pharmacopée Européenne.

Tableau 2.2 : Différents termes de solubilité selon l'USP 41^{ème} et Ph. Eur. 10^{ème} édition [106]

Termes descriptifs	Volumes approximatifs de solvants en millilitres par gramme de substance	Concentrations correspondantes en mg/ml
Très soluble	< 1	> 1000
Facilement soluble	1 à 10	100 à 1000
Soluble	10 à 30	33 à 100
Assez soluble	30 à 100	10 à 33
Peu soluble	100 à 1000	1 à 10
Très peu soluble	1000 à 10000	0,1 à 1
Pratiquement insoluble	> 10000	< 0,1

2.5. Dissolution

La cinétique de dissolution d'un médicament est décrite par l'équation de Nernst-Bruner comme suit :

$$\frac{dM}{dt} = K_d (C_s - C) \quad (2.1)$$

Avec $C = \frac{M}{V}$

Où :

- k_d Constante, dépend des facteurs tels que le coefficient de diffusion, la surface totale, ...etc.
- C_s Solubilité de la substance active
- C Concentration de la substance active dissous au temps t
- M Masse de la substance active dissoute dans un volume V de liquide gastro-intestinal

Les substances actives peu solubles produisent une faible quantité de substance active "dissoute" car C_s est intrinsèquement faible. En outre, La dissolution a tendance à être lente pour les

substances peu solubles. Ces facteurs font que la substance faiblement soluble est également faiblement biodisponible. Si l'on considère la concentration C de l'équation (2.1) comme la concentration de la substance active "dissoute" dans les fluides gastro-intestinaux, le taux d'absorption est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'absorption} = K_a C \quad (2.2)$$

Où K_a est une constante présentant le taux d'absorption qui dépend de la surface spécifique et la perméabilité membranaire, ...etc.

Bien que les équations (2.1) et (2.2) représentent une version trop simplifiée de la dissolution d'une substance dans la voie gastro-intestinale, elles indiquent qu'une solubilité apparente croissante à saturation « C_s » améliorera la biodisponibilité orale en améliorant également le taux de dissolution. [98]

2.6. Classification du Système Biopharmaceutique

La solubilité est une propriété intrinsèque de la substance médicamenteuse, elle joue un rôle crucial dans la dissolution, l'absorption et donc la biodisponibilité du médicament. C'est pourquoi la solubilité est prise en considération dans le BCS. [27] [29]

Le Système de Classification Biopharmaceutique (BCS) a été introduit par *Amidon et al.* en 1995 pour faciliter le développement des médicaments. Il classe les substances médicamenteuses par rapport à leur solubilité dans l'eau et leur perméabilité, facteurs influant sur la dissolution et l'absorption du médicament administré par voie orale. [27] [33] [98]

Une substance active est considérée comme hautement soluble quand sa dose maximale est soluble dans un volume inférieur ou égal à 250 ml, de milieu aqueux sur une gamme de pH allant de 1 à 7,5 [33]. Ainsi les substances actives sont classées en quatre classes :

- Classe I : hautement soluble, hautement perméable
- Classe II : faiblement soluble, hautement perméable
- Classe III : hautement soluble, faiblement perméable
- Classe IV : faiblement soluble, faiblement perméable [103] [106-107]

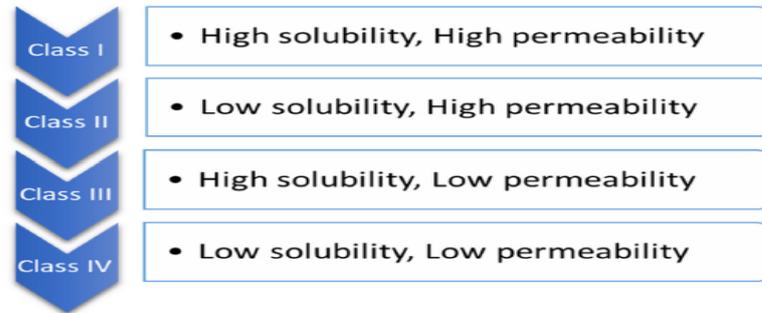


Figure 2.2. : Schéma de classification biopharmaceutique des substances [33]

2.7. Classification des dispersions solides

La classification des dispersions solides est présentée sur le tableau ci-dessous.

Tableau 2.3 : Classification des dispersions solides [98] [108]

Etat de la substance active	Nombre de phases	
	1	2
Cristallin	Solution solide	Mélange Eutectique
Amorphe	Solution vitreuse	Suspension vitreuse

2.7.1. Mélange eutectique

Un mélange eutectique est constitué de deux composés qui sont miscibles à l'état liquide (fondu) et partiellement miscible à l'état solide. Les deux composés ont leurs propres points de fusion, cependant, le point de fusion du mélange est inférieur à celui de l'un des deux composants (A et B fondu au point eutectique E dans la figure 2.3). [33] [98] [105]

À une composition spécifique (E dans la figure 2.3), les deux composants cristallisent simultanément lorsque la température est réduite. Si des mélanges de compositions différentes de la composition eutectique sont refroidis, l'un des composants commencera à cristalliser avant l'autre, ce qui conduit initialement à un mélange de composé solide pur et liquide.

La microstructure d'un mélange eutectique est différente de la microstructure des deux composants. Il a été démontré que les eutectiques des substances peu solubles et des supports inertes solubles dans l'eau améliorent la dissolution de la substance peu soluble. Lorsque l'eutectique est exposé à l'eau ou aux fluides gastro-intestinaux, le support se dissout rapidement et

libère la substance active. Grâce à la surface élevée et à la mouillabilité améliorée du support, la vitesse de dissolution de la substance active est améliorée. [98]

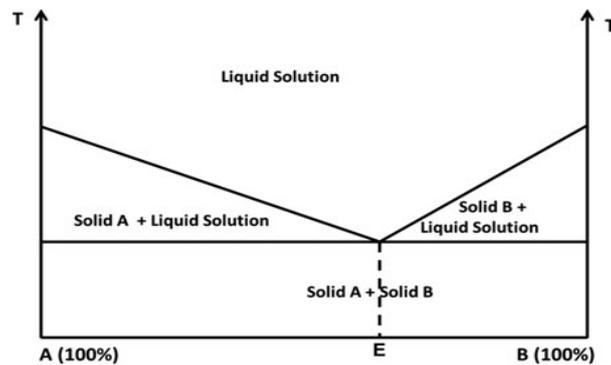


Figure 2.3 : Diagramme de phases d'un mélange eutectique [98]

2.7.2. Solutions solides :

Selon Moore et Wildfong 2009 « Les solutions solides se forment lorsque le soluté est incorporé de manière non stœchiométrique dans le réseau cristallin du support ».

Les solutions solides sont classées en fonction de la solubilité du soluté dans le réseau cristallin en solutions solides continu ou en solutions solides discontinu ou bien en fonction de la distribution des molécules de soluté dans le support. Le terme "solution solide" est utilisé généralement pour les systèmes qui contiennent un support cristallin. [98] [105]

- Solutions solides continues

Selon Leuner et Dressman 2000, « les composants sont totalement miscibles dans les solutions solides continues, si la force de liaison entre les deux composants est supérieure à celle des composants individuels ». [98] [105]

- Solutions solides discontinues

Le terme « solutions solides discontinues » est utilisé vu que la solubilité ou la miscibilité d'un composant dans l'autre est limitée. Chaque composant est capable de dissoudre complètement l'autre dans une région spécifique (régions α et β sur la figure 2.4), la capacité de solubiliser les composants dépend de la température. [98]

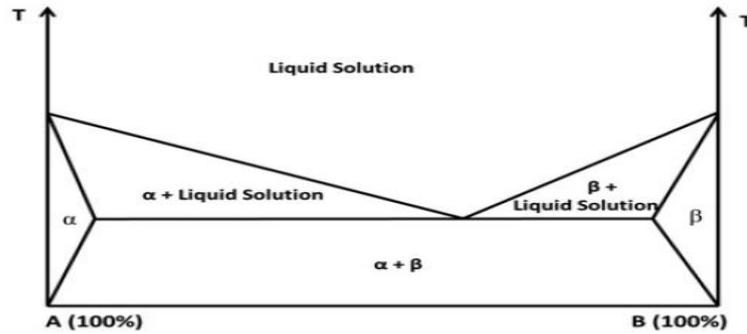


Figure 2.4 : Schéma représentatif de solution solide discontinue [98]

2.7.3. Solutions vitreuses

Dans les solutions vitreuses, les molécules de soluté sont dispersées dans un support amorphe (tels que le PVP et les dérivés de cellulose), elles sont donc considérées comme des systèmes amorphes monophasés et des systèmes d'administration de médicaments supersaturés, capables de maintenir des niveaux de supersaturation élevés dans les fluides gastro-intestinaux, augmentant ainsi le taux d'absorption et la biodisponibilité du médicament. [98] [109]

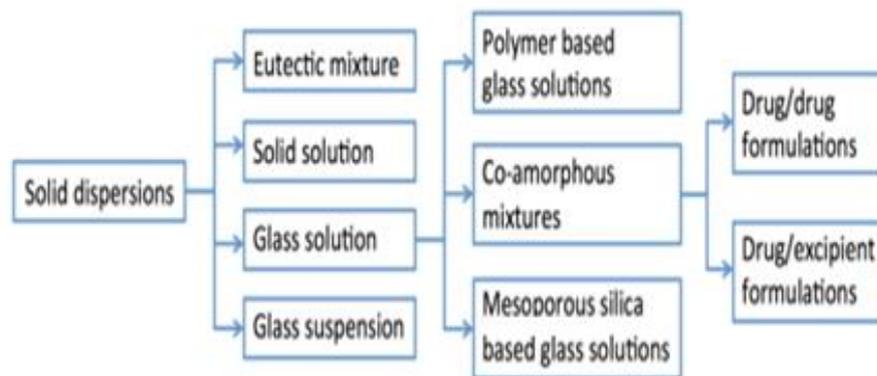


Figure 2.5 : Classification des dispersions solides [108]

2.8. Générations de dispersions solides

Les dispersions solides sont classées selon la nature des excipients utilisés (supports) et l'évolution technologique de leurs méthodes de fabrication en dispersions solides de première, deuxième, troisième et quatrième génération. L'évolution de la première à la quatrième génération était dans le but d'augmenter le taux de dissolution et la stabilité physique de la dispersion solide. [98] [110]

- Dispersions solides de première génération

Fabriquées à base de supports cristallins tels que l'urée, le sorbitol et le mannitol. La substance active est dispersée dans le support pour former un mélange eutectique ou monotectique. Dans ce type de dispersion, il se forme une dispersion solide cristalline thermodynamiquement stable qui libère le médicament lentement. La dissolution des dispersions solides amorphes (DSA) est plus rapide que celle de dispersions solides cristallines. [104-105] [110]

- Dispersions solides de deuxième génération

La substance active faiblement soluble dans l'eau est dispersée dans un support amorphe. Elles comprennent principalement les solutions vitreuses ou les suspensions solides amorphes. Les supports qui peuvent être utilisés : polymères synthétiques tels que povidone (PVP), crospovidone et polyéthylène glycol (PEG), polymères naturels tels que l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) et l'hydroxypropylcellulose (HPC), ou autres tels que l'amidon de maïs, l'amidon de pomme de terre et le saccharose. [104-105] [110]

Les dispersions solides de deuxième génération se sont avérées plus efficaces que les dispersions solides de première génération en raison de leur stabilité thermodynamique. [104]

- Dispersions solides de troisième génération

Les dispersions solides de troisième génération combinent plusieurs excipients tels que les polymères amorphes (Povidone), les tensioactifs et/ou les émulsifiants (Poloxamer, Tween 80, Soluplus[®], Gelucire 44/14, Compritol 888 ATO, Laurylsulfate de sodium (SLS)). [105] [110]

L'utilisation de surfactants ou d'émulsifiants permet d'améliorer le taux de dissolution du médicament ainsi que la stabilité physique et chimique de la substance active dans la dispersion solide formée. [104]

- Dispersions solides de quatrième génération

Ce type de dispersions peut être appelé « Dispersions solides à libération contrôlée ». Les supports utilisés sont soit hydrosolubles, soit hydrophobes. L'amélioration de la solubilité et de la libération prolongée du médicament de manière contrôlée sont les deux objectifs de cette préparation. Les supports hydrosolubles tels que l'éthylcellulose, l'Eudragit RS, l'Eudragit RL et l'HPC sont utilisés. [104]

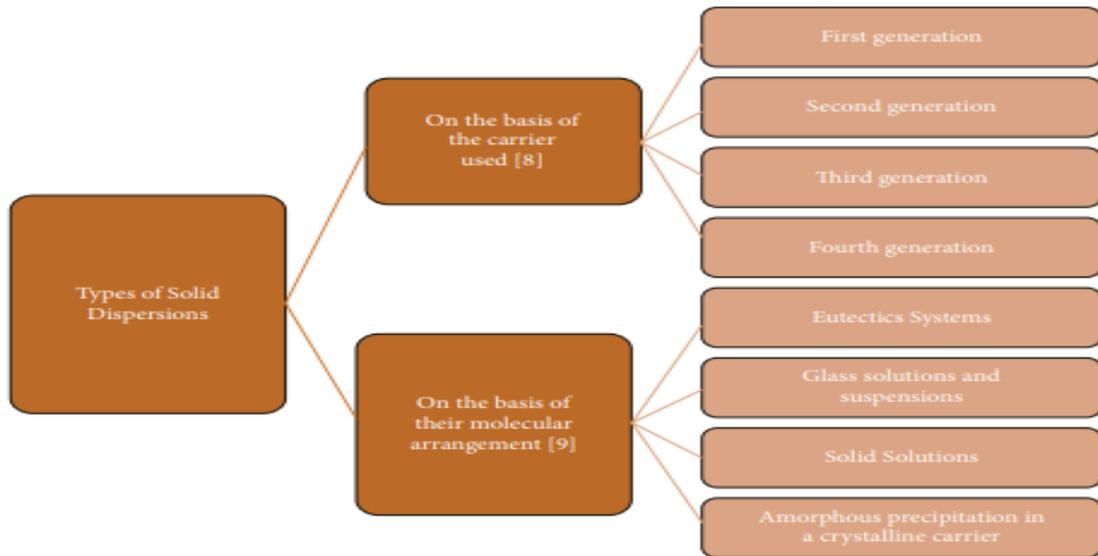


Figure 2.6 : Classification des dispersions solides [106]

2.9. Méthodes de préparation des dispersions solides

Les méthodes de fabrication des dispersions solides sont classées en trois catégories :

- Méthodes d'évaporation de solvant : dans lesquelles la substance active et le polymère sont dissous dans un solvant organique qui est ensuite évaporé pour former une dispersion solide, telles que : le séchage par pulvérisation (spray drying), l'électropulvérisation (electrospraying), lyophilisation, traitement cryogénique et l'évaporation rotative (rotary evaporation).
- Méthodes de fusion : le mélange physique de la substance active et du polymère est fondu et solidifié rapidement pour former une dispersion solide. Elles comprennent l'extrusion à chaud (Hot-Melt Extrusion), fusion, agglomération à l'état fondu et KinetiSol®. [99] [110]
- Méthode fusion-évaporation du solvant : cette technique combine la méthode de fusion et la méthode d'évaporation de solvant [105] [110]. Elle a été utilisée pour la première fois par Goldberg et al. en 1966. Le principe est que la substance active dissoute dans un solvant approprié est incorporée à la masse fondue du support, le mélange est ensuite évaporé, la masse obtenue est broyée et tamisée. [105]

Selon *Tekade et Yadav (2020)*, la meilleure stabilité chimique des dispersions solides a été observée avec celles formulées à l'aide de méthodes d'évaporation de solvant par rapport aux dispersions formulées par fusion. [104]

2.9.1. Evaporation de solvant (Solvent Evaporation)

La méthode d'évaporation du solvant est l'une des techniques les plus utilisées, elle convient parfaitement aux substances thermolabiles. Le principe de la technique est que la substance active et le support sont dissous complètement dans un solvant volatil, le solvant sera ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, ce qui permettra la formation de dispersion solide, la poudre obtenue est séchée, broyée et tamisée. [101] [106] [109]

Cette technique a été utilisée pour la première fois par Tachibana et Nakamura en 1965. La formulation a été préparée en dissolvant le β -carotène et le povidone dans le solvant organique « chloroforme ». Le principal avantage de cette technique est d'éviter la dégradation thermique de la substance active et du support utilisé, car la température d'évaporation est basse. Cette technique a été employée pour améliorer la solubilité de plusieurs substances médicamenteuses telles que : l'azithromycine, le flurbiprofène, le piroxicam, l'indométhacine, la loratadine, le diclofénac et le répaglinide. [105]

2.9.2. Séchage par atomisation (Spray Drying)

Cette technique est utilisée à grande échelle, elle permet la production de dispersions solides stables. La substance active et le support sont dissous dans un solvant approprié, la solution obtenue est pulvérisée dans un courant d'air chaud, des gouttelettes fines se forment puis sont séchées par évaporation rapide du solvant en formant une dispersion solide. La température et le débit sont des paramètres critiques dans la formation de dispersions solides stables, car tout résidu de solvant peut favoriser la recristallisation ou la formation de solvates. [105] [109]

2.9.3. Technologie de fluide supercritique (Supercritical Fluid Technology)

Cette technologie produit une formulation avec une taille de particules réduite (micro à nano), elle a été rapportée par Hannay et Hogarth en 1897, elle a été utilisée à la fin des années 80. Le principe est que la substance médicamenteuse et le support sont dissous dans un solvant supercritique (tel que le CO_2), le mélange est ensuite pulvérisé. L'expansion rapide induit une nucléation rapide de la substance active et du support conduisant, à la formation de dispersion solide. Cette technologie peut être réalisée par plusieurs méthodes telles que : expansion rapide des solutions supercritiques (RESS), antisolvant gazeux, antisolvant supercritique. [105-106]

2.9.4. Fusion (Hot-Melt)

Cette technique a été utilisée pour la première fois par Sekiguchi et Obi en 1961 [105]. Le principe est que le mélange physique de la substance active et du support hydrophile sont chauffés jusqu'à fusion complète. Le fluide liquéfié est rapidement refroidi et solidifié sous agitation dans un bain de glace, la masse obtenue est broyée et tamisée. [29] [105]

2.9.5. Extrusion à chaud (Hot-Melt Extrusion)

Le principe de la technique d'extrusion à chaud est similaire à celui de la fusion en utilisant comme équipement l'extrudeuse. [29] Les substances actives sont mélangées avec l'excipient fondu dans une extrudeuse. La substance active dans l'extrudat peut exister à l'état cristallin ou amorphe. [98]

La miscibilité de la substance active et du support peut être un problème dans la méthode de fusion classique, ce qui entraîne une distribution non uniforme. La température élevée peut favoriser la dégradation thermique des substances sensibles à la chaleur. Néanmoins, contrairement à la méthode de fusion, celle-ci permet une production continue à grande échelle. [29] [98]

2.9.6. Refroidissement par trempe (Quench Cooling)

Le mélange physique de la substance active et le support est fondu sous agitation puis refroidi rapidement en utilisant l'azote liquide ou un bain de glace. Cette technique n'est pas recommandée pour les substances thermolabiles. [109]

2.10. Caractérisation des dispersions solides

Plusieurs techniques analytiques sont décrites dans la littérature dans le but d'évaluer l'état cristallin de la substance active afin de pouvoir préparer des dispersions solides amorphes stables, telles que :

- Analyse thermique : réalisée par DSC, permettant la détection des transitions thermiques telles que la température de transition vitreuse (T_g), la détermination du point de fusion, l'identification de l'état cristallin et amorphe, détermination de la tendance à la cristallisation.
- Analyse thermogravimétrique (TGA) : étudier la stabilité thermique et le profil d'évaporation, déterminer la perte en masse de l'échantillon en fonction de la température.

- Microscopie électronique à balayage : étudier la morphologie de l'échantillon dans la dispersion solide, déterminer la taille des particules, la présence des cristaux.
- Diffraction de rayon X (DRX) : Examiner la cristallinité de la substance active et du support. Déterminer le degré de cristallinité, étudier le comportement de recristallisation
- Spectroscopie infrarouge : étudier les interactions substance active-polymère dans les dispersions solides amorphes (modification du moment dipolaire).
- Spectroscopie Raman : étudier les interactions substance active-polymère dans les dispersions solides amorphes. [111-112]

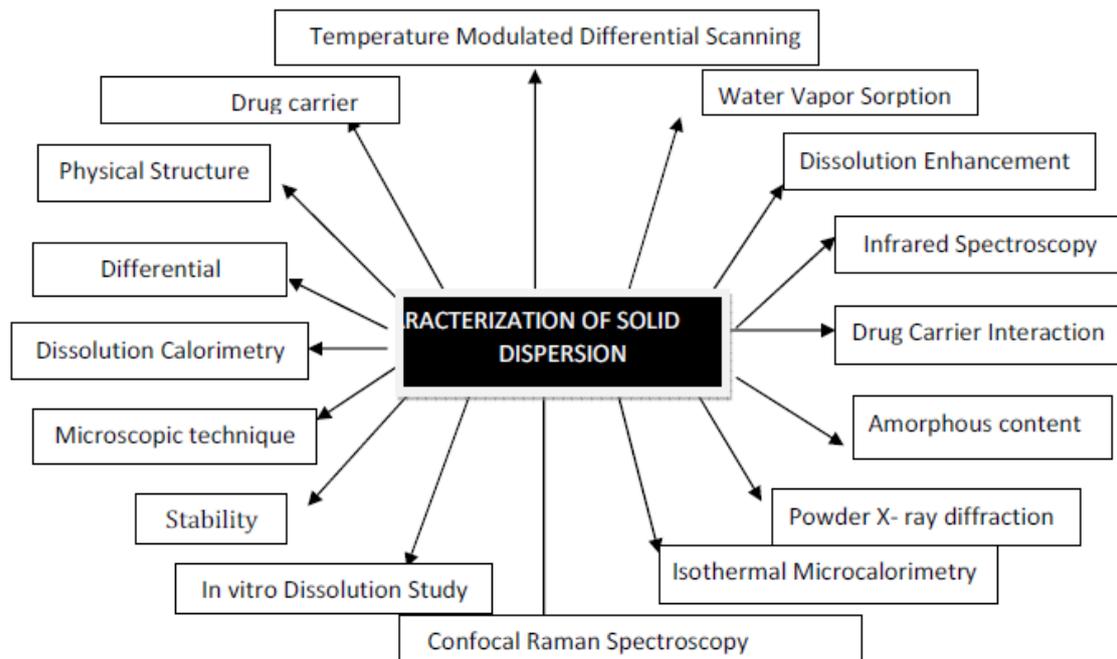


Figure 2.7 : Différentes techniques utilisées pour la caractérisation des dispersions solides [113]

2.11. Produits commercialisés fabriqués à base de dispersion solide amorphe

Plusieurs produits ont été fabriqués à base de dispersion solide amorphe et ont été approuvés par la FDA. Le tableau ci-dessous rapporte quelques produits commerciaux cités dans la littérature.

Tableau 2.4 : Liste des produits commerciaux fabriqués à base de dispersion solide [99-101] [111]

N°	Désignation	Substance active	Approuvé	Année
1	Cesamet [®]	Nabilone	FDA	1985
2	Isoptin [®] SR	Verapamil	FDA	1987
3	Sporanox [®]	Itraconazole	FDA	1992
4	Prograf [®]	Tacrolimus	FDA	1994
5	NuvaRing [®]	Etonogestrel/Ethinyl Estradiol	FDA	2001
6	Crestor [®]	Rosuvastatin	FDA	2002
7	Kaletra [®]	Lopinavir/Ritonavir	FDA	2007
8	Intelence [®]	Etravirine	FDA	2008
9	Modigraf [®]	Tacrolimus	FDA	2009
10	Zortress [®]	Everolimus	FDA	2010
11	Norvir [®]	Ritonavir	FDA	2010
12	Onmel [®]	Itraconazole	FDA	2010
13	Incivek [®]	Telaprevir	FDA	2011
14	Zelboraf [®]	Vemurafenib	FDA	2011
15	Kalydeco [®]	Ivacaftor	FDA	2012
16	Lozanoc	Itraconazole	FDA	2012
17	Noxafil [®]	Posaconazole	FDA	2013
18	Astagraf XL [®]	Tacrolimus	FDA	2013
19	Belsomra [®]	Suvorexant	FDA	2014
20	Harvoni [®]	Ledipasvir/Sofosbuvir	FDA	2014
21	Viekira XR [™]	Dasabuvir/Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir	FDA	2014
22	Epclusa [®]	Sofosbuvir/Velpatasvir	FDA	2016
23	Orkambi [®]	Lumacaftor/Ivacaftor	FDA	2016
24	Venclexta [®]	Venetoclax	FDA	2016
25	Zepatier [®]	Elbasvir/Grazoprevir	FDA	2016
26	Stivarga [®]	Regorafenib	FDA	2017
27	Mavyret [™]	Glecaprevir/Pibrentasvir	FDA	2017
28	Lynparza [®]	Olaparib	FDA	2018
29	Orilissa [®]	Elagolix	FDA	2018
30	Erleada [®]	Apalutamide	FDA	2018
30	Trikafta [®]	Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor	FDA	2019
31	Symdeko [®]	Tezacaftor/Ivacaftor/Ivacaftor	FDA	2019
32	Braftovi [®]	Encorafenib	FDA	2020
33	Oriahnn [™]	Elagolix/estradiol/norethindrone acetate	FDA	2020

CHAPITRE 3
MATERIEL ET METHODES

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Introduction

Dans ce chapitre seront présentés le matériel utilisé au cours de la partie expérimentale avec description des différents méthodes et protocoles appliqués.

Notre travail est scindé en deux parties à savoir :

- La première partie concerne :
 - La synthèse, la caractérisation et le contrôle physico-chimique de ZnO synthétisés par la méthode sol-gel.
 - L'évaluation de l'amélioration de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs associé aux antibiotiques : chlorhydrate de chlortetracycline, spiramycine, azithromycine dihydraté.
 - L'étude toxicologique (in vivo) effectuée sur le ZnO NPs ainsi que sur le gel formulé à base de ZnO NPs synthétisé.
 - L'étude de stabilité de ZnO NPs synthétisé.
- La deuxième partie est consacrée à :
 - La formulation des dispersions solides amorphes à base d'acide niflumique, par la méthode « évaporation de solvant ».
 - La caractérisation des dispersions solides formulées.
 - Le dosage de l'acide niflumique dans le médicament formulé à base des dispersions solides formulées.
 - Étude comparative de l'amélioration de la vitesse de dissolution des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique par rapport aux mélanges physiques et un produit commercialisé.

Dont les objectifs sont :

- Améliorer l'effet antimicrobien de certains antibiotiques en les associant au ZnO NPs.
- Améliorer la biodisponibilité et donc l'effet thérapeutique du médicament, en augmentant la solubilité de la substance médicamenteuse faiblement soluble dans l'eau « acide niflumique » et donc la dissolution du médicament formulé à base de dispersion solide amorphe stable.

3.2. Réactifs et matériel

3.2.1. Réactifs

Les réactifs utilisés dans la première partie « ZnO NPs synthétisées par la méthode sol-gel » et la partie « Dispersions solides à base de l'acide niflumique », cités dans le tableau ci-dessous, n'ont subis aucune purification ou traitement préalables

Tableau 3.1. : Liste des réactifs utilisés :

Désignation	Pureté	Fournisseur
Acétate de zinc dihydraté	99,5-100 %	Merck
Acide oxalique dihydraté	≥ 99,0%	Merck
Ethanol	96 %	Biochem
Ethanol anhydre	99,9 %	CARLO ERBA
Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)	0,1 M	PanReac
Hydroxyde de sodium	≥ 97,0%	Sigma Aldrich
Acide chlorhydrique	36,5-38,0 %	Sigma Aldrich
Acide acétique glacial	≥ 99,0%	Sigma Aldrich
Xylénolorange	/	Sigma Aldrich
Nitrate de potassium	≥ 99,0 %	Sigma Aldrich
Hexaméthylènetétramine	≥ 99,0 %	Sigma Aldrich
Diisopropanolamine	≥ 98,0 %	Sigma Aldrich
Acétonitrile grade HPLC	≥ 99,9 %	Sigma Aldrich
Acide orthophosphorique	85 %	Sigma Aldrich
Tween 80	/	Sigma Aldrich

Les matières premières, grade excipients, tels que : povidone, polyéthylène glycol 6000, carbomère, diisopropanolamine, amidon de maïs, talc, stéarate de magnésium ont été procurées du GROUPE SAIDAL. Le polyéthylène glycol 1500 est fourni par le département de Génie des Procédés de l'université de BLIDA 1.

Les substances actives : chlorhydrate de chlortetracycline, spiramycine, azithromycine dihydraté, ZnO, acide niflumique ainsi que les milieux de cultures et les souches microbiennes ont été fournis par le GROUPE SAIDAL.

3.2.2. Matériel

Le matériel utilisé pour les deux parties à savoir « ZnO nanoparticules » et « Dispersions solides à base de l'acide niflumique » sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3.2 : Equipements utilisés

Désignation	Marque	Lieu
Montage expérimentale de synthèse des NPs de ZnO	/	CRD-SAIDAL
Balance analytique	METTLER TOLEDO	CRD-SAIDAL
Balance de précision	METTLER TOLEDO	CRD-SAIDAL
Agitateur magnétique	VELP	CRD-SAIDAL
Agitateur vortex	VELP	CRD-SAIDAL
Bain ultrason	Fisherbrand	CRD-SAIDAL
Bain-marie	Memmert	CRD-SAIDAL
Conductimètre	METTLER TOLEDO	CRD-SAIDAL
Chambre UV	Pbi international	CRD-SAIDAL
Etuve	Selecta	CRD-SAIDAL
Etuve	Memmert	CRD-SAIDAL
Poupinel (stérilisateur à chaleur sèche)	Selecta	CRD-SAIDAL
Etuve sous vide	Memmert	CRD-SAIDAL
Four à moufle	Carbolite	GDC-SAIDAL
Hotte Sorbonne	Exosafe	CRD-SAIDAL
pH mètre	METTLER TOLEDO	CRD-SAIDAL
DRX	Bruker AXS D8 ADVANCE	CDTA / Université de BLIDA 1
DSC-ATG	NETZSCH STA	URMPE Boumerdès
Spectrophotomètre Infra rouge	Perkin Elmer	CRD-SAIDAL
Raman	LabRam HR Horiba,	CDTA
DLS	Horiba Nanopartica SZ-100 séries	Université de BLIDA 1
XPS	Thermo Scientific	CRTSE/ EL-HARRACH

MEB-EDX	FEG-SEM Scientific	HORIBA	CRTSE/ EI-HARRACH
MEB-EDX	FEI QUANTA 650		Université de BLIDA 1
Spectrophotomètre UV-Vis	Perkin Elmer		CRD-SAIDAL
Spectrophotomètre UV-Vis	Shimadzu		CRD-SAIDAL
Evaporateur rotatif	BÜCHI		CRD-SAIDAL
HPLC	Waters		CRD-SAIDAL
Dissolutest	SOTAX		CRD-SAIDAL

3.3. Nanoparticules de ZnO synthétisées par la méthode sol-gel »

3.3.1. Synthèse des NPs de ZnO

Plusieurs méthodes de synthèse sont décrites dans la littérature, notre choix s'est porté sur le procédé de synthèse des NPs de ZnO « sol-gel (solution-gélification) ». Ce dernier est fréquemment utilisé pour la fabrication des oxydes métalliques à l'échelle nanométrique, il a été choisi, vu qu'il est issu de la chimie douce, simple, facile, maîtrisable et ne nécessite pas de moyens et matériel coûteux.

Le choix des précurseurs ainsi que des conditions opératoires est basé sur des recherches antérieures et des essais réalisés au niveau du laboratoire.

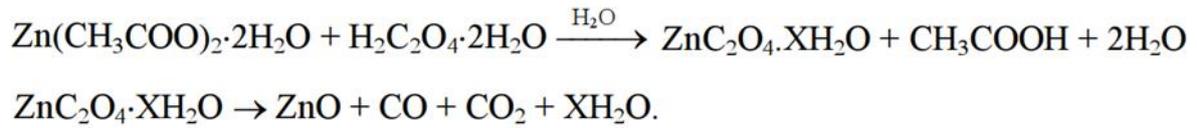
Principe du procédé sol-gel

Brièvement, c'est la transformation de la solution à base de précurseurs, selon le besoin à différentes formes telles que : poudre, fibre, film mince, matériau vitreux, hybrides et autres. Il comprend plusieurs étapes : hydrolyse, condensation, gélification, vieillissement et séchage, et il ne nécessite pas de haute température. [114-115]

La synthèse des NPs de ZnO a été réalisée comme suit :

Sous agitation magnétique, on fait dissoudre l'acétate de zinc dihydraté dans 100 ml d'eau distillée, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. On introduit la solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 %, goutte à goutte, dans la solution d'acétate de zinc sous agitation constante pendant une demi-heure avant d'être laissée précipiter pendant toute une nuit. Le précipité obtenu est filtré, lavé 3 fois avec de l'eau distillée, séché et calciné à 600 °C pendant 2 h 30 min. La poudre obtenue est broyée et conservée dans un récipient hermétique.

Selon la réaction suivante : [116]



La figure ci-dessous illustre le montage expérimental utilisé pour la synthèse :

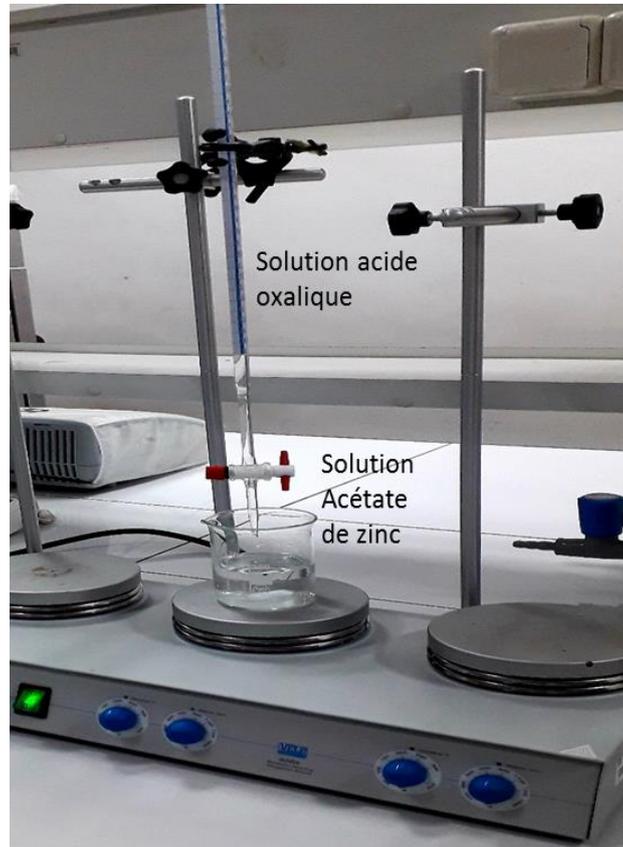


Figure 3.1 : Montage expérimental de synthèse des NPs de ZnO

3.3.2. Caractérisation des NPs de ZnO

La caractérisation de la poudre synthétisée est réalisée par différentes techniques d'analyses citées ci-dessous.

3.3.2.1. Par Diffraction aux rayons X DRX

L'analyse par diffraction des rayons X est utilisée pour identifier la structure cristalline et pour estimer la taille des cristallites du matériau synthétisé. Les diagrammes XRD sont enregistrés par l'appareil X-ray (Bruker AXS D8 ADVANCE), utilisant une source de rayonnement Cu K α à $\lambda =$

1,5406 Å, dont la plage de balayage de 2θ est réglée entre 10° et 80° avec un pas d'analyse de $0,05^\circ$.

L'échantillon synthétisé est déposé dans le porte-échantillon et analysé directement sans traitement.

La taille moyenne des cristallites est calculée par l'équation de Scherrer :

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3.1)$$

Où d est la taille des cristallites (nm), k est une constante égale à 0,89, λ représente la longueur d'onde des rayons X (nm), θ représente l'angle de diffraction de Bragg et β correspond à la largeur à mi-hauteur du pic le plus intense.

3.3.2.2. Par spectrophotométrie Infra Rouge

L'analyse est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre IR par réflexion totale atténuée (mode UATR) de marque Spectrum Two PerkinElmer, afin d'identifier les groupes fonctionnels présents dans la poudre synthétisée.

L'échantillon synthétisé est déposé directement sur la surface du cristal en diamant de l'accessoire UATR puis analysé. Le spectre IR est obtenu par balayage du faisceau entre les longueurs d'onde 4000 cm^{-1} et 350 cm^{-1} .

3.3.2.3. Par spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique complémentaire de la spectroscopie infrarouge. Les deux techniques reposent sur l'étude des vibrations fondamentales au sein d'un matériau. Cependant, elles diffèrent par leur sensibilité à l'égard des divers groupes fonctionnels. [3]

L'identification de la composition du matériau synthétisé est réalisée via le spectromètre Raman à haute résolution (LabRam HR Horiba), en utilisant une source d'excitation laser de 633 nm, à une température ambiante et puissance de 17 mW.

L'analyse de l'échantillon ne nécessite aucun traitement préalable.

3.3.2.4. Par Diffusion dynamique de la lumière

L'analyse par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) est la technique la plus précise pour mesurer la taille des particules d'un échantillon. La distribution et la taille des particules de la

poudre synthétisée sont évalués à l'aide de l'analyseur des nanoparticules (Horiba Nanopartica SZ-100 séries), dont la plage de mesure est de 0,3 nm à 8 μ m.

On prépare une solution à 0,5 mg/ml de la poudre synthétisée puis on l'homogénéise à l'ultrason pendant 30 min.

L'analyse est réalisée par l'équipement via une cellule en quartz à 4 faces transparentes.

3.3.2.5. Par spectroscopie de photoélectronique à rayons (XPS)

L'examen par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) est effectué à l'aide d'un analyseur photoélectronique à rayons X (de marque Thermo Scientific) équipé d'une anode Al K α comme source d'irradiation pour déterminer l'état de valence du matériau synthétisé.

L'échantillon synthétisé est analysé sans aucun traitement.

3.3.2.6. Par Microscopie électronique à balayage-EDX

La morphologie externe et la composition élémentaire du matériau synthétisé ont été examinées en utilisant le microscope électronique à balayage (FEG-SEM HORIBA Scientific) relié à un système de rayons X à dispersion d'énergie (EDX).

L'échantillon synthétisé est contrôlé sans aucun traitement.

3.3.3. Contrôle physico-chimique des NPs de ZnO synthétisées

Le contrôle physico-chimique du ZnO NPs synthétisé est réalisé conformément à la monographie de la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition (2020). [117]

3.3.3.1. Aspect macroscopique

L'aspect de la poudre est examiné à l'œil nu.

Critère d'acceptation : la poudre est lisse, légère, blanche ou blanc jaunâtre.

3.3.3.2. Solubilité

Deux solutions ont été préparées conformément aux recommandations de la Pharmacopée Européenne pour tester la solubilité du ZnO synthétisé.

Solution 1 : on prépare une solution de ZnO à 0,1 mg/ml dans l'eau distillée.

Solution 2 : on prépare une solution de ZnO à 0,1 mg/ml dans l'éthanol à 96%.

Critère d'acceptation : l'oxyde de zinc est pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96%.

3.3.3.3. Identification par réaction chimique

La poudre de l'oxyde de zinc est mise sur une plaque chauffante à environ 90°C.

Critère d'acceptation : l'oxyde de zinc prend une coloration jaune qui disparaît après refroidissement.

3.3.3.4. Perte à la calcination

La poudre est calcinée dans un four à moufle à 500 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

Le calcul de la perte à la calcination a été réalisé par la formule suivante :

$$T = \frac{(P_1 + P_{ZnO}) - P_2}{P_{ZnO}} \times 100 \quad (3.2)$$

Avec :

P_1 Prise d'essai du creuset vide, en g

P_{ZnO} Prise d'essai de ZnO, en g

P_2 Prise d'essai du creuset après calcination, en g

Critère d'acceptation : la perte à la calcination n'est pas supérieur à 1,0 %.

3.3.3.5. Teneur en ZnO par complexométrie

Protocole

Dans un Erlenmeyer, on fait dissoudre 150 mg de ZnO synthétisé dans 10 ml d'acide acétique dilué puis on complète à 200 ml avec de l'eau distillée. On ajoute 50 mg de mélange composé au xylénolorange et de l'hexaméthylènetétramine jusqu'à l'obtention d'une coloration rose-violet puis 2 g d'hexaméthylènetétramine. On procède au titrage de la solution obtenue par l'EDTA 0,1 M jusqu'au virage du rose-violet au jaune. 1 ml EDTA 0,1 M correspond à 8,14 mg de ZnO.

Préparation des solutions

Acide acétique dilué : On introduit 12 g d'acide acétique glacial dans 100 ml d'eau distillée.

Mélange composé au xylénolorange : On mélange 20 mg de xylénolorange avec 1,98 g de nitrate de potassium.

Formule de calcul

$$T = \frac{V_{EDTA} \times 8,14}{P_{ZnO}} \times 100 \quad (3.3)$$

Critère d'acceptation : la teneur en ZnO calculée par rapport à la substance calcinée doit être comprise entre 99,0 % à 100,5 %.

3.3.4. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs associé à certains antibiotiques

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque contre deux souches bactériennes à Gram négatif, à savoir : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et deux souches bactérienne à Gram positif, à savoir : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Tandis que l'activité antifongique est évaluée sur trois champignons, à savoir : *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) et *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Les milieux de culture utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3.3. : Milieux de culture utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne

Désignation	Rôle
Mueller-Hinton gélosé (MH)	Milieu favorable à la croissance des bactéries.
Milieu TSA (Trypticase soja agar)	Gélose trypto-caséïne soja, milieu utilisé pour cultiver les bactéries
Milieu Sabouraud	Gélose non sélective, milieu utilisé pour cultiver les champignons (levure et moisissures)

Les activités antibactériennes et antifongiques ont été examinées sur le ZnO NPs (seul), sur les antibiotiques (chlorhydrate de chlortétracycline (CTC), spiramycine (SPM) et azithromycine dihydraté (AZ)) ainsi que sur la combinaison CTC-ZnO NPs, SPM-ZnO NPs et AZ-ZnONPs, et ce afin de pouvoir évaluer l'effet antimicrobien de l'antibiotique associé aux NPs de ZnO.

Préparation de l'inoculum

Chaque espèce bactérienne est cultivée séparément dans un bouillon de trypticase soja et incubée à 35 °C. *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* ont été cultivés dans de la gélose Sabouraud à 25 °C pendant 48 heures, tandis que l'*Aspergillus brasiliensis* est cultivée à 25 °C pendant 7 à 10 jours.

Après le processus d'incubation, chaque organisme est mis en suspension dans une solution saline stérile afin d'obtenir une concentration microbienne finale de 10^8 UFC/ml, à l'exception de l'*Aspergillus brasiliensis* qui doit avoir une concentration de 10^7 UFC/ml. La concentration de l'inoculum est ajustée en mesurant les densités optiques de chaque suspension à 620 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis.

Préparation des solutions en ZnO et ZnO-antibiotique

- Solution en ZnO NPs : on fait dissoudre une quantité de ZnO NPs dans de l'eau stérile puis on complète à 100ml avec le même solvant, la concentration obtenue est de 500µg/disque.
- Solution en CTC : on fait dissoudre une quantité de CTC dans de l'eau stérile puis on complète à 100 ml avec le même solvant, la concentration obtenue est de 2500µg/disque.
- Solution en SPM : on fait dissoudre une quantité de SPM dans de l'eau stérile puis on complète à 100 ml avec le même solvant, la concentration obtenue est de 2500µg/disque.
- Solution en AZ : on fait dissoudre une quantité d'AZ dans de l'eau stérile puis on complète à 100 ml avec le même solvant, la concentration obtenue est de 1250µg/disque.
- Solution combinée CTC-ZnO NPs : on fait dissoudre une quantité de ZnO NPs dans de l'eau stérile, puis on ajoute progressivement le CTC, on complète avec de l'eau stérile à 100 ml, la concentration obtenue est de 500 µg/disque pour ZnO et 2500 µg/disque pour CTC.
- Solution combinée SPM-ZnO NPs : on fait dissoudre une quantité de ZnO NPs dans de l'eau stérile, puis on ajoute progressivement la SPM, on complète avec de l'eau stérile à 100 ml, la concentration obtenue est de 500 µg/disque pour ZnO et 2500 µg/disque pour SPM.
- Solution combinée AZ-ZnO NPs : on fait dissoudre une quantité de ZnO NPs dans de l'eau stérile, puis on ajoute progressivement l'AZ, on complète avec de l'eau stérile à 100 ml, la concentration obtenue est de 500 µg/disque pour ZnO et 1250 µg/disque pour AZ.

Procédure

Les suspensions des bactéries ont été étalées dans des boîtes de Pétri sur une couche de gélose Mueller Hinton, tandis que pour les champignons, les suspensions sont étalées sur une couche de gélose Sabouraud.

Les disques stériles (9 mm) sont imprégnés de 50 µl de la solution à examiner. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 35 °C pendant 24 h pour les souches bactériennes, à 25 °C pendant 48 h pour *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, et à 25 °C pendant 48 h à 72 h pour l'*Aspergillus brasiliensis*.

Chaque test est répété en sextuple (n=6).

L'activité antimicrobienne est estimée par la mesure de la zone d'inhibition du halo (mm).

3.3.5. Formulation d'un gel à base de ZnO NPs synthétisé

Après caractérisation et contrôle physico-chimique, une formulation d'un gel à base de ZnO NPs a été réalisée à l'échelle laboratoire dans le but d'examiner l'effet irritant/corrosif du matériau synthétisé.

Sur la base d'une recherche bibliographique effectuée, une formule a été optimisée en utilisant comme excipients : carbomère, diisopropanolamine, acide chlorhydrique à 37%, hydroxyde de sodium, éthanol 96% et eau.

3.3.6. Evaluation toxicologique de ZnO NPs

3.3.6.1. Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë (test in vivo)

Le principe est d'utiliser un nombre minimum d'animaux, une dose déterminée de la substance à examiner est administrée par voie orale à un groupe de trois animaux adultes sains et d'un seul sexe (de préférence femelles).

L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans le groupe qui a reçu la dose détermine l'étape suivante, soit par l'arrêt de l'essai, l'administration de la même dose à trois animaux supplémentaires, l'administration d'une dose supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires. [118]

Protocole

Le test de « Toxicité orale aiguë » est réalisé au niveau de l'animalerie du laboratoire pharmacotoxicologique du CRD SAIDAL. Deux doses différentes de ZnO NPs synthétisé ont été testées et préparées comme suit :

Solution (1) : on fait dissoudre 200 mg de ZnO NPs dans 5 ml de l'eau distillée, la concentration testée est de 20 mg/0,5 ml.

Solution (2) : on fait dissoudre 400 mg de ZnO NPs dans 5 ml de l'eau distillée, la concentration testée est de 40 mg/0,5 ml.

Conformément aux recommandations de l'OCDE Essai n° 423, les souris de type Naval Medical Research Institute (NMRI) ont été mises à jeun, pendant 3 à 4 h, avant l'administration de la dose, en supprimant uniquement la nourriture mais pas l'eau.

Le test est effectué sur 06 souris NMRI séparées en deux groupes de 03, leur poids est compris entre 17 et 20 g. On administre au premier groupe, via une sonde gastrique, une quantité de 0,5 ml de la solution (1) et une quantité de 0,5 ml de la solution (2) au deuxième groupe de souris, donc chaque groupe reçoit une seule dose de ZnO NPs.

Observation

Selon les recommandations de l'OCDE Essai n° 423, les souris doivent être mises sous observation au moins une fois pendant les premières 30 min, régulièrement pendant les premières 24 h (Une attention particulière s'impose pendant les premières 4h) et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration du produit. La durée d'observation dépend de la manifestation des réactions de toxicité, toutes les observations doivent être enregistrées : modifications du comportement, tremblement, convulsion, salivation, diarrhée sommeil et coma, modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, modifications de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux et de l'activité somato-motrice. [118]

3.3.6.2. Effet irritant/corrosif aigu sur la peau (test in vivo)

Le principe de l'essai in vivo repose sur le fait qu'une seule dose du produit a été appliquée sur une zone de la peau de l'animal adulte sain. Toute observation doit être décrite de façon détaillée et notée, selon une échelle de valeurs, le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et ce afin de pouvoir fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour pouvoir évaluer la réversibilité des effets observés. Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës doivent être tués avec humanité, et ces symptômes doivent être pris en compte lors de l'évaluation du produit testé. [119]

Protocole

Le test est réalisé au niveau de l'animalerie du laboratoire pharmaco-toxicologique du CRD SAIDAL

Conformément aux recommandations de l'OCDE Essai n° 404, vingt-quatre heures avant l'essai, la région dorsale du tronc du lapin de race albinos néo-zélandais est tondu à ras. Une quantité de 0,5 g du produit « Gel à base de ZnO NPs » est appliquée sur la zone scarifiée de la peau (environ 6 cm²) et recouverte par une compresse de gaze puis fixée par un sparadrap non irritant. La partie saine de la peau servira comme témoin.

L'essai est effectué sur un seul animal selon la procédure suivante : trois timbres sont appliqués sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après 3 min, si aucune réaction cutanée grave n'est observée, un deuxième timbre est appliqué sur un endroit différent et enlevé après 1 h. Si aucune réaction cutanée grave n'est observée, un troisième timbre est appliqué sur le lapin pendant 4 h. Si un effet corrosif est détecté, l'essai s'achève immédiatement, sinon, le lapin en question est gardé en observation pour une période de 14 jours.

Si l'essai ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer le résultat sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures.

Cependant, si l'essai initial présente un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou simultané sur deux animaux supplémentaires. [119]

Période d'observation

Afin de vérifier la réversibilité des effets, l'observation des animaux se fait sur 14 jours. Cependant, si la réaction s'avère réversible avant, l'expérience s'achève. [119]

Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

L'observation des signes d'érythème et d'œdème chez les lapins testés et la cotation des réactions s'effectuent comme suit : 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'enlèvement du timbre. Concernant le premier animal testé, est examiné immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau mentionné dans la Ligne Directrice OCDE n° 404. L'observation peut être réalisée jusqu'au 14^{ème} jour, si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion, et ce afin de pouvoir vérifier la réversibilité des effets. [119]

3.4. Partie « Dispersions solides à bases de l'acide niflumique »

3.4.1. Formulation de dispersions solides à base de l'acide niflumique par la méthode « évaporation de solvant »

Le but de cette partie du travail est d'améliorer la solubilité et donc la biodisponibilité du médicament « Acide niflumique » administré par voie orale, et ce afin de pouvoir assurer son efficacité thérapeutique. Pour la réalisation de notre travail, le choix s'est porté sur :

- Substance active :

La molécule candidat choisie est « Acide niflumique », un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de la classe des acides fénamiques, commercialisé sous forme de gélules, gel et pommade. Largement utilisé pour le traitement de certains rhumatismes inflammatoires chroniques et

arthroses, ou certaines douleurs dues à une inflammation de la gorge, des oreilles ou de la bouche. [120-122]

L'acide niflumique est une molécule qui appartient au BCS II, il est caractérisé par sa faible solubilité aqueuse et sa forte perméabilité. [123-124]

- Véhicule :

Sur la base des recherches bibliographiques effectuées, le choix s'est porté sur des polymères hydrophiles, à savoir : Povidone, Polyéthylène glycol 1500, Polyéthylène glycol 6000 et un tensioactif. [104-105] [110]

- Procédé :

Parmi les différentes techniques citées dans la littérature, on a choisi la technique « Dispersions solides par évaporation de solvant », vu qu'elle est simple à réaliser au niveau du laboratoire et ne demande pas des moyens coûteux.

Plusieurs essais ont été réalisés pour optimiser les conditions opératoires afin de réussir la formulation des dispersions solides.

3.4.1.1. Formulation de dispersion solide NIF/PVP (1) et NIF/PVP (2)

Dans un ballon de fond rond, on ajoute progressivement une quantité du mélange (NIF/PVP (1/1) ou NIF/PVP (1/3)) dans un petit volume du solvant éthanol anhydre, on le porte sous agitation et au bain à ultrasons jusqu'à dissolution complète. Puis, on place le ballon au rotavapeur à 60°C et vitesse de rotation de 140tr/min. Après formation d'un film vitreux, on retire le ballon et on le met dans l'étuve sous vide. Après séchage, on récupère le résidu et on le broie en poudre fine puis on le conserve dans un récipient étanche. La figure ci-dessous illustre le montage expérimental utilisé :



Figure 3.2 : Photos de la formulation de dispersions solides NIF/PVP (2)

3.4.1.2. Formulation de dispersions solides NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4)

Dans un ballon de fond rond, on met un petit volume du solvant éthanol 96% puis on ajoute progressivement une quantité du mélange (NIF/PVP (1/5) ou NIF/PVP (1/7)), on porte le tout sous agitation et au bain à ultrasons. Après dissolution complète, on place le ballon au rotavapeur à 60°C et vitesse de rotation de 140tr/min jusqu'à formation d'un film vitreux. On retire le ballon et on le met dans l'étuve sous vide. Après séchage, on récupère le résidu et on le broie en poudre fine puis on le conserve dans un récipient étanche comme illustré ci-après :

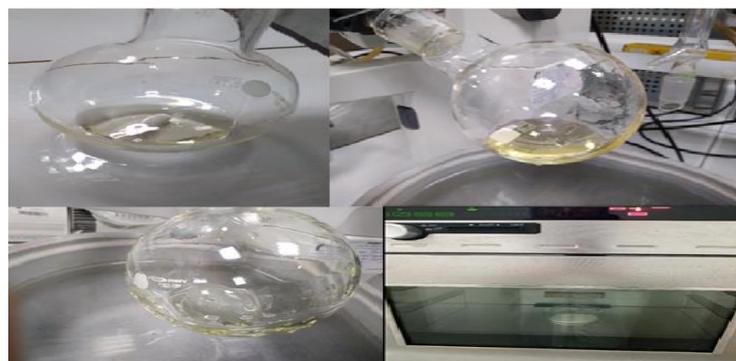


Figure 3.3 : Photos de la formulation de dispersions solides NIF/PVP (4)

3.4.1.3. Formulation de dispersions solides NIF/PEG 1500 (1) et NIF/PEG 6000 (1)

On commence par la fusion du PEG dans un ballon en fond rond (à 72°C), puis on ajoute progressivement la substance NIF et l'éthanol 96%. On porte le mélange (NIF/PEG 1500 (1/5) ou NIF/PEG 6000 (1/5)) sous agitation rotative (de 55 tr/min puis 145 tr/min) jusqu'à dissolution complète et évaporation du solvant. On retire le ballon et on l'introduit dans un bain de glace puis dans l'étuve sous vide. A la fin du séchage, on récupère le produit on le broie en poudre fine et on le conserve dans un récipient étanche.

3.4.1.4. Formulation de dispersions solides NIF/PEG 1500/TA (1) et NIF/PEG 6000/TA (1)

On commence par la fusion du PEG dans un ballon de fond rond, puis on ajoute progressivement une quantité de la substance NIF, de TA et d'éthanol 96%. On porte le mélange (NIF/PEG 1500/TA (1/5/0,1g) et NIF/PEG 6000/TA (1/5/0,1g)) sous agitation rotative (de 55tr/min puis 145tr/min) jusqu'à dissolution complète et évaporation du solvant. On retire le ballon et on le met dans un bain de glace puis dans l'étuve sous vide. A la fin du séchage, on récupère le produit on le broie en poudre fine et on le conserve dans un récipient étanche.

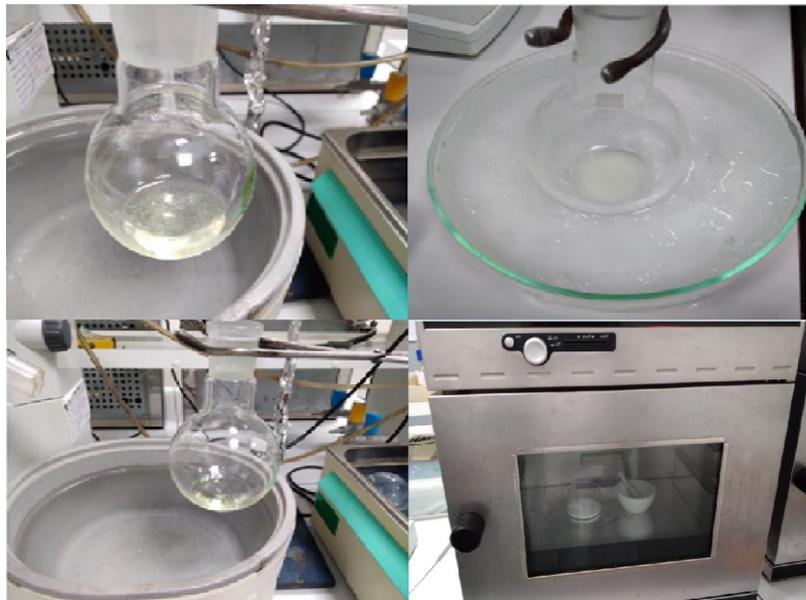


Figure 3.4 : Photos de la formulation de dispersions solides NIF/PEG 6000/TA (1)

3.4.2. Préparation des mélanges physiques

On prépare quatre mélanges selon les étapes suivantes:

On mélange à sec une quantité de la substance « Acide niflumique » avec une quantité du polymère « Povidone », correspondantes aux quantités présentes dans les dispersions solides présentées ci-dessus, à savoir : NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4). On mélange vigoureusement à l'aide d'une spatule, on tamise et on conserve par la suite dans un récipient étanche.

Ces mélanges physiques sont utilisés pour comparer l'effet des dispersions solides formulées dans l'amélioration de la vitesse de dissolution et donc la biodisponibilité de la substance active « Acide niflumique ».

3.4.3. Aspect des dispersions solides formulées

L'aspect de la substance active « Acide niflumique » et celui des poudres des dispersions solides formulées est examiné à l'œil nu.

Critères d'acceptation :

- Acide niflumique : Selon la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition (2020), la matière est une poudre cristalline de couleur jaune pâle.
- Dispersions solides formulées : Poudre fine blanche à sensiblement blanche.

3.4.4. Solubilité de l'acide niflumique et des dispersions solides formulées

La faible solubilité aqueuse de la substance active d'un médicament administré par voie orale implique son élimination du tractus gastro-intestinal avant leur dissolution ce qui affecte sa biodisponibilité et donc la réduction de son effet thérapeutique. [125]

Afin de vérifier l'effet des dispersions solides formulées sur l'amélioration de la solubilité aqueuse de l'acide niflumique, on a procédé à la préparation des solutions citées ci-dessous.

Selon la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition (2020), l'acide niflumique est pratiquement insoluble dans l'eau (dont la concentration est inférieure à 0,1 mg/ml). *R. Ambrus et al.* (2011) et *N. Radasci et al.* (2019) ont noté que l'acide niflumique est un composé lipophile et hautement perméable qui appartient à la BCS II, présente une faible solubilité dans l'eau (environ 26 µg/ml à 25°C). [123-124]

De ce fait, on a préparé des solutions à différentes concentrations afin de vérifier la solubilité de l'acide niflumique dans l'eau, à savoir : 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml et 0,025 mg/ml.

D'autre part, on a préparé les solutions suivantes pour la vérification de la solubilité des dispersions solides formulées, à savoir :

- Dispersions solides NIF/PVP à différents ratios : on fait dissoudre une quantité correspondante à 0,2 mg/ml en acide niflumique dans l'eau.
- Dispersions solides NIF/PEG 1500 et NIF/PEG 6000 : on fait dissoudre une quantité correspondante à 0,2 mg/ml en acide niflumique dans l'eau.
- Dispersions solides NIF/PEG 1500/TA et NIF/PEG 6000/TA : on fait dissoudre une quantité correspondante à 0,2 mg/ml en acide niflumique dans l'eau.

3.4.5. Caractérisation des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique

3.4.5.1. Analyse par Infrarouge

Les spectres IR de l'acide niflumique pur, les polymères (PVP, PEG 1500 et PEG 6000), les mélanges physiques ainsi que les différentes dispersions solides formulées ont été enregistrés dans la plage allant de 450 à 4000 cm^{-1} , à l'aide du spectrophotomètre IR Spectrum Two de la marque Perkin Elmer, en utilisant le mode UATR dont l'analyse est effectuée sur les poudres directement et ne nécessite aucune préparation préalable de l'échantillon.

3.4.5.2. Analyse par Diffraction des rayons X (DRX)

Afin de pouvoir identifier la phase et la structure cristalline de l'acide niflumique et les différentes dispersions solides formulées, l'analyse a été effectuée à l'aide du diffractomètre X-ray Bruker AXS D8 ADVANCE, les diffractogrammes ont été enregistrés dans la plage 2θ allant de 3° à 70° avec un pas angulaire de $0,05^\circ$, dont la source de rayonnement utilisée est $\text{Cu K}\alpha$ à 1,5406 Å.

L'analyse par DRX a été réalisée à la fabrication ($t=0$) et après deux ans ($t=24$ mois), et ce afin de prouver le changement de la forme cristalline de l'acide niflumique dans les dispersions solides formulées vers une forme amorphe ainsi que le maintien de la stabilité de cette forme.

3.4.5.3. Analyse par DSC-ATG

L'analyse par DSC-ATG a été réalisée pour déterminer la cristallinité, le point de fusion, la perte en masse et la température de dégradation de l'acide niflumique pur, du povidone et des formulations NIF/PVP (1) et NIF/PVP (4).

L'équipement utilisé est de marque NETZSCH STA, environ 10 mg de l'échantillon est placé dans un creuset en aluminium, dont la plage de température est de 20°C à 500 °C avec vitesse de chauffage de 20 °C/min et le gaz vecteur utilisé est l'azote.

3.4.5.4. Analyse par MEB-EDX

La morphologie et la composition chimique de l'acide niflumique pur ainsi que de la formulation NIF/PVP (4) ont été déterminées en utilisant le microscope électronique à balayage (FEI QUANTA 650) relié à un système de rayons X à dispersion d'énergie (EDX).

3.4.6. Fabrication du produit acide niflumique gélules à base de dispersion solide

La fabrication des médicaments à base de différentes dispersions solides NIF/PVP, NIF/PEG 1500 ou NIF/PEG 6000 est réalisée comme suit : en mélangeant une quantité de la dispersion solide avec les excipients suivants : l'amidon de maïs, talc et stéarate de magnésium. La poudre est ensuite mise en gélules.

3.4.7. Teneur de l'acide niflumique dans le médicament à base de dispersion solide gélules

Le dosage de l'acide niflumique dans les différentes préparations de médicament gélules à base de dispersions solides formulées est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le contrôle est effectué à l'aide de l'équipement HPLC/PDA de marque Waters.

Le protocole d'analyse décrit ci-dessous a été validé par le laboratoire de chimie analytique du CRD-SAIDAL. Conformément aux exigences internationales, le paramètre de spécificité / sélectivité a été vérifié afin de s'assurer que les excipients utilisés dans les produits formulés ne présentent aucune interférence avec l'acide niflumique.

Conditions chromatographiques

Régime : isocratique

Colonne : Gel de silice octylsilylé pour chromatographie, C8 (250mm×4,6mm×5µm)

Longueur d'onde : 267 nm

Débit : 2 ml/min

Volume d'injection : 25 µl

Température de la colonne : 25 °C

Température de l'échantillon : 25 °C

Préparation des solutions

- Phase mobile : Mélange égaux en eau distillée et acétonitrile, pH est ajusté avec l'acide phosphorique 85%. Le mélange est filtré sur un filtre membrane de 0,45 µm puis dégazé pendant 15 min.
- Diluant : Mélange en Acétonitrile / Eau.
- Solution standard : on fait dissoudre une quantité de 50 mg de l'acide niflumique dans 25ml de diluant puis on complète à 50 ml avec le diluant. On prélève 3 ml de la solution obtenue puis on complète à 10 ml avec la phase mobile.
- Solution échantillon : on vide le contenu de 10 gélules, puis on prélève l'équivalent de 50mg en acide niflumique, on le fait dissoudre dans 25 ml de diluant puis on complète à 50ml avec le diluant. On agite bien la solution puis on la filtre sur une membrane de 0,45µm. On prélève 3 ml de la solution obtenue puis on complète à 10 ml avec la phase mobile.
- Solution placebo 1 : on fait dissoudre une quantité du placebo (de la préparation NIF/PVP) dans 25 ml de diluant puis on complète à 50 ml avec le diluant. On agite bien la solution puis on la filtre sur un filtre membrane de 0,45 µm. On prélève 3 ml de la solution obtenue puis on complète à 10 ml avec la phase mobile.
- Solution placebo 2 : on fait dissoudre une quantité du placebo (de la préparation NIF/PEG) dans 25 ml de diluant puis on complète à 50 ml avec le diluant. On agite bien la solution puis on la filtre sur un filtre membrane de 0,45 µm. On prélève 3 ml de la solution obtenue puis on complète à 10 ml avec la phase mobile.

Formule de calcul

$$Teneur\ en\ acide\ niflumique\ en\ (\%) = \frac{S_{ech}}{S_{st}} \times \frac{P_{st}}{Dil_{st}} \times \frac{Dil_{ech}}{P_{ech}} \times P \quad (3.4)$$

Avec :

S_{ech}	Surface de l'acide niflumique dans la solution échantillon
S_{st}	Surface du de l'acide niflumique dans la solution standard
P_{st}	Prise d'essai de l'acide niflumique dans la solution standard, en mg
Dil_{st}	Dilution de la solution standard, en ml
Dil_{ech}	Dilution de la solution échantillon, en ml
P_{ech}	Prise d'essai nominale de l'acide niflumique dans la dispersion solide, en mg
P	Pureté de l'acide niflumique, en %

Critère d'acceptation : la teneur de l'acide niflumique par gélule du produit doit être comprise entre 95,0 % à 105,0%.

3.4.8. Etude comparative des profils de dissolution in vitro des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique, des mélanges physiques et d'un produit commercial

Afin de prouver l'amélioration de la solubilité des dispersions solides de l'acide niflumique, formulées par la technique « évaporation du solvant », par rapport aux mélanges physiques et un produit commercial, la dissolution in vitro a été réalisée sur les échantillons sous forme de gélules (n=3), à l'aide d'un dissolutest et HPLC de marques SOTAX et Waters respectivement dans les conditions suivantes :

- Milieu de dissolution :

Conformément aux exigences internationales, le pH du milieu de dissolution doit être compris entre 1 et 8. plusieurs milieux de dissolution sont recommandés par la Pharmacopée Européenne et l'USP. Pour notre étude le choix s'est porté sur l'eau distillée comme milieu de dissolution et ce, étant donné que l'acide niflumique pur présente une faible solubilité aqueuse. L'augmentation du taux de dissolution des dispersions solides formulées comparée à un produit commercial prouve l'amélioration de la solubilité de l'acide niflumique et donc la biodisponibilité et l'efficacité thérapeutique du médicament formulé.

- Volume de milieu de dissolution : 500 ml.
- Température du milieu de dissolution : Le milieu est équilibré à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.
- Type d'agitation : palette avec fil.
- Vitesse de rotation : 100 tr/min.
- Temps de prélèvement : les temps auxquels sont effectués les prélèvements sont les suivants : 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min et 60 min. Les échantillons de milieu prélevés sont remplacés par des volumes égaux de milieu de dissolution.
- Méthode de dosage de l'acide niflumique : est décrite ci-dessous.

Conditions chromatographiques

Régime : isocratique

Colonne : Gel de silice octylsilylé pour chromatographie, C8 (250mm×4,6mm×5µm)

Longueur d'onde : 267 nm

Débit : 2 ml/min

Volume d'injection : 25 µl

Préparation des solutions

- Phase mobile : Mélange égaux en eau distillée et acétonitrile, pH est ajusté avec l'acide phosphorique 85%. Le mélange est filtré sur un filtre membrane de 0,45 µm puis dégazé pendant 15 min.
- Diluant : Mélange en Acétonitrile / Eau.
- Solution standard : on fait dissoudre une quantité de 50 mg de l'acide niflumique dans 25 ml de diluant puis on complète à 50 ml avec le diluant. On prélève 4 ml de la solution obtenue puis on complète à 20 ml avec la phase mobile.
- Solution échantillon : dans une vial HPLC, on introduit 2 ml de l'échantillon prélevé et filtré sur un filtre membrane de 0,45µm.

Formule de calcul

$$Teneur\ en\ acide\ niflumique\ en\ (\%) = \frac{S_{ech}}{S_{st}} \times \frac{P_{st}}{Dil_{st}} \times \frac{V_{milieu}}{P_{ech}} \times P \quad (3.5)$$

Avec :

- S_{ech} Surface de l'acide niflumique dans la solution échantillon.
- S_{st} Surface du de l'acide niflumique dans la solution standard.
- P_{st} Prise d'essai de l'acide niflumique dans la solution standard, en mg.
- Dil_{st} Dilution de la solution standard, en ml.
- V_{milieu} Volume de milieu de dissolution, en ml.
- P_{ech} Prise d'essai nominale de l'acide niflumique dans la dispersion solide, en mg.
- P Pureté de l'acide niflumique, en %.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans ce chapitre seront présentés les résultats obtenus dans les deux parties de cette thèse :

La première partie concernant les nanoparticules de ZnO synthétisées par la méthode sol-gel, les résultats seront présentés selon l'ordre suivant :

- Caractérisation de ZnO synthétisé par différentes techniques d'analyse, à savoir DRX, IR, Raman, DLS, XPS et MEB-EDX, et ce afin de confirmer la structure et la taille des particules de ZnO.
- Contrôle physico-chimique de ZnO synthétisé, afin de vérifier que ses spécifications correspondent bien à la monographie de la Pharmacopée Européenne pour usage pharmaceutique.
- L'étude de l'efficacité de l'activité antibactérienne et antifongique de la combinaison de ZnO NPs avec trois antibiotiques, à savoir ZnO-CTC, ZnO-SPM et ZnO-AZ contre 04 souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et 03 souches de champignons (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus brasiliensis*). Le but est de prouver que l'association du ZnO NPs à certains antibiotiques améliore l'activité antimicrobienne de ces derniers, ce qui constitue une piste importante à explorer dans le domaine médical.
- L'étude toxicologique de ZnO NPs synthétisé afin de vérifier la toxicité orale aiguë (in vivo) de la matière conformément à l'OCDE N° 423 et vérifier l'effet irritant/corrosif du gel formulé à base de ZnO NPs (in vivo) conformément aux recommandations de l'OCDE N° 404.
- L'étude de stabilité du ZnO NPs synthétisé, réalisée sur une période de deux ans, et ce afin de vérifier la conformité des paramètres : aspect, pureté et taille des particules de ZnO dans le temps.

Les résultats de la deuxième partie « Dispersions solides à base de l'acide niflumique » seront présentés comme suit :

- Aspect des dispersions solides formulées par la technique « évaporation du solvant »
- Solubilité de l'acide niflumique et des dispersions solides formulées, dans le but de mettre en évidence l'amélioration de la solubilité aqueuse des dispersions solides formulées par rapport à la substance pure.
- Caractérisation des dispersions solides formulées à base de NIF/PVP, NIF/PEG 1500 et NIF/PEG 6000 (à différents ratios) par différentes techniques d'analyse, à savoir : IR,

DRX, DSC-ATG et MEB-EDX, et ce afin de pouvoir confirmer la réussite de la formulation des dispersions solides amorphes.

- Teneur de l'acide niflumique dans les médicaments formulés à base de dispersions solides, effectué par HPLC afin de vérifier que les produits contiennent la posologie nécessaire.
- Etude comparative des profils de dissolution (in vitro) de l'acide niflumique dans les dispersions solides formulées, les mélanges physiques et un produit commercial, et ce afin de pouvoir prouver l'amélioration significative de la solubilité et de la dissolution de l'acide niflumique en utilisant la technique « Dispersion solides par évaporation du solvant », ce qui entraîne l'amélioration de la biodisponibilité et de l'efficacité thérapeutique du médicament.

4.1. Résultats et discussion de la partie « ZnO NPs synthétisées par la méthode sol-gel »

4.1.1. Caractérisation des NPs de ZnO

La poudre obtenue par le protocole de synthèse décrit dans la partie « 3.3.1 » est caractérisée par différentes techniques d'analyses afin de pouvoir confirmer que le matériau obtenu est du ZnO à l'échelle nanométrique.

4.1.1.1. Par DRX

Le diffractogramme du produit synthétisé est illustré dans la figure (4.1) ci-dessous.

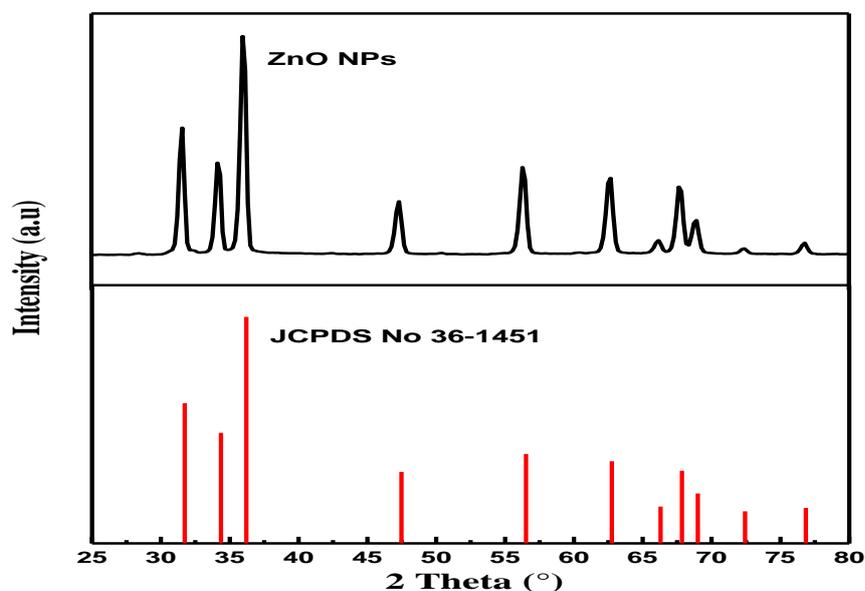


Figure 4.1. : Diffractogramme du ZnO synthétisé et du ZnO standard (JCPDS card No. 36-1451)

Discussion

Le diffractogramme représenté sur la figure (4.1) montre 11 pics qui se situent dans la domaine 2θ à $31,5^\circ$; $34,2^\circ$; $36,0^\circ$; $47,3^\circ$; $56,3^\circ$; $62,6^\circ$; $66,1^\circ$; $67,7^\circ$; $68,9^\circ$; $72,4^\circ$ et $76,7^\circ$, correspondant à ceux de la référence (JCPDS No. 36-1451), à savoir : (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) et (202) [126]. L'absence des pics secondaires indique que la méthode de synthèse utilisée a permis la fabrication de ZnO très pur avec décomposition complète des précurseurs utilisés. [127]

Les 11 pics de diffraction qui apparaissent avec une bonne résolution confirment la cristallinité élevée du ZnO. [128]

En utilisant l'équation de Sherrer, dont le pic le plus intense correspond au troisième pic nommé (101), la taille moyenne des cristallites de ZnO synthétisé est égale à 18 nm. Ce qui implique que le ZnO obtenu est d'ordre nanométrique.

On peut conclure que le ZnO NPs synthétisé est pur et présent sous forme de structure hexagonale de type wurtzite, groupe P63mc.

4.1.1.2. Par spectroscopie Infrarouge

Le spectre infrarouge de ZnO synthétisé est illustré ci-dessous.

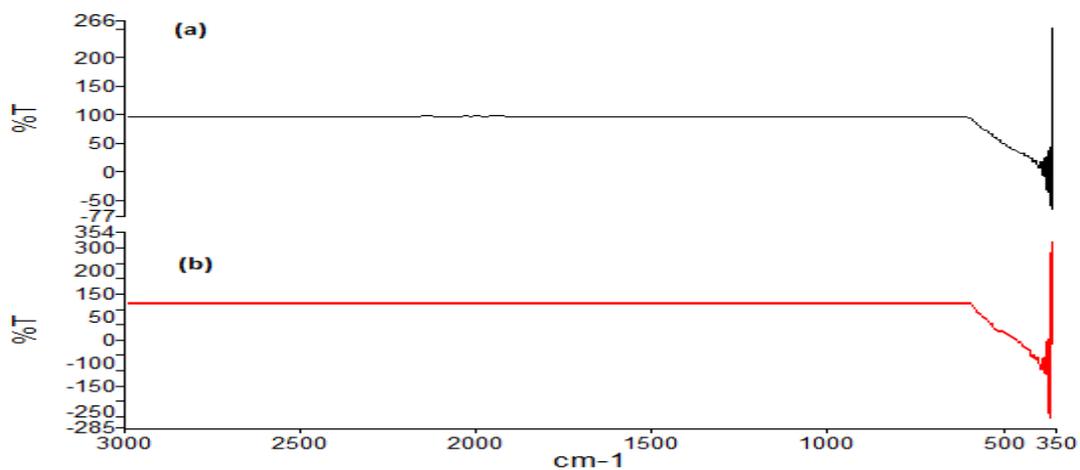


Figure 4.2 : Spectres IR (a) ZnO commercial et (b) ZnO synthétisé

Discussion

L'analyse par IR est réalisée afin de vérifier les différents modes de vibrations présents dans le ZnO synthétisé. La figure (4.2) montre que le spectre IR du ZnO synthétisé correspond à celui du

ZnO commercial. Un pic intense est présent à environ 360 cm^{-1} dans le spectre correspondant au ZnO synthétisé. Selon la recherche bibliographique effectuée, les pics présents en dessous de 700 cm^{-1} correspondent à la liaison Métal-Oxyde (dans notre cas Zn-O) [129-130]. L'absence des pics secondaires confirme que le ZnO synthétisé est pur.

4.1.1.3. Par spectroscopie Raman

Le spectre Raman du produit synthétisé obtenu est illustré ci-dessous.

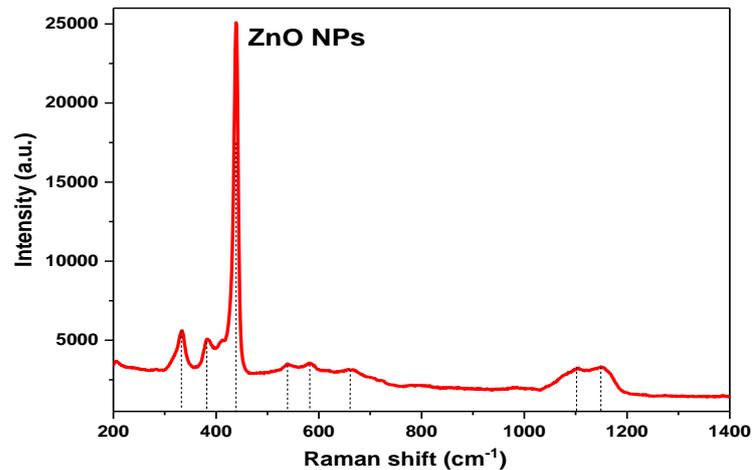


Figure 4.3 : Spectre Raman du ZnO synthétisé

Discussion

Les raies Raman nous ont permis de déterminer la composition chimique du matériau synthétisé. Selon la littérature et la banque de données du CDTA, le spectre Raman obtenu correspond au ZnO.

La figure (4.3) montre que la raie la plus importante est présente à 436 cm^{-1} (notée E 2 High), cette dernière correspond au déplacement des atomes d'oxygène. Il est à noter que le mode haut (High) est une indication de la haute cristallinité de la structure ZnO. Cette raie intense est l'empreinte que le ZnO synthétisé ayant une structure hexagonale de type wurtzite très pur, ce qui est confirmé par le résultat obtenu par DRX. [76] [131]

La présence de la raie autour de 330 cm^{-1} correspond à une vibration de second ordre, attribuée à E2 (haut) - E2 (bas) [132]

Les petites raies présentes à 381 cm^{-1} et 414 cm^{-1} sont attribués à des phonons optiques transversaux [133]. Celles présentes à 539 cm^{-1} , 657 cm^{-1} , 1104 cm^{-1} et 1150 cm^{-1} sont associés au phénomène de diffusion des phonons multiples [134].

4.1.1.4. Par DLS

La technique « Diffusion dynamique de la lumière (DLS) » nous a permis de préciser la taille des particules du ZnO synthétisé. L'instrument utilisé « Horiba Nanopartica SZ-100 séries » peut mesurer et donne le profil de distribution des tailles des particules des échantillons allant de 0,3nm à 8µm. Le profil de distribution de la taille des particules de ZnO synthétisé est illustré dans la figure ci-dessous.

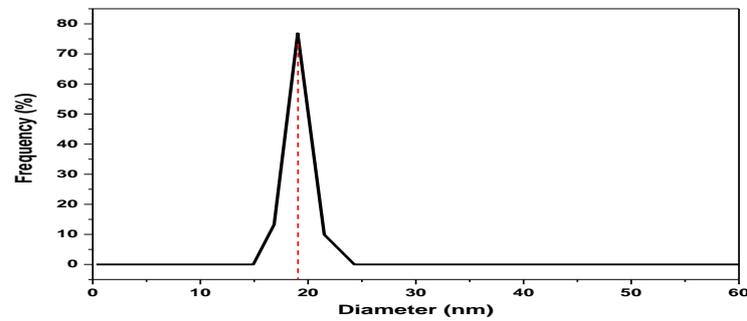


Figure 4.4 : Profil de distribution de tailles des particules de ZnO synthétisé

Discussion

La figure (4.4) démontre que le profil de distribution est monodispersé et que le ZnO synthétisé ayant une taille des particules moyenne d'environ 19 nm, ces résultats confirment les résultats obtenus par DRX.

4.1.1.5. Par spectroscopie de photoélectronique à rayon (XPS)

Le spectre du ZnO synthétisé obtenu par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) est illustré dans la figure (4.5) ci-dessous.

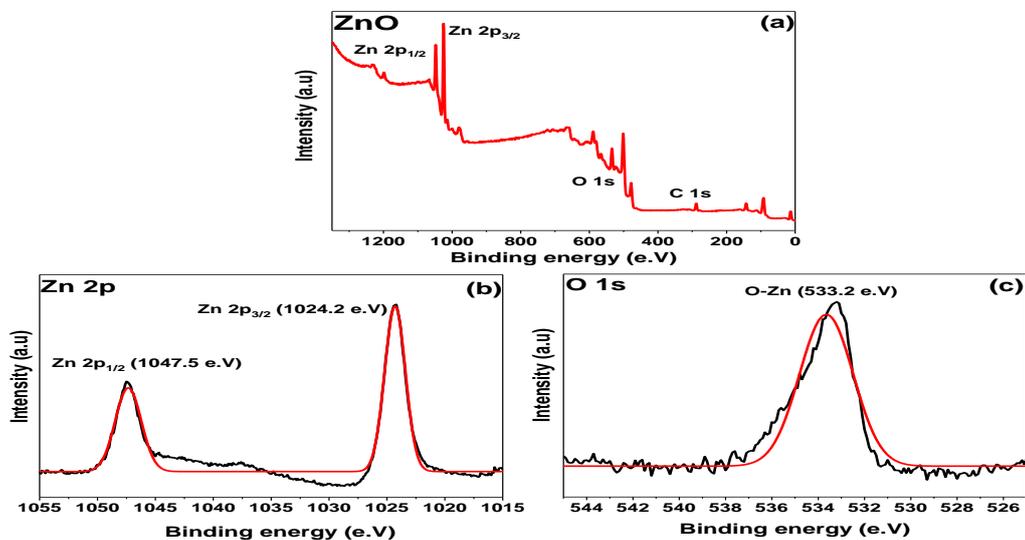


Figure 4.5 : Spectres XPS du ZnO synthétisé

Discussion

L'analyse XPS a été réalisée pour étudier la composition chimique du nanomatériau ZnO synthétisé. Les spectres XPS de la figure (4.5) correspondent parfaitement à ceux présentés dans la littérature. [135-138]

La figure (a) indique la présence des atomes de Zn, O et C, notant que la présence du C est due à l'instrument lui-même [135]. La figure (b) montre les énergies de liaison des pics Zn 2p correspondant à Zn 2p_{3/2} et Zn 2p_{1/2} situées à 1024,5 e.V et 1047,5 e.V, ce qui indique la formation de la liaison Zn-O. La figure (c) illustre que l'énergie de liaison du pic O1s est situé à 533,2 e.V correspond aux ions O₂ de la structure hexagonale de type wurtzite. [136-138]

4.1.1.6. Observations par MEB-EDX

Les figures (4.6) et (4.7) ci-dessous présentent les images et les résultats obtenus par MEB-EDX.

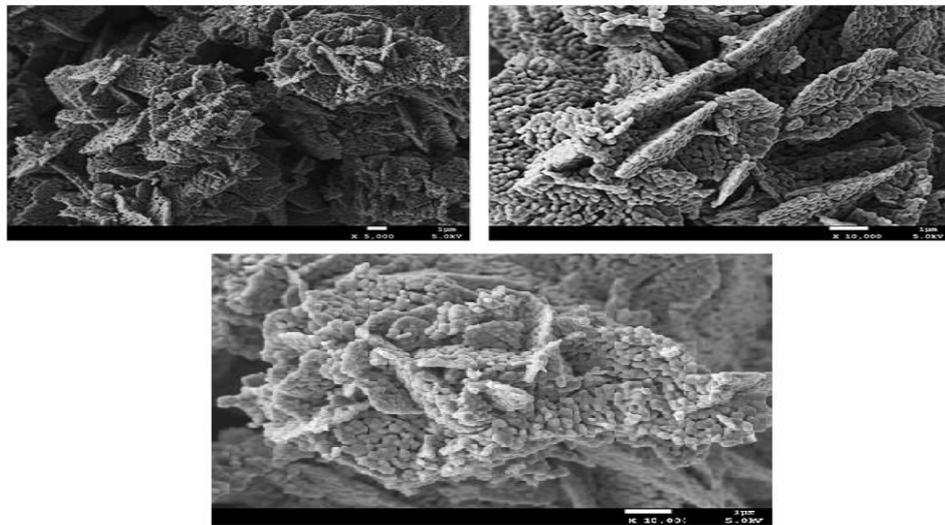


Figure 4.6 : Images MEB du ZnO synthétisé

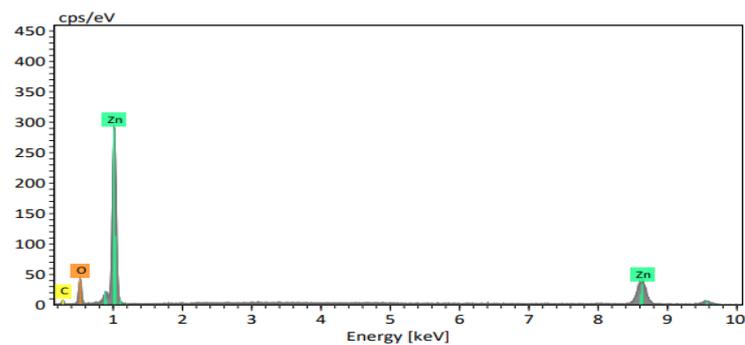


Figure 4.7 : Spectre EDX du ZnO synthétisé

Discussion

La morphologie du matériau ZnO synthétisé a été identifiée par le microscope à balayage électronique. La figure (4.6) présente une structure en forme de nano-fleur (Nano-flower), plus précisément une morphologie en forme de rose est observée avec quelques agglomérations des particules. Les mêmes images montrent une morphologie de surface presque sphérique. Ces observations sont en accord avec ceux rapportées dans la littérature. [139-140]

L'analyse par EDS nous a permis de confirmer l'identité du matériau synthétisé. Le spectre EDX, comme le montre la figure (4.7), présente deux pics correspondants au Zn situés à 1,0 et 8,6 KeV et un très faible pic à 9,6 KeV. Le pic correspond à l'oxygène est situé à environ 0,5 KeV. Le carbone présent dans le spectre est dû à l'analyse et à l'équipement.

Conclusion

A la lumière des résultats obtenus ci-dessus, on peut conclure que la caractérisation de la poudre synthétisée par différentes techniques d'analyse à savoir : DRX, IR, Raman, DLS, XPS et MEB-EDX, nous a permis de confirmer qu'il s'agit bien de ZnO très pur présent sous forme de nano-flower sphérique, ayant une structure cristalline hexagonale de type wurtzite, dont la taille moyenne des particules d'environ 19 nm. Le protocole de synthèse, par la méthode « Sol-gel », choisi est adéquat pour produire de ZnO NPs très pur.

4.1.2. Contrôle physico-chimique des NPs de ZnO synthétisées

Le contrôle physico-chimique du ZnO NPs a été réalisé conformément à la monographie de la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition. Les paramètres contrôlés sont les suivants : aspect, solubilité, identification, perte à la calcination et dosage ; et ce afin de vérifier la conformité du ZnO synthétisé aux spécifications décrites dans la pharmacopée Européenne pour substance à usage pharmaceutique. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.1. : Résultats du contrôle physico-chimique du ZnO synthétisé

Test	Spécifications	Résultats
Aspect	Poudre lisse, légère, blanche ou blanc jaunâtre	Poudre lisse, très fine, de couleur blanche
Solubilité	l'oxyde de zinc est pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 %	ZnO synthétisé est pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 %
Identification par réaction chimique	l'oxyde de zinc prend une coloration jaune qui disparaît après refroidissement	ZnO synthétisé prend une coloration jaune qui disparaît après refroidissement
Parte à la calcination	≤ 1,0 %	0,07 %
Teneur en ZnO (par rapport à la substance calcinée)	99,0 % à 100,5 %	99,93 %

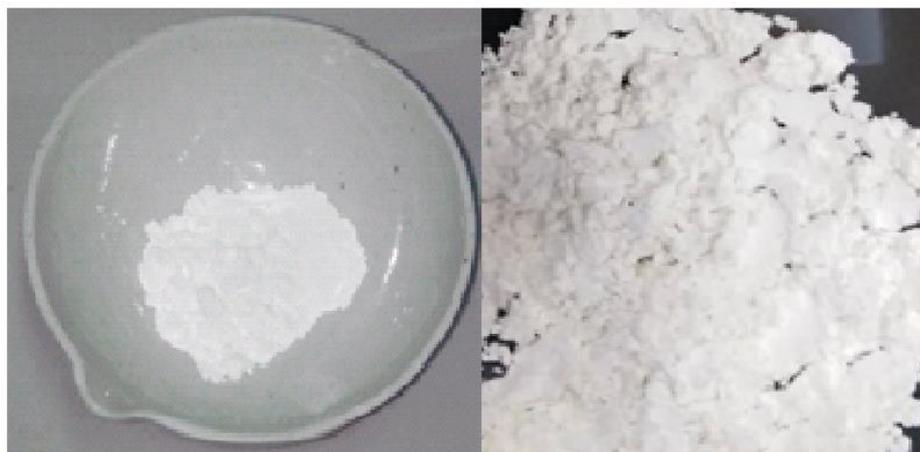


Figure 4.8 : Aspect du ZnO NPs synthétisé

Discussion

L'analyse des résultats présents dans le tableau ci-dessus nous permettra de conclure que le ZnO synthétisé est conforme aux exigences de la Pharmacopée Européenne pour usage pharmaceutique, la teneur du ZnO est de 99,93 % , ce qui confirme sa pureté.

4.1.3. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs associé à certains antibiotiques

Le but de cette étape était d'étudier l'effet antimicrobien de l'association du ZnO NPs aux antibiotiques suivants : chlorhydrate de chlortétracycline, spiramycine et azithromycine dihydraté. L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque contre deux bactéries à gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Escherichia coli* (ATCC 8739)) et deux bactéries à gram positif (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)). L'activité antifongique a été évaluée contre deux levures (*Candida albicans* (ATCC 10231) et *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763)) et un champignon (*Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)).

Les diamètres de la zone d'inhibition (ZI) des différents échantillons testés contre les différentes souches sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

L'amélioration ou la réduction des zones d'inhibition par rapport au ZnO NPs ou à l'antibiotique est déterminée par les équations suivantes :

$$\text{Aélioration/réduction ZI (\%)} = \frac{ZI_{(ZnO-ATB)} - ZI_{ZnO}}{ZI_{ZnO}} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\text{Aélioration/réduction ZI (\%)} = \frac{ZI_{(ZnO-ATB)} - ZI_{ATB}}{ZI_{ATB}} \times 100 \quad (4.2)$$

4.1.3.1. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs et CTC-ZnO NPs

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique de ZnO NPs et de l'association CTC-ZnO NPs sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau 4.2. : Résultats de l'activité antimicrobienne ZnO (500 µg/disque), CTC (2500 µg/disque) et CTC-ZnO NPs (500-2500 µg/disque)

Souches	Zone d'inhibition (mm)			Amélioration/Réduction	
	M ± SD			ZI (%)	
	ZnO NPs	CTC	CTC-ZnO	Comparé au ZnO	Comparé au CTC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,75±0,02	17,08±0,05	21,58±0,07	46,3	26,3
<i>Escherichia coli</i>	14,25±0,09	26,42±0,06	31,25±0,04	119,3	18,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,00±0,14	37,33±0,04	44,17±0,06	145,4	18,3
<i>Bacillus subtilis</i>	18,42±0,25	42,50±0,06	51,00±0,04	176,9	20,0
<i>Candida albicans</i>	15,92±0,07	21,75±0,1 ^(a)	23,08±0,06	45,0	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16,17±0,05	12,00±0,04 ^(a)	20,42±0,18	26,3	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26,00±0,04	14,17±0,06 ^(a)	31,58±0,01	21,5	-

(a) : Activité fongistatique

Discussion

Le ZnO NPs synthétisé présente une bonne activité antibactérienne et antifongique contre toutes les souches étudiées. La meilleure activité antibactérienne de ZnO NPs est observée contre les souches bactériennes à Gram positif *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, manifestée par des zones d'inhibition de 18,4 mm et 18,0 mm respectivement et contre le champignon *Aspergillus brasiliensis* avec une zone d'inhibition de 26,0 mm pour l'activité antifongique.

Le tableau (4.2) montre que la zone d'inhibition de l'antibiotique CTC sur les quatre souches, à savoir : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* est augmentée en présence de ZnO NPs de 26,3 %, 18,3%, 18,3 % et 20,0%, respectivement. Ces résultats démontrent l'efficacité de la combinaison de l'antibiotique CTC avec le ZnO NPs contre les micro-organismes à Gram positif et à Gram négatif, traduite par une amélioration significative de l'activité antibactérienne (voir la figure (4.9)).

Concernant les champignons, le CTC présente un effet fongistatique sur les trois espèces testées, tandis que le ZnO NPs présente une bonne activité fongicide. La zone d'inhibition de ZnO NPs contre le *Candida albicans*, le *Saccharomyces cerevisiae* et l'*Aspergillus brasiliensis* est passée de 15,9 mm, 16,2 mm et 26,0 mm à 23,1 mm, 20,4 mm et 31,6 mm avec la combinaison CTC-ZnO NPs, ce qui correspond à une augmentation de 45,0 %, 26,3 % et 21,5 % en diamètre,

respectivement. Cela implique que l'effet antimicrobien demeure plus intéressant en associant l'antibiotique CTC au ZnO NPs.

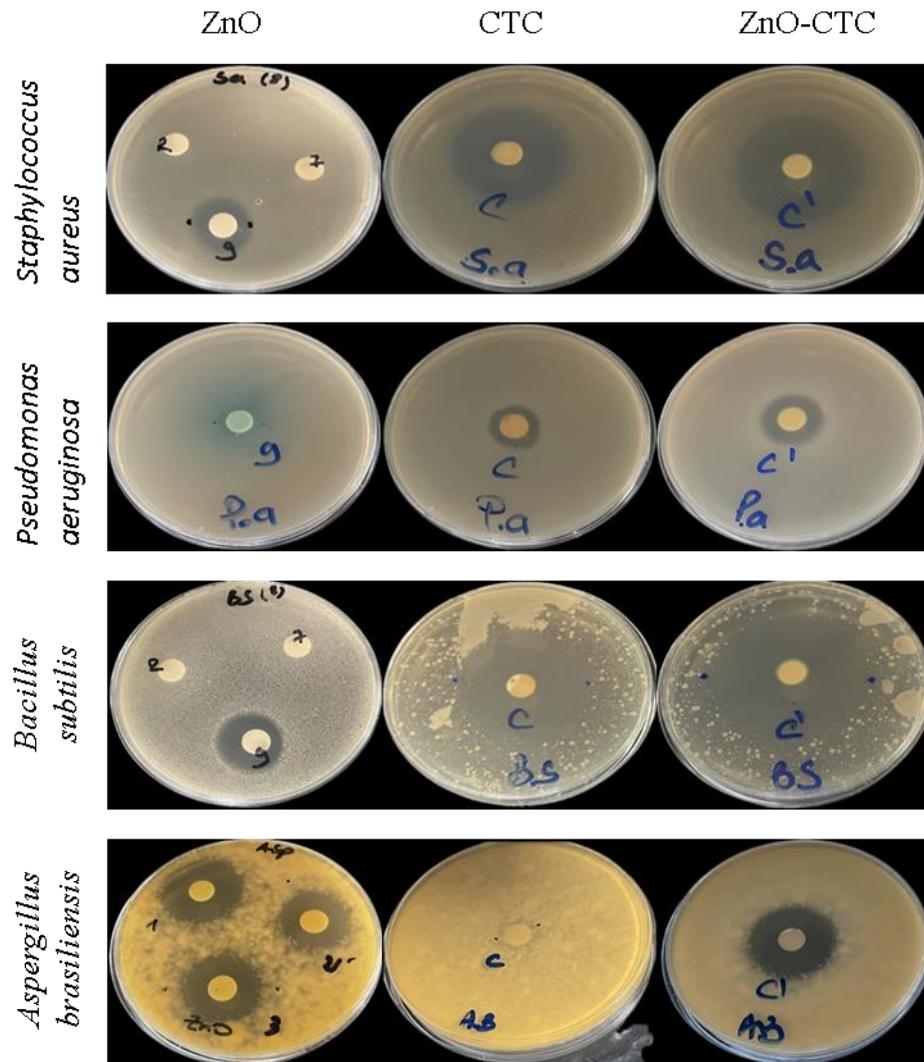


Figure 4.9 : Activité antimicrobienne du ZnO NPs, CTC et CTC-ZnO NPs sur différentes souches

4.1.3.2. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs et SPM-ZnO NPs

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique de ZnO NPs et de l'association SPM-ZnO NPs sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau 4.3. : Résultats de l'activité antimicrobienne ZnO (500 µg/disque), SPM (2500 µg/disque) et SPM-ZnO NPs (500-2500 µg/disque)

Souches	Zone d'inhibition (mm)			Amélioration/Réduction	
	M ± SD			ZI (%)	
	ZnO NPs	SPM	SPM-ZnO	Comparé au ZnO	Comparé au SPM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,75±0,02	12,00±0,04	14,08±0,07	-4,5	17,4
<i>Escherichia coli</i>	14,25±0,09	16,67±0,02	18,33±0,09	28,7	10,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,00±0,14	24,67±0,03	34,50±0,04	91,7	39,9
<i>Bacillus subtilis</i>	18,42±0,25	25,75±0,05	32,50±0,02	76,5	26,2
<i>Candida albicans</i>	15,92±0,07	-	15,25±0,05 ^(a)	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16,17±0,05	11,50±0,04 ^(a)	12,25±0,02	- 24,2	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26,00±0,04	-	16,42±0,04	- 36,9	-

(a) : Activité fongistatique

Discussion

D'après les résultats obtenus, la combinaison SPM-ZnO NPs présente un effet antibactérien contre toutes les bactéries étudiées (tableau 4.3), en particulier sur *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* dont les zones d'inhibition sont améliorées de 39,9 %, 26,2 % et 17,4 % respectivement.

Comparé au ZnO NPs, l'antibiotique SPM n'a aucune action fongique ou fongistatique contre le *Candida albicans* ou l'*Aspergillus brasiliensis*. Comme il est illustré dans la figure (4.10), la combinaison SPM-ZnO NPs a présenté un effet fongistatique contre le *Candida albicans* et un effet fongicide contre l'*Aspergillus brasiliensis* avec réduction du diamètre de la zone d'inhibition de 36,9 % comparé au ZnO NPs seul.

La SPM seule a eu un impact fongistatique sur le *Saccharomyces cerevisiae*, permettant l'inhibition de la croissance du champignon, tandis que la combinaison SPM-ZnO NPs a eu un effet antifongique qui est réduit par rapport au ZnO NPs seul.

De ce fait on peut conclure que la combinaison SPM-ZnO NPs a amélioré l'effet antimicrobien par rapport à l'antibiotique seul.

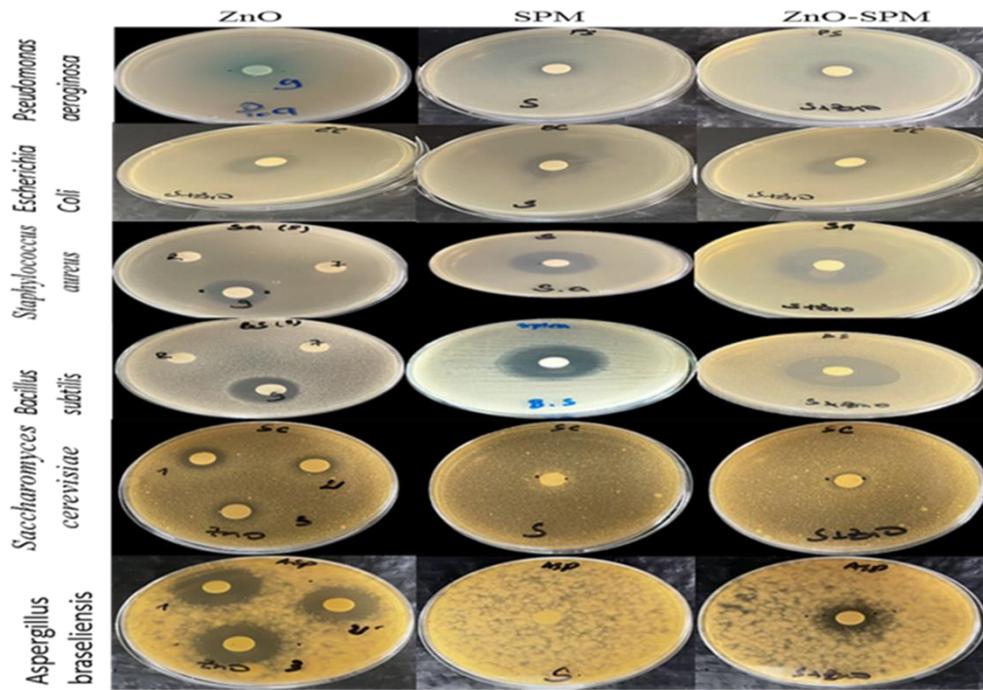


Figure 4.10 : Activité antimicrobienne du ZnO NPs, SPM et SPM-ZnO NPs sur différentes souches

4.1.3.3. Etude de l'activité antimicrobienne de ZnO NPs et AZ-ZnO NPs

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique de ZnO NPs et de l'association AZ-ZnO NPs sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau 4.4. : Résultats de l'activité antimicrobienne ZnO (500 µg/disque), AZ (1250µg/disque) et AZ-ZnO NPs (500-1250 µg/disque)

Souches	Zone d'inhibition (mm)			Amélioration/Réduction	
	M ± SD			ZI (%)	
	ZnO NPs	AZ	AZ-ZnO	Comparé au ZnO	Comparé à AZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,00±0,14	34,42±0,02	35,00±0,03	94,4	1,7
<i>Bacillus subtilis</i>	18,42±0,25	32,75±0,04	33,92±0,02	84,2	3,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,75±0,02	35,00±0,03	35,42±0,04	140,1	1,2
<i>Escherichia coli</i>	14,25±0,09	21,0±0,05	23,25±0,08	63,2	10,7
<i>Candida albicans</i>	15,92±0,07	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16,17±0,05	-	-	-	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26,00±0,04	15,25±0,05 ^(a)	12,58±0,03	- 51,6	-

(a) : Activité fongistatique

Discussion

Par exploitation des résultats mentionnés dans le tableau (4.4) on constate que, l'azithromycine dihydraté seule et le ZnO NPs seul présentent une bonne activité antibactérienne sur toutes les souches étudiées. Cependant, l'association de ces deux substances ne présente pas un effet antimicrobien intéressant (l'amélioration du diamètre de la zone d'inhibition varie de 1,2 % à 10,7% seulement).

En ce qui concerne les champignons, l'effet antifongique du AZ-ZnO NPs n'a été observé que contre *Aspergillus brasiliensis*. Ce qui indique que l'activité fongicide n'est pas affectée par l'association des NPs de ZnO avec l'azithromycine.

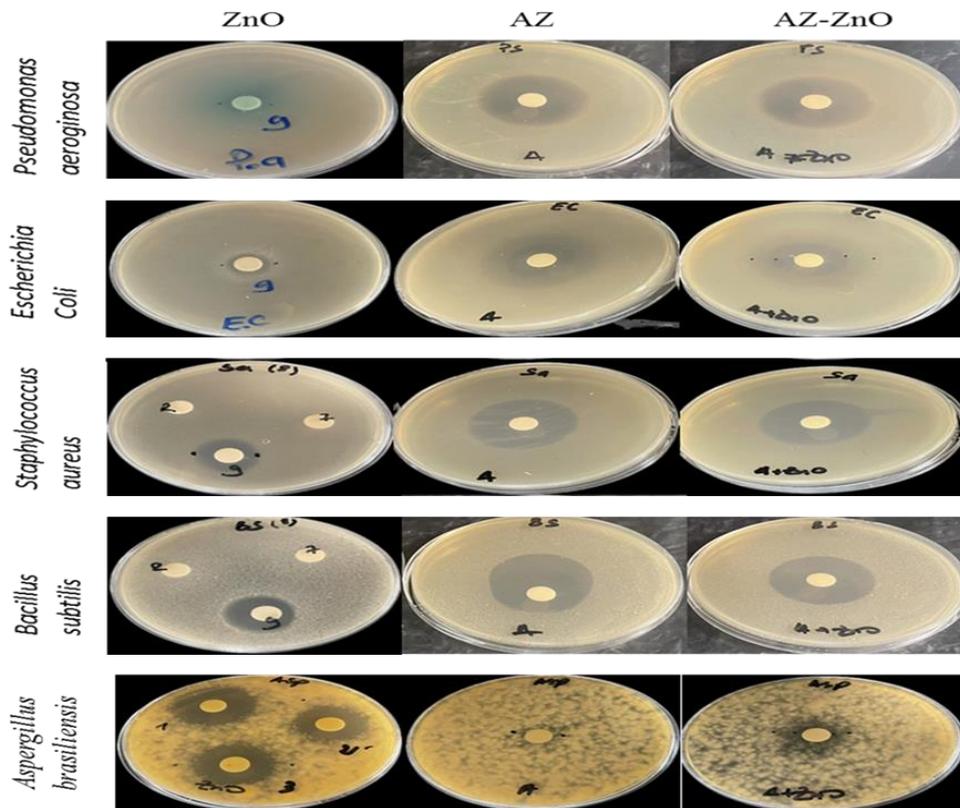


Figure 4.11 : Activité antimicrobienne du ZnO NPs, AZ et AZ-ZnO NPs sur différentes souches

La figure (4.12) ci-dessous regroupe les résultats de toutes les zones d'inhibition obtenues sur les différentes souches microbiennes, et ce pour mieux comprendre l'impact de l'association de ZnO NPs avec les différents antibiotiques étudiés.

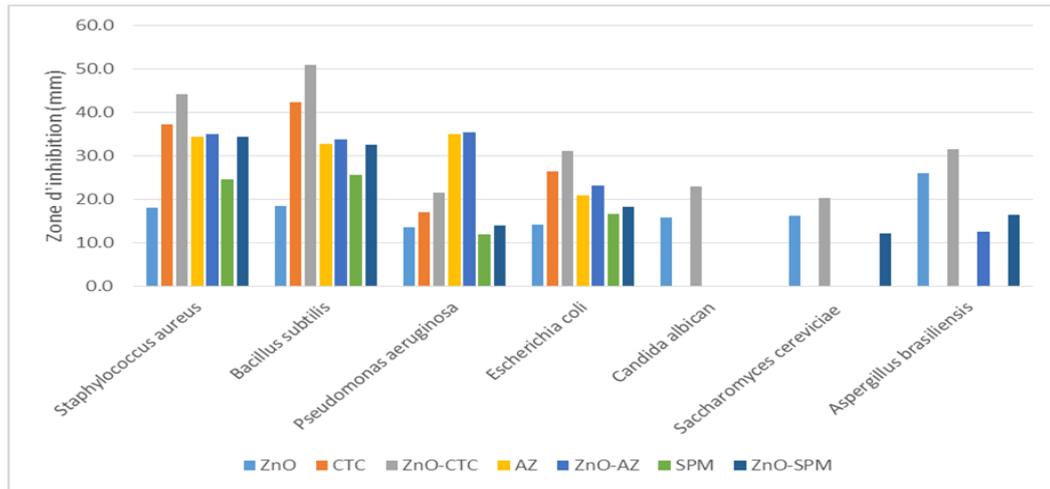


Figure 4.12 : Comparaison des zones d'inhibition du ZnO NPs, antibiotique et ZnO NPs-antibiotique sur les différentes souches microbiennes.

Conclusion

La présente étude nous a confirmé que les NPs de ZnO présentent une bonne activité antibactérienne et antifongique contre toutes les souches pathogènes étudiées. Ce qui justifie son choix en tant qu'agent antibactérien connu par son efficacité et son potentiel, pour l'associer à des substances médicamenteuses comme les antibiotiques.

Selon la littérature, les nanoparticules permettent l'inhibition des bactéries résistantes aux antibiotiques [141-142]

Parmi tous les antibiotiques testés, la combinaison CTC-ZnO NPs possède le plus grand potentiel antimicrobien traduit par un effet bactéricide et fongicide contre les différentes espèces étudiées. D'après *Banoee et al. (2010)*, *Tyagi et al. (2020)* et *Bhande et al. (2013)*, les nanoparticules de ZnO améliorent l'activité antibactérienne des antibiotiques. L'inhibition de la croissance bactérienne dépend de la forme, la taille, la charge de surface et la concentration des nanoparticules. [26] [143-144] [145-146]

La combinaison CTC-ZnO NPs pourrait être utilisée comme thérapie alternative pour le traitement des infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques, tels que le *Pseudomonas aeruginosa*. [147]

Selon la littérature, le mécanisme d'action antibiotique-ZnO NPs n'est pas bien connu, les NPs métalliques peuvent causer des dommages aux bactéries par la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que les radicaux hydroxyles et superoxydes, des dommages à l'ADN, des dommages oxydatifs, des dommages à la paroi cellulaire et à la membrane. [148]

Happy Agarwal et al. (2018) ont cité différents mécanismes d'action des nanoparticules de ZnO. Endommager la cellule bactérienne par perturbation de la bicouche phospholipidique, qui constitue une barrière, ce qui provoque la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et facilite la pénétration de l'antibiotique. Le stress oxydatif, est un autre mécanisme dont le ZnO d'ordre nanométrique endommage la membrane cellulaire de la bactérie par production des espèces oxygénés réactives (ROS), ce qui facilite le passage à l'antibiotique pour inhiber la croissance bactérienne. Ces ROS inhibent ou altèrent la réplication de l'ADN, le cycle de synthèse des protéines, le cycle du métabolisme alimentaire ou le cycle respiratoire. [144] [145]

Cependant, la fixation de ZnO NPs et leur transport à l'intérieur de la cellule bactérienne se fait comme suit : les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane et des acides téichoïques et lipotéichoïques. Ces acides fixent l'ion Zn^{+2} et le transportent à l'intérieur de la cellule, tandis que pour les bactéries à Gram négatif, les porines présents dans la couche externe de peptidoglycane facilitent la diffusion passive des nanoparticules à l'intérieur de la cellule. [145-146]

Le ZnO NPs se dissout dans le milieu aqueux et libère l'ion Zn^{+2} , la fixation des NPs sur la surface de la cellule se fait par attraction électrostatique de Zn^{+2} vers la membrane chargée négativement. L'augmentation de la concentration de Zn^{+2} dans le cytoplasme bactérien entraînant une fuite de la membrane et une perte de la force motrice des protons. *Chen et al.* (2005) ont signalé que les nanoparticules de petite taille interagissaient mieux avec la membrane cellulaire et présentaient une plus grande toxicité. [145] [149]

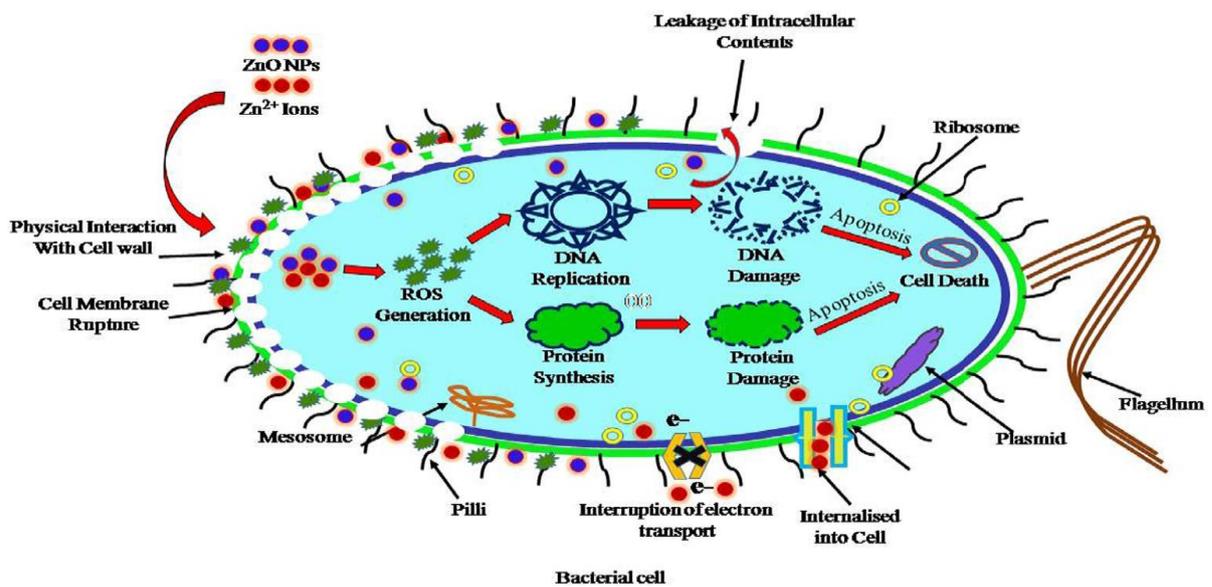


Figure 4.13 : Schéma représentative du mécanisme proposé pour l'activité antibactérienne des NPs de ZnO [1]

4.1.4. Evaluation toxicologique de ZnO NPs

4.1.4.1. Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë (test in vivo)

Le test de toxicité orale aiguë est effectué conformément aux recommandations de l'OCDE N° 423.

Deux groupes de trois souris de type NMRI ont été préparés, on a administré à chaque groupe une seule dose de la solution aqueuse de ZnO NPs, le premier groupe a reçu la dose de 20mg/0,5ml de ZnO NPs et le deuxième groupe a reçu la dose de 40mg/0,5ml de ZnO NPs. Les souris sont mises sous observation pendant 14 jours, selon les fréquences exigés dans l'OCDE N° 423.



Figure 4.14 : Photo de l'administration de la dose de ZnO NPs à la souris type NMRI

Résultats

Pour les deux groupes de 03 souris de type NMRI chacun, aucune mortalité ou réaction de toxicité (modifications du comportement (tremblement, convulsion, salivation, diarrhée sommeil et coma), modifications de la peau (des poils, des yeux et des muqueuses), modifications de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux et de l'activité somato-motrice) n'a été enregistrée pendant 14 jours.

4.1.4.2. Effet irritant/corrosif aigu sur la peau (test in vivo)

La vérification de l'irritation ou de la corrosion aiguë du produit gel à base de ZnO NPs est effectuée sur la peau des lapins conformément aux recommandations de l'OCDE N°404.

Trois lapins de race albinos néo-zélandais ont été préparés. Le test est réalisé sur le premier lapin, si aucun effet corrosif n'apparaît, le test est ensuite effectué sur les deux autres lapins. Le produit gel à base de ZnO NPs est appliqué sur une petite zone de la peau saine du lapin et sur une petite zone de la peau scarifiée du lapin (tel que décrit dans la partie expérimentale).



Figure 4.15 : Photos du test effet irritant du gel ZnO NPs sur les lapins

La cotation des réactions cutanées (Formation d'érythème, d'escarre ou d'œdème) est réalisée conformément aux recommandations de l'OCDE, selon le tableau décrit ci-dessous.

Tableau 4.5. : Cotation des réactions cutanées selon l'OCDE N° 404

Formation d'érythème et d'escarre	
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4
Maximum possible : 4	
Formation d'œdème	
Pas d'œdème	0
Œdème très léger (à peine perceptible)	1
Œdème léger (pourtour de la zone œdémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4
Maximum possible : 4	

Les résultats de la cotation des réactions cutanées observées après l'application du gel à base de ZnO NPs sont reportés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 4.6 : Cotation des réactions cutanées sur la peau du 1^{er} lapin

1 ^{er} lapin (Peau saine)														
Type	Formation d'Erythème et d'escarre							Formation d'Œdème						
Période d'observation	t ₀	3min	1h	4h	24h	48h	72h	t ₀	3min	1h	4h	24h	48h	72h
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 ^{er} lapin (Peau scarifiée)														
1 ^{er} timbre appliqué pendant 3 min														
Cotation	2	2	1	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0
2 ^{ème} timbre appliqué pendant 1 h														
Période d'observation	t ₀	1h	4h	24h	48h	72h	t ₀	1h	4h	24h	48h	72h		
Cotation	2	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0		
3 ^{ème} timbre appliqué pendant 4 h														
Période d'observation	t ₀	4h	24h	48h	72h	t ₀	4h	24h	48h	72h				
Cotation	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0				

Discussion

Après l'application du premier timbre du produit gel à base de ZnO NPs (pendant 3 min) sur une petite zone de la peau scarifiée du premier lapin, on a observé la formation d'un érythème bien défini avec un léger œdème disparaissant complètement après 24 h.

Ces observations sont confirmées par l'application du 2^{ème} et 3^{ème} timbre sur le même lapin.

Afin de confirmer les résultats obtenus, et conformément aux exigences de l'OCDE N°404, le produit est appliqué sur deux autres lapins avec un seul timbre qui est appliqué pendant 4h, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.7 : Cotation des réactions cutanées sur la peau du 2^{ème} et 3^{ème} lapin

2 ^{ème} lapin (Peau saine)										
Type	Formation d'Erythème et d'escarre					Formation d'Œdème				
Période d'observation	t ₀	4h	24h	48h	72h	t ₀	4h	24h	48h	72h
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 ^{ème} lapin (Peau scarifiée)										
Un seul timbre appliqué pendant 4h										
Cotation	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0
3 ^{ème} lapin (Peau saine)										
Période d'observation	t ₀	4h	24h	48h	72h	t ₀	4h	24h	48h	72h
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 ^{ème} lapin (Peau scarifiée)										
Un seul timbre appliqué pendant 4h										
Cotation	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0

Discussion

L'application du timbre du produit gel à base de ZnO NPs (pendant 4h) sur une petite zone de la peau scarifiée du deuxième et troisième lapin a confirmé le résultat obtenu avec le premier lapin. En effet, l'érythème et l'œdème ont disparu complètement après 24 h, avec croissance capillaire des poils sur la peau des lapins après 72 h de traitement. De ce fait, on peut conclure que le produit formulé à base de ZnO NPs synthétisé ne présente aucun effet irritant significatif.

4.1.5. Etude de stabilité des NPs de ZnO synthétisé

Afin de vérifier la conformité des spécifications de ZnO NPs, une étude de stabilité est réalisée, la matière a été mise dans des conditions ambiantes (25°C / 60% HR), les paramètres contrôlés sont : aspect, teneur en ZnO (selon la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition) et taille des particules. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.8 : Résultats étude de stabilité de ZnO NPs

Tests	Spécifications	T=0	T=24mois
Aspect	Poudre lisse, légère, blanche ou blanc jaunâtre	Répond	Répond
Teneur en ZnO	99,0 % à 100,5 %	99,9	99,8
Taille moyenne des particules par DLS	Environ 20 nm	22	20

Discussion

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, on peut conclure que le ZnO NPs synthétisé conservé pendant deux ans dans un récipient étanche, est resté toujours conforme en termes d'aspect, pureté qui est de 99,8 % et taille des particules.

Il est nécessaire de signaler que le procédé de synthèse décrit dans le chapitre 3 est considéré comme reproductible, car, pendant toute la période de préparation du présent travail, plusieurs échantillons à l'échelle laboratoire ont été synthétisés et ont présentés tous les mêmes résultats en termes de caractérisation et efficacité de l'activité antimicrobienne.

4.2. Résultats et discussion de la partie « Dispersions solides à base de l'acide niflumique »

4.2.1. Aspect des dispersions solides formulées

L'aspect des différentes dispersions solides formulées par la technique « évaporation du solvant » est présenté dans la figure ci-dessous. Il s'agit de poudres fines blanches à sensiblement blanches. L'aspect de la matière « Acide niflumique » utilisée dans la formulation des dispersions solides est conforme aux spécifications de la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition (2020)), elle est présentée sous forme de poudre cristalline jaune pâle comme l'illustre la figure ci-dessous :

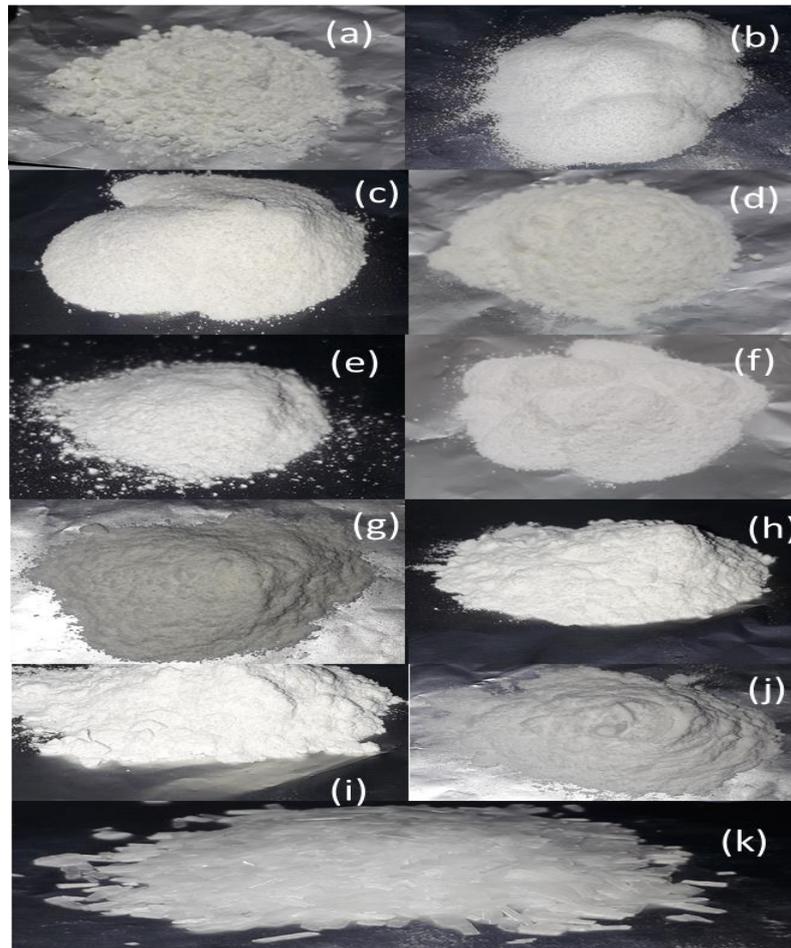


Figure 4.16 : Aspect des différentes dispersions solides formulées, (a) acide niflumique pur, (b) PVP, (c) NIF/PVP (1), (d) NIF/PVP (2), (e) NIF/PVP (3), (f) NIF/PVP (4), (g) NIF/PEG 1500 (1), (h) NIF/PEG 1500/TA (1), (i) NIF/PEG 6000 (1), (j) NIF/PEG 6000/TA (1) et (k) PEG 6000.

4.2.2. Solubilité de l'acide niflumique et des dispersions solides formulées

La figure ci-dessous présente la solubilité de l'acide niflumique et des différentes formulations préparées.

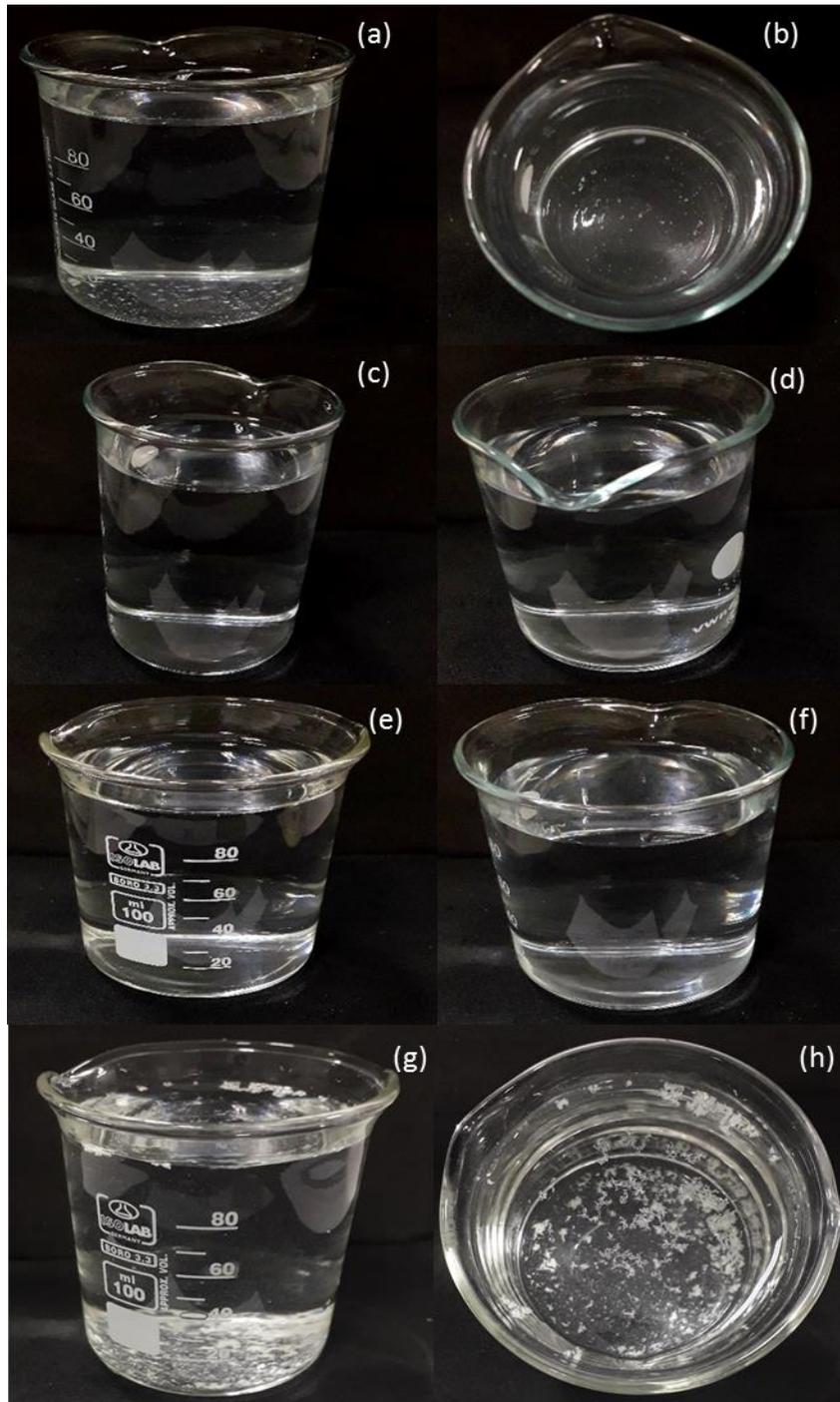


Figure 4.17 : Solubilité dans l'eau des différentes dispersions solides formulées, (a) NIF/PVP (1), (b) NIF/PVP (2), (c) NIF/PVP (3), (d) NIF/PVP (4), (e) NIF/PEG 1500/TA (1), (f) NIF/PEG 6000/TA (1) et (g) (h) acide niflumique pur.

Discussion

Les différentes solutions sont préparées pour vérifier la solubilité dans l'eau de l'acide niflumique utilisé dans la formulation des dispersions solides. Selon la Pharmacopée Européenne, l'acide

niflumique est pratiquement insoluble dans l'eau, ceci est confirmé par notre étude. Car, avec les concentrations 0,1 mg/ml et 0,05 mg/ml, on observe la présence d'une quantité de l'acide niflumique non dissoute qui sédimente dans le temps. La dissolution complète de l'acide niflumique dans l'eau n'est observée qu'avec la concentration 0,025 mg/ml, ce qui est en concordance avec la littérature qui rapporte que la solubilité de l'acide niflumique dans l'eau est très faible, environ 26 µg/ml (à 25°C). [123-124]

Les solutions des formulations NIF/PVP (1) et NIF/PVP (2) préparées à 0,2 mg/ml présentent une nette amélioration par rapport à la solution préparée avec l'acide niflumique seul (Figure 4.17 (a) et (b)). Tandis que, les formulations NIF/PVP (3), NIF/PVP (4), NIF/PEG 1500/TA (1) et NIF/PEG 6000/TA (1) présentent une solubilité complète à la concentration de 0,2 mg/ml, ce qui représente une amélioration de 8 fois plus par rapport à l'acide niflumique seul.

La caractérisation ainsi que l'étude de dissolution des différentes formulations sont nécessaires pour pouvoir justifier que cette amélioration est liée à la réussite de la formulation de dispersion solide.

4.2.3. Caractérisation des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique

4.2.3.1. Analyse par IR

Afin d'étudier l'interaction entre la substance active « Acide niflumique » et les polymères « Povidone », « PEG 1500 » et « PEG 6000 » et pouvoir vérifier la réussite de la formulation des dispersions solides, on présente ci-dessous les différents spectres IR enregistrés.

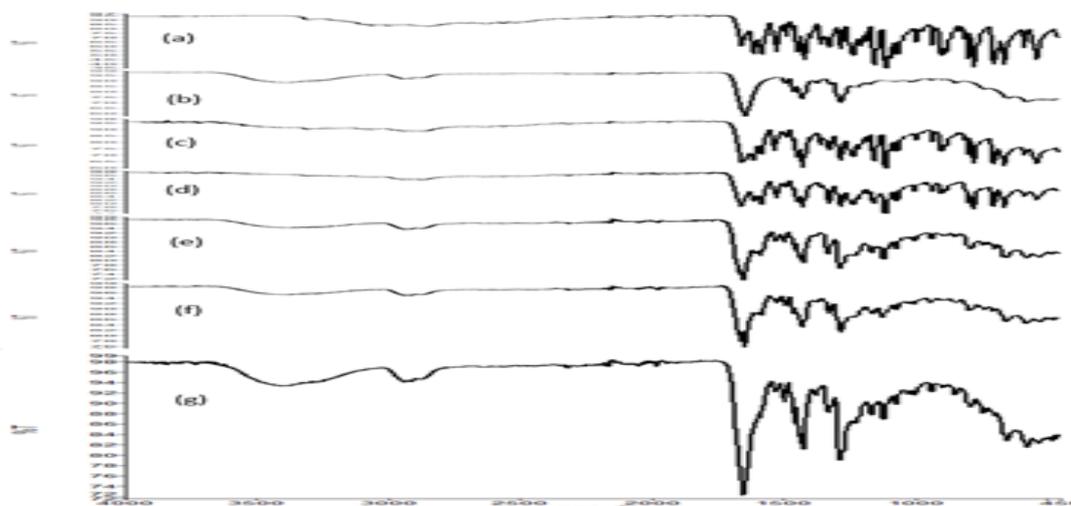


Figure 4.18 : Spectres infra-rouge, (a) NIF pur, (b) PVP, (c) Mélange physique, (d) NIF/PVP (1), (e) NIF/PVP (2), (f) NIF/PVP (3) et (g) NIF/PVP (4)

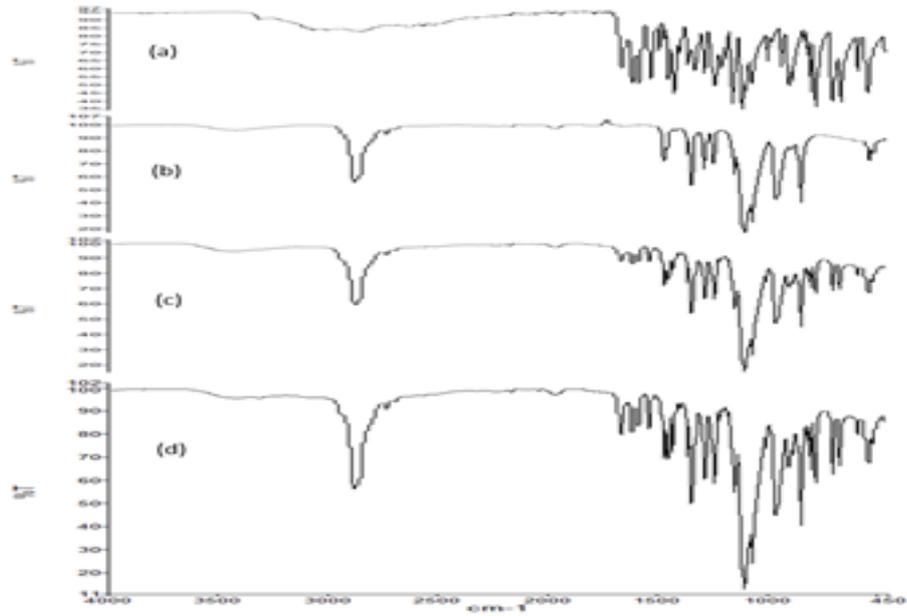


Figure 4.19 : Spectres infra-rouge, (a) NIF pur, (b) PEG 1500, (c) NIF/PEG 1500/TA (1), (d) NIF/PEG 1500 (1)

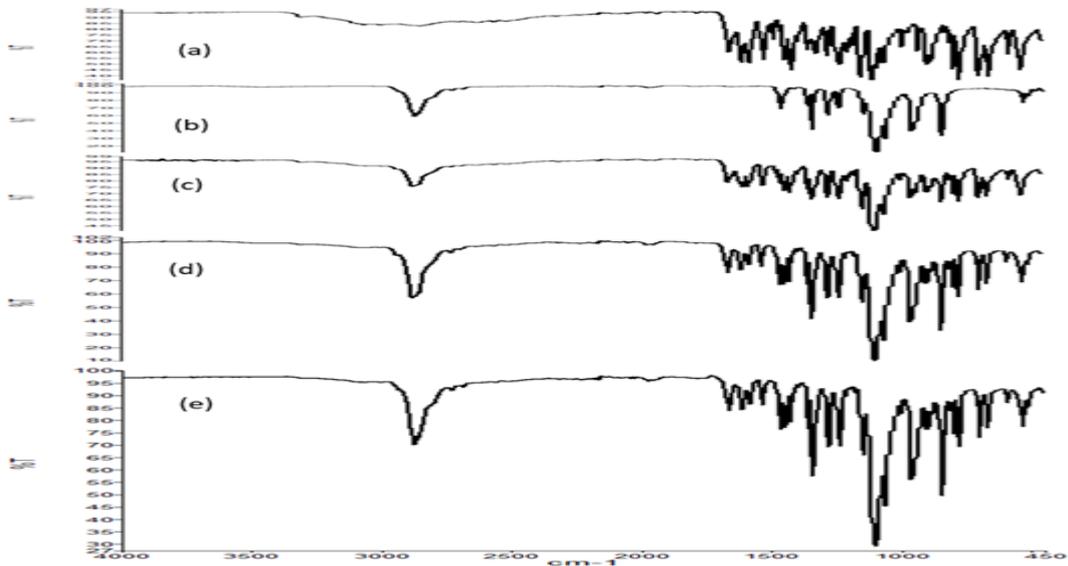


Figure 4.20 : Spectres infra-rouge, (a) NIF pur, (b) PEG 6000, (c) Mélange physique, (d) NIF/PEG 6000/TA (1), (e) NIF/PEG 6000 (1)

Discussion

Le spectre IR de l'acide niflumique pur (Figure 4.18 (a)) présente une bande à $1326,7 \text{ cm}^{-1}$ qui correspond à CF_3 , notons que certains articles indiquent la présence de cette liaison à environ $1130\text{-}1140 \text{ cm}^{-1}$. [150-151]

Une bande caractéristique du groupe carboxy (C=O) est présente à $1661,8\text{ cm}^{-1}$, et une autre correspond au groupe C-H à 879 cm^{-1} . Le spectre montre aussi la présence d'un petit pic à environ 3500 cm^{-1} qui correspond aux groupes O-H et N-H. Cela est en concordance avec la littérature. [123] [150-152]

Le spectre IR du « Povidone » (Figure 4.18 (b)) présente un pic intense à 1656 cm^{-1} correspondant à la vibration C=O et une bande large à environ 3400 cm^{-1} qui correspond à la vibration O-H, cela convient parfaitement à ce qui est rapporté dans la littérature par *R.Ambrus et al.* (2011) et *C. Yu et al.* (2023). [123] [153]

Le spectre IR du mélange physique « acide niflumique et povidone » (Figure 4.18 (c)) est plus proche au spectre de l'acide niflumique seul avec absence d'une bande large à environ 3500 cm^{-1} et absence d'interaction chimique entre les deux composés.

Tandis que le spectre IR de la dispersion solide NIF/PVP (4) (Figure 4.18 (g)), montre un élargissement et un décalage de certaines bandes. Le petit pic de l'acide niflumique pur du groupe O-H à environ 3500 cm^{-1} est remplacé par une bande large à $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ce qui indique, selon la littérature, que l'acide niflumique est incorporé dans le réseau du polymère « Povidone ». De plus, la disparition de plusieurs pics et la diminution de l'intensité de la bande correspond au groupe C=O indiquent la formation de liaison hydrogène intermoléculaire entre le groupe carbonyle de l'acide niflumique et le groupe hydroxyle du polymère. Cela est observé aussi avec les formulations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2) et NIF/PVP (3), ce qui nous permet de supposer la réussite de la formulation des dispersions solides NIF/PVP [153-155]. Notons cependant, que la formulation NIF/PVP (1) ne présente pas de bande large entre 3400 et 3500 cm^{-1} .

Les spectres IR du PEG 1500 et PEG 6000 (Figures 4.19 et 4.20) montrent la présence de la liaison C-H à environ 2883 cm^{-1} et du groupe O-H à environ 3500 cm^{-1} avec le PEG 1500, ce qui est en corcondence avec la littérature. [153]

Le spectre IR du mélange physique NIF et PEG 6000 (Figure 4.20 (c)) n'indique aucune interaction chimique entre les deux composés.

Les formulations NIF/PEG 1500 (1), NIF/PEG 1500/TA (1), NIF/PEG 6000 (1) et NIF/PEG 6000/TA (1) (Figures 4.19 et 4.20) ont montré la disparition ou la diminution de l'absorbance du pic correspondant au groupe carbonyle (C=O), la diminution de l'absorbance de certaines bandes caractéristiques de l'acide niflumique et apparition d'une bande large entre 3400 à 3500 cm^{-1} pour les formulations à base du PEG 1500. Cela indique la formation de liaison hydrogène intermoléculaire entre le groupe carbonyle de l'acide niflumique et le groupe hydroxyle du polymère, ce qui nous permet de supposer la bonne réussite de la formulation de la dispersion solide par évaporation de solvant. Le recours à d'autres techniques de caractérisation comme la

DRX et la DSC-ATG nous donnera de plus amples d'informations sur ces hypothèses et constatations.

4.2.3.2. Analyse par DRX

Les figures (4.21) et (4.22) ci-dessous illustrent les diagrammes de diffractions des rayons X de l'acide niflumique pur, PEG 6000 ainsi que des formulations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3), NIF/PVP (4) et NIF/PEG 6000/TA (1).

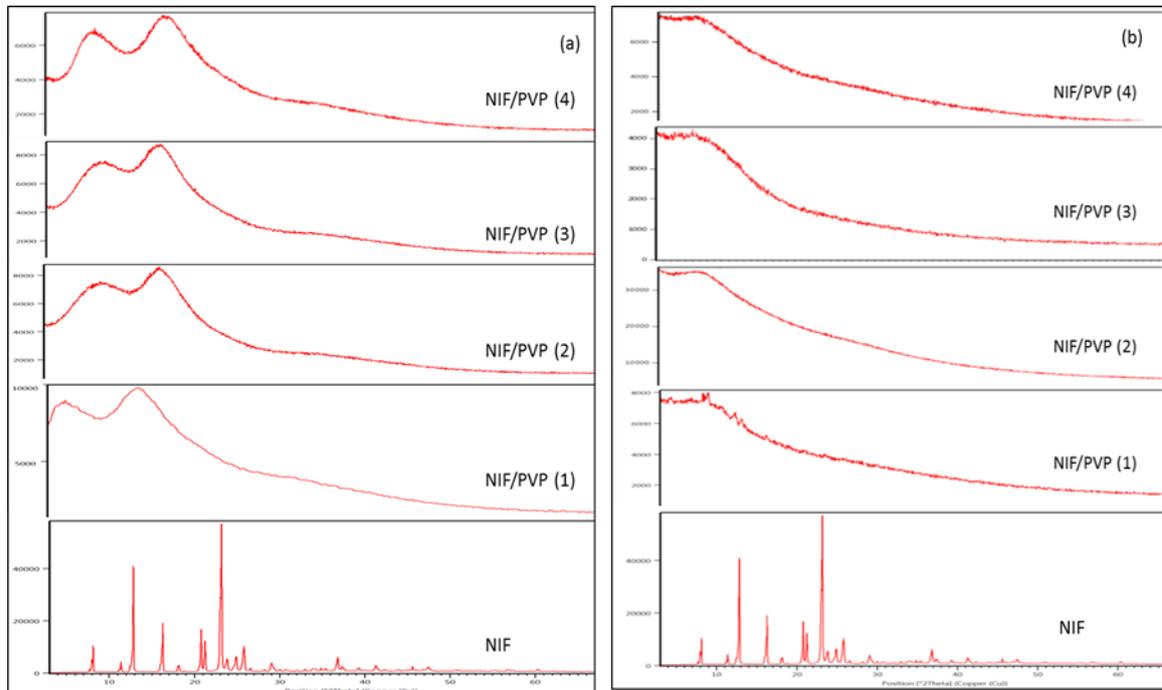


Figure 4.21 : Diffractogrammes DRX, (a) à la fabrication et (b) après 02 ans de fabrication, de l'acide niflumique pur et des dispersions solides NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4)

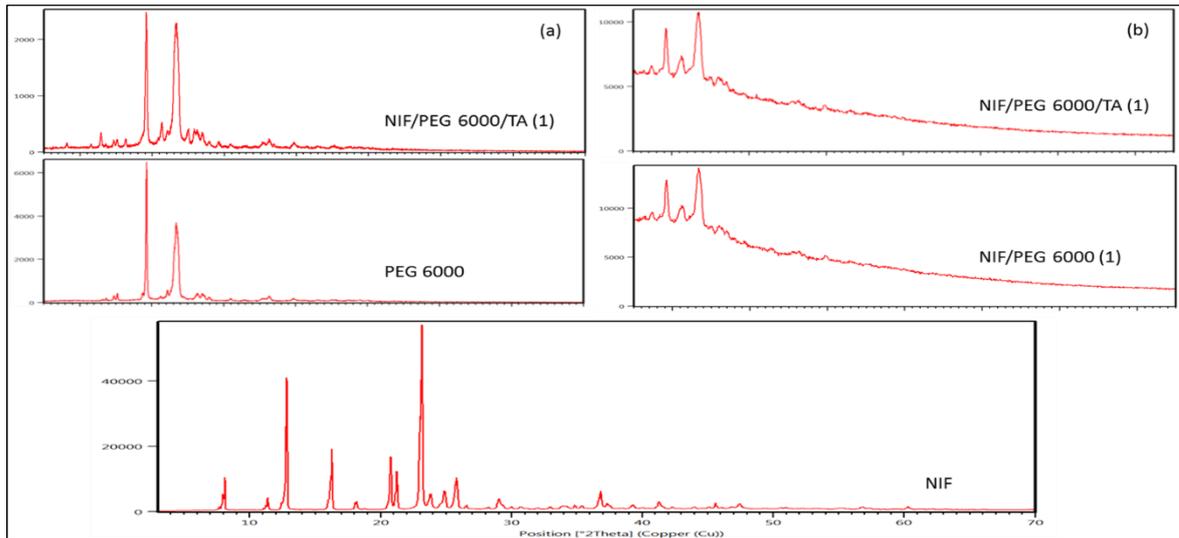


Figure 4.22 : Diffractogrammes DRX, (a) à la fabrication et (b) après 02 ans de la fabrication, de l'acide niflumique pur, PEG 6000 et des dispersions solides NIF/PEG 6000/ TA (1) et NIF/PEG 6000 (1)

Discussion

Le diffractogramme de l'acide niflumique pur (Figure 4.21) correspond à celui présent dans la littérature. Il montre que l'acide niflumique est présent sous forme de poudre cristalline, car, des pics intenses et bien résolus ont été observés, qui sont situés dans la plage 2θ à : $8,12^\circ$; $11,37^\circ$; $12,83^\circ$; $16,29^\circ$; $20,77^\circ$; $21,24^\circ$; $23,15^\circ$; $24,9^\circ$; $25,81^\circ$; $26,56^\circ$; $29,0^\circ$ et $36,95^\circ$, on notera aussi la présence de très petits pics qui correspondent à ceux notés dans les études réalisées par *R. Ambrus et al.* (2011), *N. Radacsi et al.* (2019) et *N. ASSAS et al* (2018). [123-124] [151]

La Figure (4.21 (a)) correspond aux diffractogrammes des formulations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4) ne présentent aucun pic dans le domaine 2θ [3° à 70°], cela indique que l'acide niflumique a changé sa structure d'une forme cristalline à une forme amorphe, ce qui peut être expliqué par la formation de dispersion solide amorphe.

De même, le diffractogramme de la formulation NIF/PEG 6000/TA (1) (Figure 4.22 (a)) ne présente aucun pic à l'exception des deux pics se situant à $19,29^\circ$ et $23,37^\circ$. Ces derniers correspondent à ceux présents dans le diffractogramme du PEG 6000, ce qui indique aussi que la formulation NIF/PEG 6000/TA (1) est une dispersion solide amorphe.

Les différents diffractogrammes obtenus confirment l'interprétation des spectres IR, à savoir : formation d'une liaison hydrogène entre le groupe C=O de l'acide niflumique et le groupe O-H du polymère [151].

Il est important de signaler que, les figures (4.21 (b)) et (4.22 (b)) présentent les diffractogrammes des préparations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4), NIF/PEG 6000/TA (1) et NIF/PEG 6000 (1) obtenus après 24 mois de la fabrication, ce qui indique que les dispersions solides amorphes formulées restent stables et aucun phénomène de recristallisation n'a été observé. Ces résultats sont prometteurs pour la fabrication d'un médicament à la fois soluble et stable.

La conversion de la cristallinité de l'acide niflumique dans les dispersions solides formulées vers une forme amorphe et sa stabilité pendant deux ans, dépendent des conditions opératoires optimisées en utilisant la méthode « évaporation du solvant » et justifie l'amélioration de la solubilité des dispersions solides dans l'eau par rapport à l'acide niflumique pur. Selon la littérature, le maintien de la stabilité de la forme amorphe des dispersions solides est un défi pour les fabricants des médicaments. [156-157]

4.2.3.3. Analyse par DSC-ATG

L'analyse DSC-ATG a été réalisée sur l'acide niflumique pur, PVP et les formulations NIF/PVP (1) et NIF/PVP (4). Les thermogrammes obtenus sont présentés dans les figures ci-dessous.

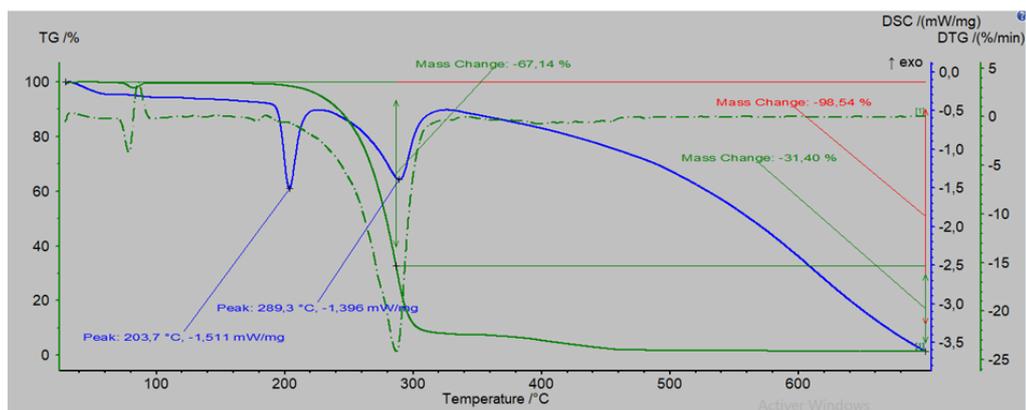


Figure 4.23 : Thermogramme DSC-TG de l'acide niflumique pur

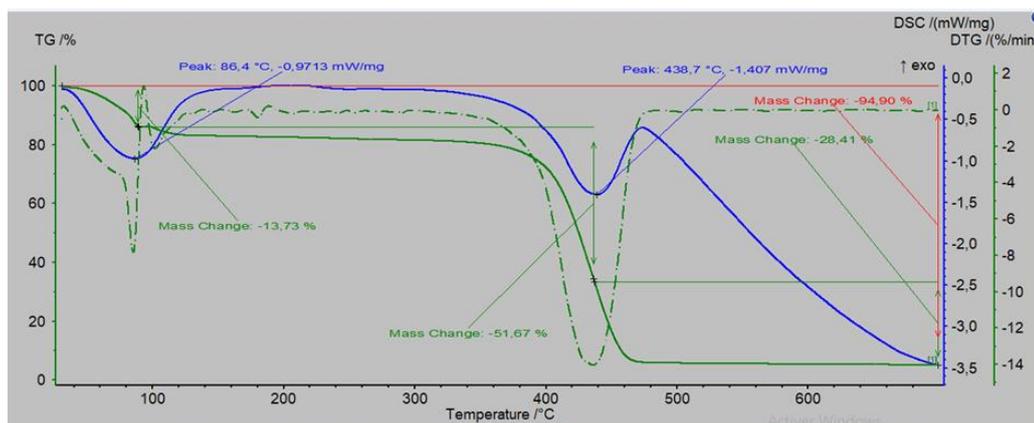


Figure 4.24 : Thermogramme DSC-TG du PVP

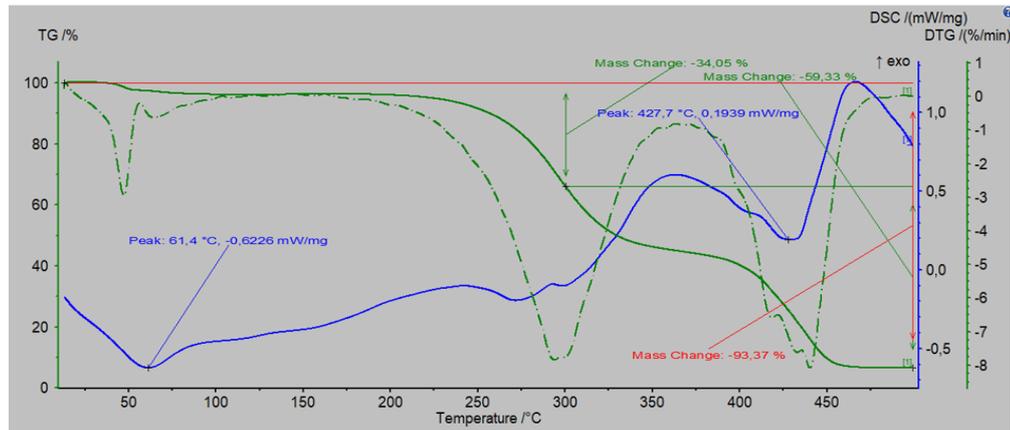


Figure 4.25 : Thermogramme DSC-TG de la formulation NIF/PVP (1)

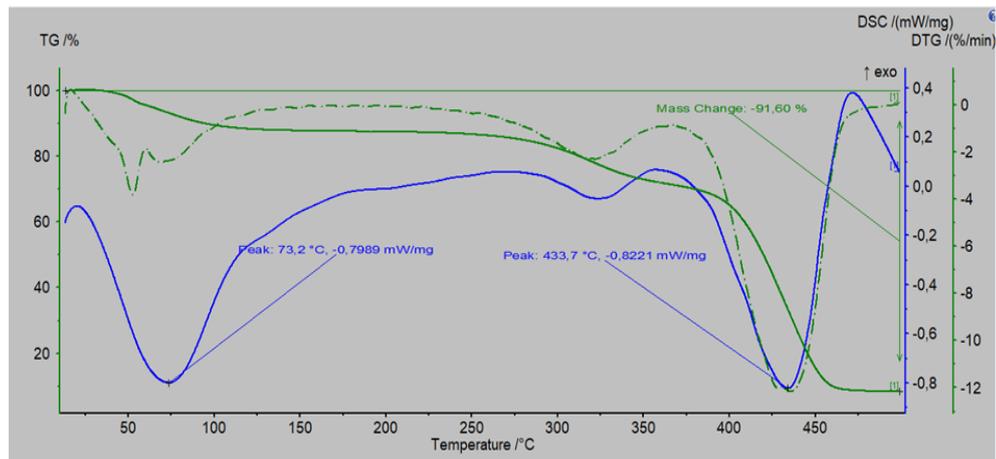


Figure 4.26 : Thermogramme DSC-TG de la formulation NIF/PVP (4)

Discussion

La figure (4.23) présente les thermogrammes de l'acide niflumique pur obtenus par DSC et ATG. La DSC montre la présence d'un pic endothermique (à $T = 203,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta H = 1,511 \text{ mW/mg}$) qui correspond au point de fusion de l'acide niflumique. Par ailleurs, avec l'ATG on ne note pas une perte en masse d'eau à $T = 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$, cela indique que l'acide niflumique est présent à l'état cristallin anhydre, ce qui correspond parfaitement à ce qui est mentionné dans la littérature. [123] [151]

Notant aussi, qu'une forte dégradation de l'acide niflumique avec une perte en masse d'environ 70% a été enregistrée entre $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ et $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Le thermogramme DSC du polymère PVP illustré dans la figure (4.24) présente un pic endothermique large (à $T = 86,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta H = 0,9713 \text{ mW/mg}$) correspondant au point de fusion décrit dans la littérature pour le Povidone amorphe, avec une perte en masse d'eau de 13,73% à environ $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a été enregistrée avec le thermogramme TG, cela indique que le Povidone est hydraté et cela peut résulter de sa nature hydrophile [123] [153]. La dégradation du Povidone est enregistrée à partir de la température $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Les thermogrammes des formulations NIF/PVP (1) et NIF/PVP (4) illustrés dans les figures (4.25 et 4.26) montrent la disparition du pic ($T=203,7\text{ °C}$) correspondant au point de fusion de l'acide niflumique, le déplacement du pic correspondant au point de fusion du polymère à $61,4\text{ °C}$ pour NIF/PVP (1) et à $73,2\text{ °C}$ pour NIF/PVP (4). Cela confirme la formulation de la dispersion solide amorphe entre la substance « Acide niflumique » et le polymère hydrophile « Povidone ». Ce phénomène est rapporté dans les études réalisées par *C. Yu et al.* (2023), *D.T.M. Huynh et al.* (2023) et *S. Qi et al.* (2008). [153-154] [158]

Les thermogrammes TG des formulations NIF/PVP (1) et NIF/PVP (4) enregistrent à environ 100 °C , une perte en masse d'eau de 5 et 10 % respectivement.

Selon les résultats obtenus par les analyses DRX et DSC-ATG et d'après la littérature, on peut supposer la réussite de la formulation des dispersions solides amorphes qui va améliorer la solubilité, la dissolution et donc la biodisponibilité du médicament. [159]

4.2.3.4. Analyse par MEB-EDX

Les images obtenues avec l'acide niflumique pur et la formulation NIF/PVP (4) sont illustrées ci-dessous.

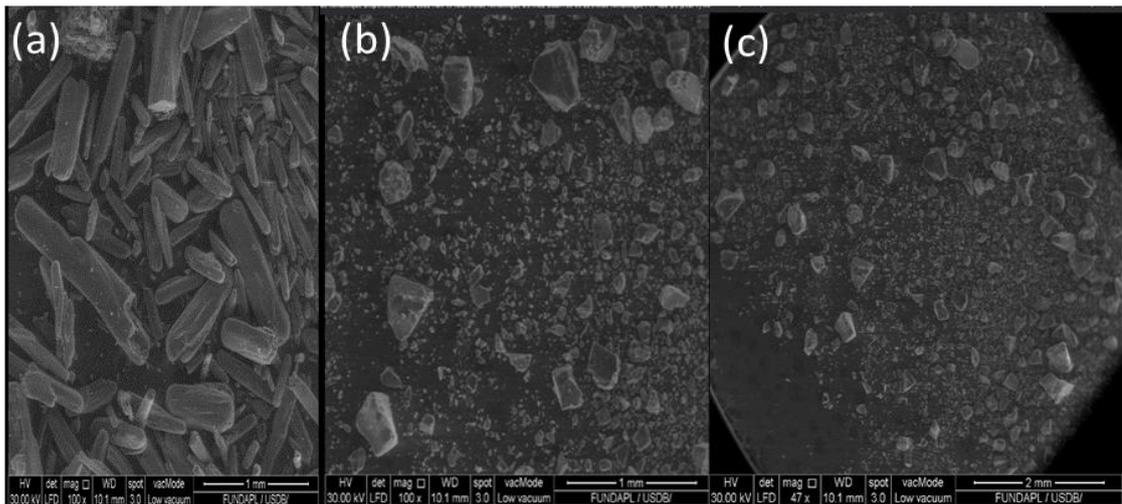


Figure 4.27 : Images MEB, (a) acide niflumique, (b) et (c) Dispersion solide NIF/PVP (4)

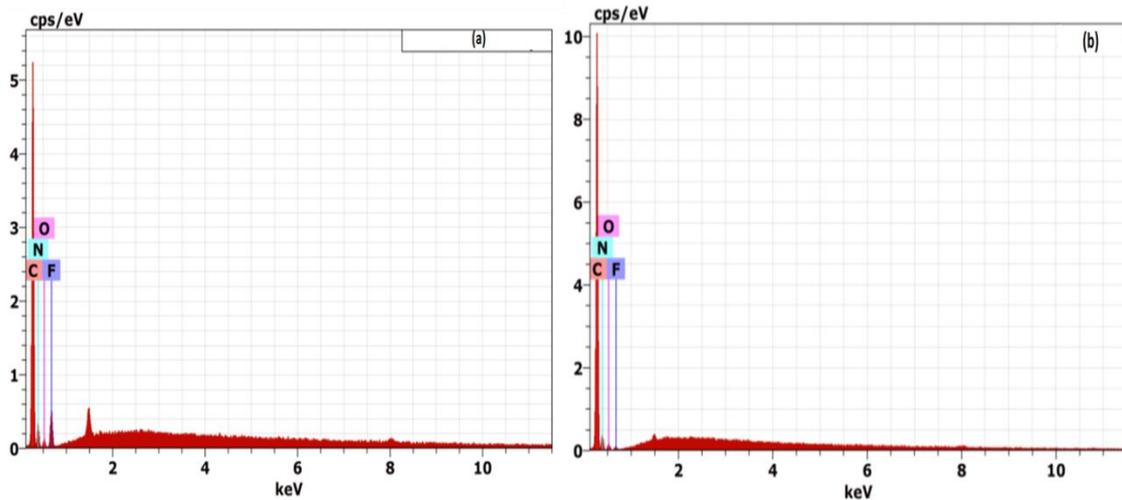


Figure 4.28 : Images EDX, (a) acide niflumique, (b) Dispersion solide NIF/PVP (4)

Discussion

La figure (4.27 (a)) montre la morphologie de l'acide niflumique pur qui est présente sous forme de bâtonnet longs avec des arêtes aiguës, ce qui explique sa faible solubilité. [123][154]

Cependant, les images (4.27 (b) et (c)) de la formulation NIF/PVP (4) montrent que la morphologie de l'acide niflumique a changé, elles présentent une forme de particules irrégulières de taille plus petite que celle de l'acide niflumique pur, ce qui peut être expliqué par la formation de dispersion solide amorphe. L'image de la dispersion solide NIF/PVP (4) obtenue est comparable à celles obtenues dans les études réalisées par *C. Yu et al.* (2023) sur resvératrol, par *D.T.M. Huynh et al.* (2023) sur l'azithromycine et par *N.Radacsi et al.* (2014) sur l'acide niflumique. [153-154] [160]

La figure (4.28) obtenue par l'EDX montre la présence des atomes carbone, fluorure, azote et oxygène. Ces derniers sont présents dans la formule chimique de l'acide niflumique « $C_{13}H_9F_3N_2O_2$ », dont la masse moléculaire est de 282,2 et dans la formule chimique du polymère Povidone « $C_{6n}H_{9n+2}N_nO_n$ ». On ne notera pas la présence des éléments étrangers.

4.2.4. Teneur de l'acide niflumique dans le médicament à base de dispersion solide gélules

Le dosage de l'acide niflumique dans le médicament gélule, à base de dispersions solides formulées, est effectué par HPLC selon le protocole d'analyse décrit dans la partie « 3.4.7».

Etude de spécificité

Le chromatogramme obtenu avec les solutions placebo des formules à base des polymères PVP et PEG ne présentent aucun pic au temps de rétention de l'acide niflumique (t_r d'environ 5,2 min). De ce fait, on peut conclure que la méthode de dosage de l'acide niflumique dans les différents produits formulés est sélective et ne présente aucune interférence avec les excipients utilisés (voir figures 4.29 et 4.30).

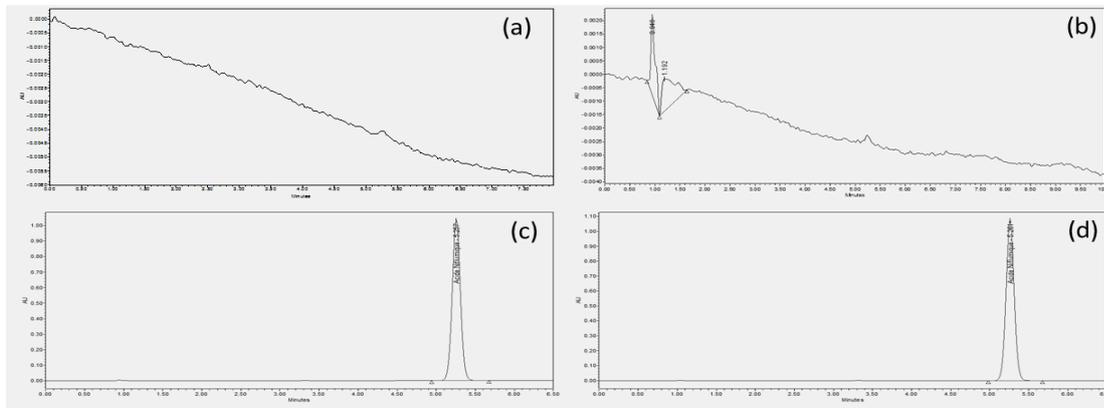


Figure 4.29 : Chromatogrammes HPLC de l'étude de spécificité, (a) phase mobile, (b) placebo, (c) standard acide niflumique, (d) DS NIF/PVP gélules

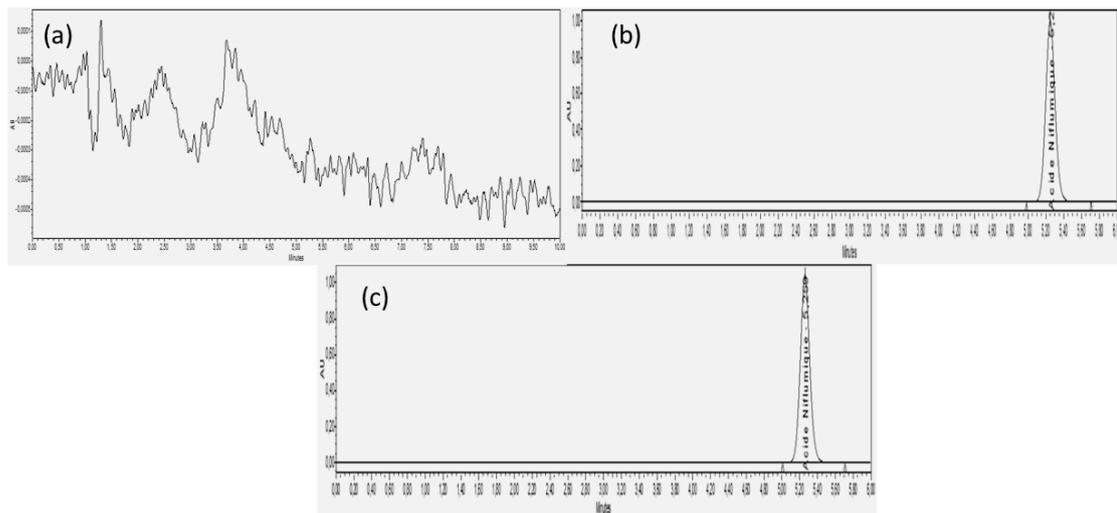


Figure 4.30 : Chromatogrammes HPLC de l'étude de spécificité, (a) placebo, (b) standard acide niflumique, (c), DS NIF/PEG gélules

Résultats du dosage de l'acide niflumique dans les produits formulés

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.9 : Résultats du dosage par HPLC de l'acide niflumique dans le produit gélules à base de dispersions solides

Désignation	Teneur en acide niflumique (%)
Critère d'acceptation : 95,0% à 105,0%	
NIF/PVP (1) gélules	95,0
NIF/PVP (2) gélules	99,1
NIF/PVP (3) gélules	101,3
NIF/PVP (4) gélules	100,1
NIF/PEG 1500 (1) gélules	99,8
NIF/PEG 1500/TA (1) gélules	96,2
NIF/PEG 6000 (1) gélules	98,7
NIF/PEG 6000/TA (1) gélules	101,7

Discussion

La teneur en acide niflumique dans les différentes formulations réalisées se situe entre 95,0% et 105,0 %. De ce fait, on peut les déclarer comme conformes aux spécifications recommandées, et que chaque formule contient la quantité nécessaire de la substance médicamenteuse « acide niflumique ».

4.2.5. Etude comparative des profils de dissolution in vitro des dispersions solides formulées à base de l'acide niflumique, des mélanges physiques et d'un produit commercial

Les profils de dissolution ainsi que le pourcentage de l'acide niflumique dissout à 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 minutes des différentes dispersions solides formulées, des mélanges physiques préparés ainsi que du produit commercial testé sont présentés dans les tableaux et les figures ci-dessous.

Tableau 4.10 : Taux de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (1) gélules et NIF/PVP (2) gélules, à différents temps de prélèvements

Temps (min)	Taux de dissolution (%) (Moy±SD)				
	Produit commercial	MP (NIF-PVP (1))	MP (NIF-PVP (2))	DS (NIF/PVP (1))	DS (NIF/PVP (2))
10	0,5 ± 0,31	1,91 ± 0,10	2,81 ± 0,25	21,35 ± 0,01	2,58 ± 0,01
20	1,8 ± 0,16	2,97 ± 0,10	2,06 ± 0,28	26,08 ± 0,01	35,19 ± 0,05
30	3,0 ± 0,14	4,08 ± 0,11	2,98 ± 0,51	28,34 ± 0,01	38,47 ± 0,05
45	4,5 ± 0,05	4,09 ± 0,07	3,35 ± 0,02	29,81 ± 0,01	38,33 ± 0,05
60	6,6 ± 0,22	4,43 ± 0,17	3,53 ± 0,02	30,16 ± 0,01	38,38 ± 0,02

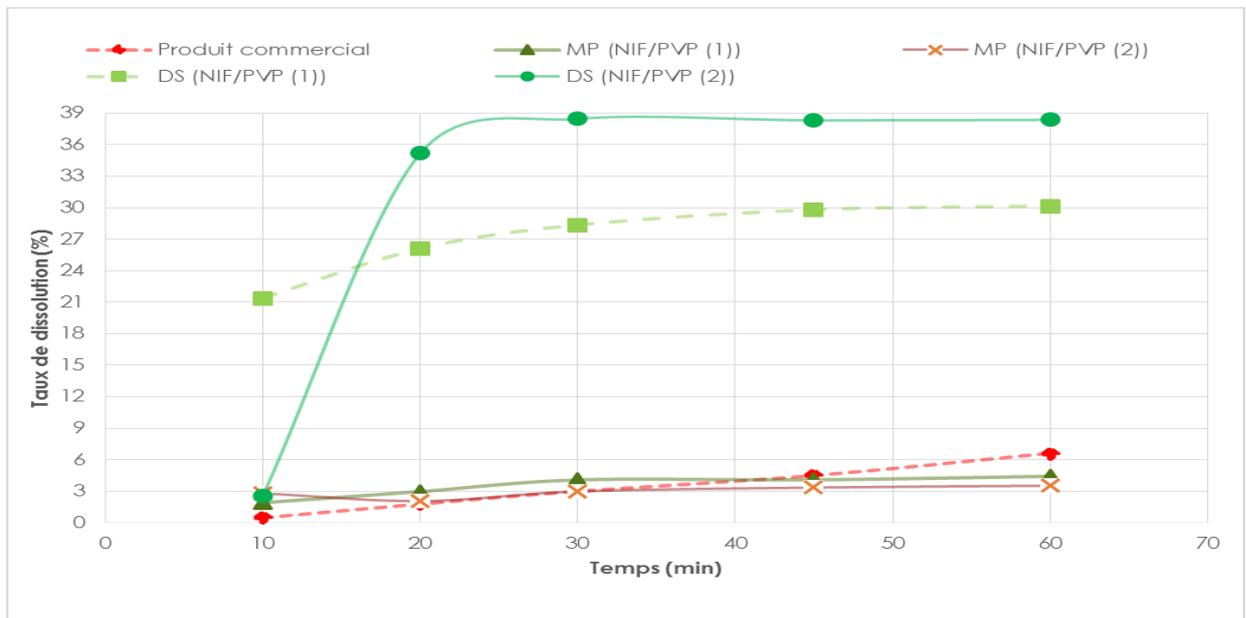


Figure 4.31 : Profils de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (1) et NIF/PVP (2)

Tableau 4.11 : Taux de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (3) gélules et NIF/PVP (4) gélules, à différents temps de prélèvements

Temps (min)	Taux de dissolution (%) (Moy±SD)				
	Produit commercial	MP (NIF-PVP (3))	MP (NIF-PVP (4))	DS (NIF/PVP (3))	DS (NIF/PVP (4))
5	-	3,01 ± 0,23	3,14 ± 0,2	70,97 ± 0,06	86,25 ± 0,01
10	0,5 ± 0,31	3,70 ± 0,30	3,88 ± 0,22	82,33 ± 0,002	91,32 ± 0,01
15	-	3,91 ± 0,29	4,10 ± 0,13	82,05 ± 0,001	100,11 ± 0,01
20	1,8 ± 0,16	4,14 ± 0,15	4,24 ± 0,15	83,15 ± 0,002	101,61 ± 0,01
30	3,0 ± 0,14	4,41 ± 0,13	4,38 ± 0,24	84,78 ± 0,002	-
45	4,5 ± 0,05	4,89 ± 0,10	5,07 ± 0,11	-	-
60	6,6 ± 0,22	5,24 ± 0,10	5,33 ± 0,22	-	-

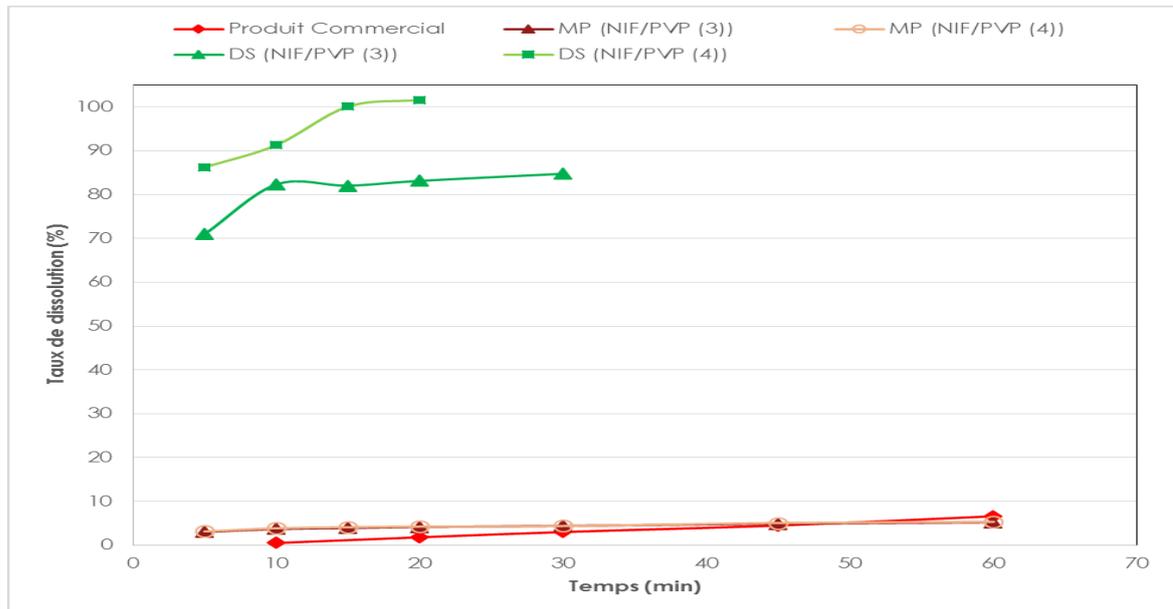


Figure 4.32 : Profils de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules, des mélanges physiques et des dispersions solides NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4)

Tableau 4.12 : Taux de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules et des dispersions solides NIF/PEG 1500 (1) gélules, NIF/PEG 1500/TA (1) gélules, NIF/PEG 6000 (1) gélules et NIF/PEG 6000/TA (1) gélules, à différents temps de prélèvement

Temps (min)	Taux de dissolution (%) (Moy±SD)				
	Produit commercial	DS (NIF/PEG 1500 (1))	DS (NIF/PEG 1500/TA (1))	DS (NIF/PEG 6000 (1))	DS (NIF/PEG 6000/TA (1))
5	-	58,7 ± 0,01	46,4 ± 0,01	34,2 ± 0,01	82,8 ± 0,01
10	0,5 ± 0,31	61,9 ± 0,01	49,9 ± 0,01	37,1 ± 0,01	101,4 ± 0,01
15	-	-	58,4 ± 0,01	-	-
20	1,8 ± 0,16	65,7 ± 0,01	64,3 ± 0,01	42,1 ± 0,01	100,9 ± 0,01
30	3,0 ± 0,14	85,5 ± 0,01	101,7 ± 0,01	49,8 ± 0,01	101,4 ± 0,01
45	4,5 ± 0,05	91,6 ± 0,01	-	59,3 ± 0,01	-
60	6,6 ± 0,22	103,3 ± 0,03	-	59,4 ± 0,01	-

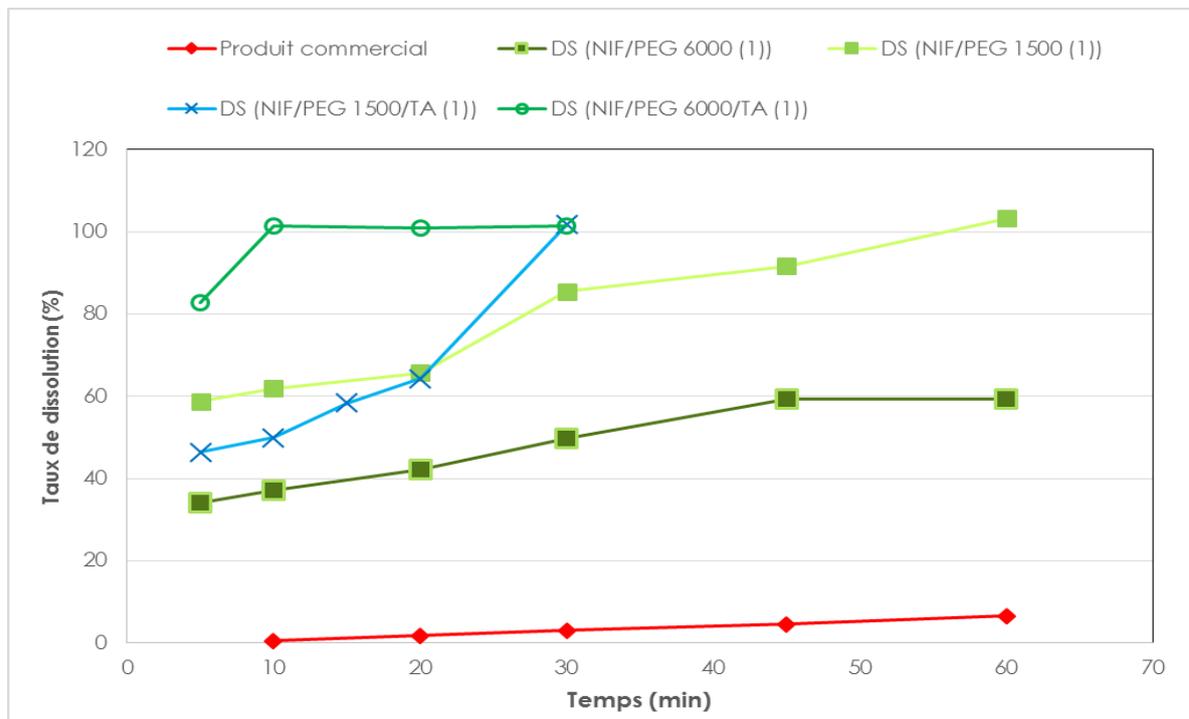


Figure 4.33 : Profils de dissolution du produit commercial d'acide niflumique gélules et des dispersions solides NIF/PEG 1500 (1), NIF/PEG 1500/TA (1), NIF/PEG 6000 (1) et NIF/PEG 6000/TA (1)

Discussion

Les résultats présentés dans les tableaux ci-dessus montrent que le taux de dissolution de l'acide niflumique dans les différentes formulations de dispersions solides est significativement plus élevé que celui obtenu avec les mélanges physiques et le produit commercial.

Les formulations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2) et NIF/PEG 6000 (1) présentent les plus faibles taux de dissolution comparés aux autres formulations (environ 30 %, 40 % et 50 % respectivement après 30 min de dissolution). Cependant, ce taux reste acceptable vu qu'il est amélioré de plus de 4 fois par rapport à celui obtenu avec les mélanges physiques et le produit commercial, qui ont présentés un taux inférieur à 7,0 % après 60 min de dissolution.

Les formulations NIF/PVP (3), NIF/PEG 1500 (1) et NIF/PEG 1500/TA (1) présentent une nette amélioration de la vitesse de dissolution de l'acide niflumique, avec un taux de 71 %, 58,7 % et 49,9 % enregistré après 5 et 10 minutes respectivement et qui a augmentée après 30 minutes à 84,8%, 85,5 % et 101,7 % respectivement. Une dissolution complète du produit NIF/PEG 1500 (1) a été observée après 60 minutes de dissolution. Ces résultats confirment une amélioration de la vitesse de dissolution de plus de 13 fois comparée à celle observée avec le produit commercial.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les formulations NIF/PEG 6000/TA et NIF/PVP (4), dont le taux de dissolution de l'acide niflumique est de 82,8 % et 86,3 % respectivement, enregistré après 5 minutes de dissolution. La dissolution complète de ces deux produits est observée après 10 et 15 minutes, ce qui représente une amélioration de plus de 15 fois par rapport au produit commercial et mélanges physiques.

Il est à noter que la vitesse de dissolution des formulations contenant du « Povidone » est nettement améliorée en augmentant la concentration du polymère, tandis que pour les formulations préparées avec du PEG 1500 et PEG 6000, l'ajout du tensioactif a amélioré significativement la dissolution par rapport à la formulation préparée sans tensioactif.

Il est nécessaire aussi de signaler que ces résultats prometteurs ont été obtenus avec un milieu de dissolution qui ne contient que de l'eau distillée qui est considéré comme un milieu faiblement soluble pour l'acide niflumique.

La figure (4.34) ci-dessous présente le taux de dissolution de l'acide niflumique dans chaque produit.

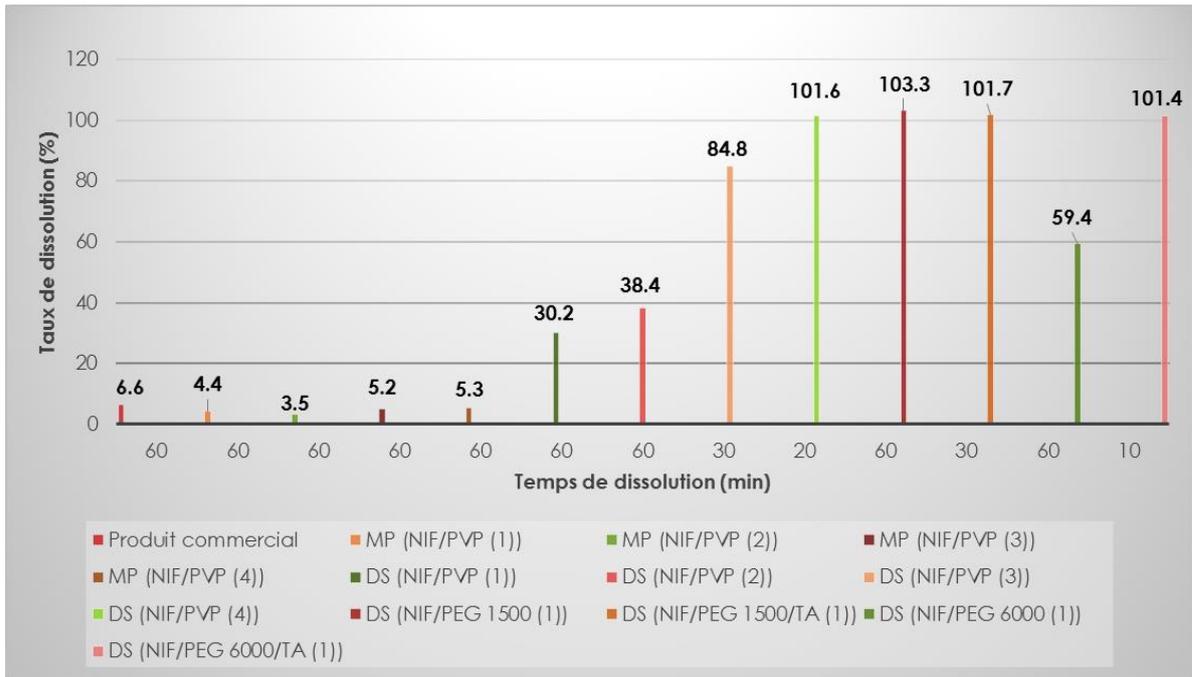


Figure 4.34 : Histogrammes du taux de dissolution de l'acide niflumique dans chaque produit

Les résultats obtenus ont montré que la solubilité et la dissolution de l'acide niflumique ont significativement augmentées pour les huit dispersions solides amorphes formulées par la technique « évaporation du solvant » variant de 4 à 15 fois plus par rapport aux mélanges physiques et le produit commercial testé.

Le changement de la cristallinité de l'acide niflumique vers une forme amorphe ainsi que la réduction de la taille des particules de l'acide niflumique dans les dispersions solides sont les facteurs les plus importants dans l'amélioration de la solubilité aqueuse de cette substance médicamenteuse, ce qui est en concordance avec ce qui est rapporté par *P. Ganesan et al.* (2015) dans leur étude sur l'hydrochlorothiazide. [161]

Selon la littérature, la dispersion solide est l'une des techniques permettant l'augmentation du taux de dissolution du médicament dans le tractus gastro-intestinal ce qui entraîne une absorption accrue du médicament et améliore sa biodisponibilité et donc son efficacité thérapeutique. [162]

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but d'améliorer la solubilité et la dissolution de l'acide niflumique et d'autres substances médicamenteuses appartenant au BCS II.

T. Szunyogh et al. (2012) ont montré que le taux de dissolution de l'acide niflumique dans la dispersion solide NIF/Mannitol/Poloxamer 188, obtenue par évaporation du solvant, était de 80 à 100 % après 5 minutes de dissolution, dans le milieu de pH 1,2 et pH 6,8, tandis que l'acide niflumique pur a présenté un taux de dissolution près de 40% au milieu pH 1,2 et environ 80% dans le milieu pH 6,8 et ce après 120 minutes de dissolution. [163]

Dehghan et al. (2010) ont montré que la solubilité des dispersions solides glipizide/PEG 6000, glipizide/Mannitol préparée par fusion et glipizide/PVP préparée par la méthode d'évaporation du solvant ont augmenté significativement la dissolution de la substance par rapport à la substance pure et les mélanges physiques. [164]

De même, les résultats obtenus par *Halim et al.* (2019) ont montré une amélioration significative de la vitesse de dissolution des dispersions solides formulées par évaporation de solvant de la substance furosemide en utilisant Poloxamer 188 et HPMC comme véhicules. Le taux de dissolution a augmenté de 50 % avec Furosémide pur à 77 % et 99% avec Furosémide/Poloxamer 188 et Furosémide/HPMC respectivement, et ce après 1 h de dissolution. [165]

J.Guo et al (2023) ont utilisé la technologie nanonisation pour étudier l'effet de la taille des particules sur l'amélioration de la solubilité des molécules optoélectronique (peu solubles). Les résultats obtenus ont montré que la solubilité de trois types de molécules nanométriques a augmenté de 12,9 % à 25,7 % après environ 3 min de dissolution par rapport aux matières brutes. [166]

CONCLUSION GENERALE

La croissance de la résistance aux antibiotiques et l'augmentation du pourcentage des substances médicamenteuses faiblement solubles dans l'eau réduisent l'efficacité de certains médicaments.

L'objectif principal de notre travail de recherche est l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de certains médicaments. Pour se faire deux approches ont été adoptées, la première était l'association de l'antibiotique aux nanoparticules de ZnO pour améliorer l'activité antimicrobienne par rapport à l'antibiotique seul. Trois antibiotiques conventionnels ont été testés, à savoir : chlorhydrate de chlortetracycline, spiramycine et azithromycine dihydraté. La deuxième approche est la formulation de dispersions solides amorphes, par la méthode « évaporation du solvant », en vue d'améliorer la solubilité et donc la dissolution et la biodisponibilité du médicament. La molécule choisie pour notre étude est l'acide niflumique qui est un anti-inflammatoire, commercialisé sous plusieurs formes de médicaments, telle que la forme gélule pour voie orale. Cette substance appartient à la classe II du BCS, connue par sa faible solubilité aqueuse qui peut limiter sa dissolution dans le tractus gastro-intestinal et affecter la biodisponibilité et l'effet thérapeutique du médicament.

Pour la première partie de notre étude, la caractérisation des nanoparticules ZnO synthétisés par la méthode sol-gel par différentes techniques d'analyses à savoir : DRX, IR, Raman, DLS, XPS et MEB-EDX a démontré que ZnO NPs présente une structure cristalline hexagonale de type wurtzite et qu'il est présent sous forme de nano-flower sphérique dont la taille moyenne est d'environ 19 nm avec une teneur de 99,93 %. Le contrôle physico-chimique réalisé après 24 mois, dans le cadre de l'étude de stabilité sur le ZnO synthétisé, a démontré que le matériau reste conforme, présentant une pureté de 99,8 % et une taille moyenne des particules d'environ 20 nm. Cela implique que le protocole de synthèse par la méthode « sol-gel » optimisé, est adéquat à produire un ZnO nanométrique très pur.

L'étude toxicologique réalisée, conformément aux exigences de l'OCDE N° 423 et N° 404, a confirmé que l'administration d'une concentration de 40 mg/0,5 ml en ZnO NPs synthétisé aux souris de type NMRI n'a présenté aucune mortalité ou réaction de toxicité et que le gel préparé à base de ce ZnO, appliqué sur une peau scarifiée des lapins de race albinos néo-zélandais, ne présente aucun effet irritant.

L'activité antibactérienne et antifongique a été améliorée en associant l'antibiotique « chlorhydrate de chlortetracycline » au ZnO NPs. En effet, la zone d'inhibition sur les quatre souches bactériennes, à savoir : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* a été augmentée de 26,3, 18, 18,3 et 20,0%, respectivement en présence de ZnO NPs. Notant aussi que, le chlorhydrate de chlortetracycline a présenté une activité fongistatique contre le *Candida albicans*, le *Saccharomyces cerevisiae* et l'*Aspergillus brasiliensis* par contre le ZnO NPs a présenté une activité fongicide. Ceci a été traduit par une nette amélioration de l'activité fongicide en associant le CTC au ZnO NPs.

De même que, la combinaison du spiramycine avec ZnO NPs a augmenté significativement l'activité antibactérienne par rapport à l'antibiotique seul, correspondant à 39,9, 26,2 et 17,4 % contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. La spiramycine seule n'a présenté aucun effet fongicide ou fongistatique contre les champignons *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, tandis que l'association SPM-ZnO NPs a présenté une bonne activité fongicide contre le *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus brasiliensis* et une activité fongistatique contre le *Candida albicans*. Cela implique que l'effet antimicrobien demeure plus intéressant en associant l'antibiotique aux nanoparticules, car les nanoparticules de ZnO peuvent endommager la cellule bactérienne, ce qui facilite la pénétration des antibiotiques. Ces résultats prometteurs peuvent être exploités afin de lutter au problème de résistances bactériennes aux antibiotiques.

Dans la deuxième partie du travail, huit dispersions solides ont été formulées à base de la substance médicamenteuse « Acide niflumique » qui est présente sous une forme cristalline, en utilisant comme véhicules les polymères hydrophiles : povidone, polyéthylène glycol 6000, polyéthylène glycol 1500 et comme technique « évaporation du solvant ».

La caractérisation par différentes techniques d'analyses à savoir : IR, DRX, DSC-ATG et MEB-EDX prouve l'obtention de dispersions solides amorphes. Le dosage par HPLC de l'acide niflumique dans les différentes dispersions obtenues était entre 95,0 % à 102,0 %, ce qui implique que chaque formulation contient la quantité nécessaire en acide niflumique. L'analyse par DRX, après 24 mois de stockage, a démontré la stabilité de la forme amorphe de l'acide niflumique dans les formulations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2), NIF/PVP (3) et NIF/PVP (4), NIF/PEG 6000/TA (1) et NIF/PEG 6000 (1).

L'étude de dissolution *in vitro*, conformément aux exigences internationales, a démontré une nette amélioration de la cinétique de dissolution des huit dispersions solides formulées. La dissolution des formulations NIF/PVP (1), NIF/PVP (2) et NIF/PEG 6000 (1) a augmenté de plus de 4 fois par rapport aux résultats obtenus avec les mélanges physiques et le produit commercial, par contre les formulations NIF/PVP (3), NIF/PEG 1500 (1) et NIF/PEG 1500/TA (1) ont présenté une amélioration du taux de dissolution de plus de 13 fois. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les formulations NIF/PEG 6000/TA et NIF/PVP (4) dont la dissolution complète a été observée après 10 et 15 minutes, ce qui représente une amélioration de plus de 15 fois par rapport au produit commercial et aux mélanges physiques. Notons que le milieu de dissolution utilisé est l'eau distillée qui est considéré comme milieu faiblement soluble pour l'acide niflumique. Cette nette amélioration de la dissolution de l'acide niflumique peut prouver la réussite de la formulation de dispersions solides amorphes. En effet, le changement de la cristallinité de l'acide niflumique vers une forme amorphe, la réduction de la taille des particules de l'acide niflumique dans les dispersions solides ainsi que la libération progressive du PA par dispersion (ce qui évite ou retarde la saturation de la solution), sont les facteurs les plus importants dans l'amélioration de la solubilité aqueuse de cette substance. Cela peut être traduit par l'amélioration de la dissolution du médicament dans le tractus gastro-intestinal et donc par l'amélioration de la biodisponibilité et de l'efficacité thérapeutique du médicament.

Dès résultats obtenus, on peut conclure que la combinaison des antibiotiques conventionnels aux nanoparticules d'oxydes métalliques, tel que le ZnO, peut être explorée comme une nouvelle thérapie combinée afin de pallier au problème de résistance aux antibiotiques. Les dispersions solides amorphes à base de l'acide niflumique se sont avérées prometteuses pour améliorer la solubilité aqueuse des substances médicamenteuses appartenant aux classes II et IV du BCS qui sera traduite par l'amélioration de la biodisponibilité et donc l'effet thérapeutique du médicament administré par voie orale.

Ce modeste travail de recherche vise à contribuer à la proposition des produits pouvant surmonter le problème de résistance aux antibactériens, par l'association des nanoparticules aux antibiotiques conventionnels ou bien de proposer des formulations de médicaments permettant l'augmentation de la dissolution des substances faiblement solubles dans l'eau, en utilisant l'approche « Dispersions solides amorphes », ce qui permettra d'améliorer la biodisponibilité et donc l'efficacité thérapeutique des médicaments. Cependant, ce travail a été réalisé à l'échelle

laboratoire, le passage à la fabrication à grande échelle est nécessaire pour valider les formules proposées et pouvoir bénéficier d'un nouveau produit répond aux préoccupations des patients.

REFERENCES

- [1] Sergey A. Vorobyev, Galina V. Novikova, Anastasia V. Demina, Ivan P. Shidlovskiy, Mikhail N. Volochaev, Synthesis and synergistic effect of antibacterial composites based on concentrated hydrosols of silver nanoparticles combined with cephalosporins antibiotics. *Inorganic Chemistry Communications* 144 (2022) 109862. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109862>.
- [2] Yan Xu, Houyu Li, Xiaojing Li, Wei Liu, What happens when nanoparticles encounter bacterial antibiotic resistance?. *Science of the Total Environment* 876 (2023) 162856. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162856>.
- [3] Shamim Ashkezari, Maryam Sadat Abtahi, Zahra Sattari, Mohammad Tavakkoli Yarak, Fatemeh Hosseini, Raheleh Inanloo Salehi, Elham Afzali, Saeedeh Hajihosseini, Neda Mousavi-Niri, Antibiotic and inorganic nanoparticles co-loaded into carboxymethyl chitosan-functionalized niosome: Synergistic enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 83 (2023) 104386. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104386>.
- [4] Fanqing Meng, Zichen Wang, Bingjie Huo, Jingxue Wang, Dongmei Li, Wenjing Hao, Wei Ma, Jianguang Qi, Peizhe Cui, Zhaoyou Zhu, Yinglong Wang, Efficient degradation of chlortetracycline in water by ultrasound activation of flexible ZnCoO doped PVDF membranes with high β phase. *Applied Surface Science* 619 (2023) 156782. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2023.156782>.
- [5] Peixin Fan, Zhengxin Ma, Arianna J. Partow, Miju Kim, Grace M. Shoemaker, Ruwen Tan, Zhaohui Tong, Corwin D. Nelson, Yeongseon Jang, Kwangcheol C. Jeong, A novel combination therapy for multidrug resistant pathogens using chitosan nanoparticles loaded with β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules* 195 (2022) 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.035>.

- [6] WHO, Ten threats to global health in 2019. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019>, 2019 (accessed 3/22.2020).
- [7] WHO, Un rapport met en avant une progression de la résistance aux antibiotiques dans les infections bactériennes chez l'être humain et la nécessité de disposer de données plus solides. <https://www.who.int/fr/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>. (09 décembre 2022)
- [8] CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. <https://www.cdc.gov/drug-resistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- [9] Guang Yang, Changrong Wang, Yaping Wang, Xiaoqing Liu, Ye Zhang, Ming Xu, Hongzhang Deng, Weiwei Wang, Noncovalent co-assembly of aminoglycoside antibiotics@tannic acid nanoparticles for off-the-shelf treatment of pulmonary and cutaneous infections. *Chemical Engineering Journal* 474 (2023) 145703. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145703>.
- [10] J.J. Aguilera-Correa, M. Gisbert-Garzarán, A. Mediero, M.J. Fernández-Aceñero, D. de Pablo-Velasco, D. Lozano, J. Esteban, M. Vallet-Regí, Antibiotic delivery from bone-targeted mesoporous silica nanoparticles for the treatment of osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia* 154 (2022) 608–625. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.10.039>.
- [11] Fateme Ghorbani, Parviz Kokhaei, Majid Ghorbani, Majid Eslami, Application of different nanoparticles in the diagnosis of colorectal cancer. *Gene Reports* 21 (2020) 100896. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100896>.
- [12] Swati Kumari, Sakshi Raturi, Saurabh Kulshrestha, Kartik Chauhan, Sunil Dhingra, Kovács András, Kyaw Thu, Rohit Khargotra, Tej Singh, A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles. *JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH AND TECHNOLOGY* 2023; 27:1739-1763. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.09.291>.

- [13] Kaiyuan Zheng, Magdiel Ingrid Setyawati, David Tai Leong, Jianping Xie, Antimicrobial silver nanomaterials. *Coordination Chemistry Reviews* 357 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.019>.
- [14] Shakeel Ahmed, Annu, Saiqa Ikrama, Salprima Yudha S., Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 161 (2016) 141–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034>.
- [15] Czarniecki M, Pesapane F, Wood BJ, Choyke PL, Turkbey B. Ultra-small superparamagnetic iron oxide contrast agents for lymph node staging of high-risk prostate cancer. *Transl Androl Urol* 2018;7(Suppl 4):S453-S461. doi: 10.21037/tau.2018.05.15.
- [16] S. Nayak, M.P. Bhat, A.C. Udayashankar, T.R. Lakshmeesha, N. Geetha, S. Jogaiah, Biosynthesis and characterization of *Dillenia indica*-mediated silver nanoparticles and their biological activity. *Appl Organometal Chem.* 2020;e5567. <https://doi.org/10.1002/aoc.5567>.
- [17] N. Konappa, A.C. Udayashankar, N. Dhamodaran, S. Krishnamurthy, S. Jagannath, F. Uzma, C.K. Pradeep, S. De Britto, S. Chowdappa, S. Jogaiah, Ameliorated Antibacterial and Antioxidant Properties by *Trichoderma harzianum* Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles, *Biomolecules* 2021. 11, 535. <https://doi.org/10.3390/biom11040535>.
- [18] Ruddaraju Lakshmi Kalyani, Pammi S.V.N., Pallela P.N. Vijay Kumar, Veerabhadra Swamy Padavala, Kolapalli Venkata Ramana Murthy, Antibiotic potentiation and anti-cancer competence through bio-mediated ZnO nanoparticles. *Materials Science & Engineering C* 103 (2019) 109756. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109756>.
- [19] S. Zhang, L. Lin, X. Huang, Y.-G. Lu, D.-L. Zheng, Y. Feng, Antimicrobial properties of metal nanoparticles and their oxide materials and their applications in oral biology, *Journal of Nanomaterials*. (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/2063265>.
- [20] Vijay Mishra, Kuldeep K. Bansal, Asit Verma, Nishika Yadav, Sourav Thakur, Kalvatala Sudhakar and Jessica M. Rosenholm, Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2018, 10, 191; doi:10.3390.

- [21] Mahmoud Telfah, M-Ali Al-Akhras, Ahmad Telfah, Inshad Jum'h, Riad Ababneh, Yasser Bustanji, Yusuf Al-Hiari, Roland Hergenröder, ¹⁹F- and ¹H-NMR investigations of ofloxacin fluoroquinolone tethered with silver nanoparticles as synergistic antibiotic combinations. *Journal of Molecular Structure* 1292 (2023) 136024. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136024>.
- [22] K.S. Almaary, M.T. Yassin, A.M. Elgorban, F.O. Al-Otibi, A.A. Al-Askar, K. Maniah, Synergistic Antibacterial Proficiency of Green Bioformulated Zinc Oxide Nanoparticles with Potential Fosfomycin Synergism against Nosocomial Bacterial Pathogens, *Microorganisms*. 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030645>.
- [23] WHO. More countries committing to tackling antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news/item/11-11-2021-more-countries-committing-to-tackling-antimicrobial-resistance>. (11 November 2021)
- [24] Chandrasekaran, K., Varaprasad, K., Venugopal, S.K. et al. Synergistic Antibacterial Effect of the Magnesium-Doped ZnO Nanoparticles with Chloramphenicol. *BioNanoSci.* 10, 106–111 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00696-y>.
- [25] Singh BN, Patil PS, Shah H, Ashfaq M, Singh A, Upadhyay GC. Meropenem Incorporated ZnO Nanoflakes as Nano Antibiotics: Efficient Antimicrobial Activity against Metallo β -lactamase Producing Clinical Isolates. *J Pure Appl Microbiol.* 2023;17(1):167-179. doi: 10.22207/JPAM.17.1.06
- [26] Bhande, R.M., Khobragade, C.N., Mane, R.S. et al. Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum β -lactamase producers implicated in urinary tract infections. *J Nanopart Res* 15, 1413 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1413-4>.
- [27] Jermain SV, Brough C, Williams RO 3rd. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery - An update. *Int J Pharm.* 2018 Jan 15;535(1-2):379-392. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.051. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29128423.
- [28] Dong B, Hadinoto K. Carboxymethyl cellulose is a superior polyanion to dextran sulfate in stabilizing and enhancing the solubility of amorphous drug-polyelectrolyte

nanoparticle complex. *Int J Biol Macromol.* 2019 Oct 15;139:500-508. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.023. Epub 2019 Aug 3. PMID: 31386874.

- [29] Kumari L, Choudhari Y, Patel P, Gupta GD, Singh D, Rosenholm JM, Bansal KK, Kurmi BD. Advancement in Solubilization Approaches: A Step towards Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Life (Basel).* 2023 Apr 27;13(5):1099. doi: 10.3390/life13051099. PMID: 37240744; PMCID: PMC10221903.
- [30] Hua S (2020) Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. *Front. Pharmacol.* 11:524. doi: 10.3389/fphar.2020.00524.
- [31] Dahan, A., Beig, A., Lindley, D., & Miller, J. M. (2016). The solubility–permeability interplay and oral drug formulation design: Two heads are better than one. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101, 99–107. doi:10.1016/j.addr.2016.04.018.
- [32] Tambe, A., & Pandita, N. (2018). Enhanced solubility and drug release profile of boswellic acid using a poloxamer-based solid dispersion technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, 172–180. doi:10.1016/j.jddst.2017.11.025.
- [33] Bhalani DV, Nutan B, Kumar A, Singh Chandel AK. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines.* 2022; 10(9):2055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>.
- [34] Md. Abu Rayhan Khan, Md. Ahsan Habib, Jannatul Naime, Md. Mahamudul Hasan Rumon, Muhammad Shamim Al Mamun, A.B.M. Nazmul Islam, Md. Mahiuddin, Kaykobad Md. Rezaul Karim, Mosummath Hosna Ara, A review on synthesis, characterizations, and applications of Schiff base functionalized nanoparticles, *Results in Chemistry* 6 (2023) 101160, <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101160>.
- [35] Singh TA, Das J, Sil PC. Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020 Dec;286:102317. doi: 10.1016/j.cis.2020.102317. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33212389.

- [36] AK Khan, R Rashid, G Murtaza and A Zahra, Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* July 2014; 13 (7): 1169-1177, <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.23>.
- [37] G. Naga Mallikarjun Rao, M.R.K. Vakkalagadda, A review on synthesis, characterization and applications of nanoparticles in polymer nanocomposites. *Materials Today: Proceedings*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.09.135>.
- [38] Smita et al.: Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health* 2012 11(Suppl 1):S13. doi:10.1186/1476-069X-11-S1-S13
- [39] Namita Ashish Singh, Jagriti Narang, Deepa Garg, Vidhi Jain, Devendra Payasi, Shariq Suleman, Ravi Kant Swami, Nanoparticles synthesis via microorganisms and their prospective applications in agriculture. *Plant Nano Biology* 5 (2023) 100047, <https://doi.org/10.1016/j.plana.2023.100047>.
- [40] Ghosh S, Ahmad R, Banerjee K, AlAjmi MF and Rahman S (2021), Mechanistic Aspects of Microbe-Mediated Nanoparticle Synthesis. *Front. Microbiol.* 12:638068. doi: 10.3389/fmicb.2021.638068.
- [41] Md. Abu Rayhan Khan, Muhammad Shamim Al Mamun, Mosumath Hosna Ara, Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *Microchemical Journal* 171 (2021) 106840. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106840>
- [42] Dheeraj Kumar Singh Sanjay Singh Prabhakar Singh, *Nanomaterials Advances and Applications*. 2023. ISBN 978-981-19-7962-0. ISBN 978-981-19-7963-7 (eBook). <https://doi.org/10.1007/978-981-19-7963-7>.
- [43] Jeyaraj M, Gurunathan S, Qasim M, Kang M-H, Kim J-H. A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2019; 9(12):1719. <https://doi.org/10.3390/nano9121719>
- [44] S Anu Mary Ealia and M P Saravanakumar, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. 2017 IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 263 032019. DOI 10.1088/1757-899X/263/3/032019.

- [45] Spirescu, V.A., Chircov, C.; Grumezescu, A.M.; Vasile, B.S. ; Andronesu, E. Inorganic Nanoparticles and Composite Films for Antimicrobial Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4595. <https://doi.org/10.3390/ijms22094595>.
- [46] Kang Pan and Qixin Zhong, Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Annual Review of Food Science and Technology* 2016 7:1, 245-266. doi : 10.1146/annurev-food-041715-033215.
- [47] Claude Ostiguy Brigitte Roberge Catherine Woods Brigitte Soucy, Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. RAPPORT R-646, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, mai 2010. ISBN : 978-2-89631-457-7 (PDF) ISSN : 0820-8395.
- [48] Ibrahim Khan, Khalid Saeed, Idrees Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* (2019) 12, 908–931. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- [49] Clifford Y. Tai, Chia-Te Tai, Ming-Hui Chang, and Hwai-Shen Liu, Synthesis of Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoparticles Using a Spinning Disk Reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007, 46, 5536-5541. 10.1021/ie060869b.
- [50] Mohammed A. Fayad, Hayder A. Dhahad, Effects of adding aluminum oxide nanoparticles to butanol-diesel blends on performance, particulate matter, and emission characteristics of diesel engine. *Fuel* 286 (2021) 119363. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119363>
- [51] N.A. Bulychev, Synthesis of gaseous hydrogen and nanoparticles of silicon and silicon oxide by pyrolysis of tetraethoxysilane in an electric discharge under the action of ultrasound. *International journal of hydrogen energy* 47 (2022) 35581e35587. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.08.163>.
- [52] Eneyew Tilahun Bekele, Bedasa Abdisa Gonfa, and Fedlu Kedir Sabir, Use of Different Natural Products to Control Growth of Titanium Oxide Nanoparticles in Green Solvent Emulsion, Characterization, and Their Photocatalytic Application. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Volume 2021, Article ID 6626313, 17 pages. <https://doi.org/10.1155/2021/6626313>.

- [53] Anesu Nyabadza, Eanna McCarthy, Mayur Makhesana, Saeid Heidarinasab, Anouk Plouze, Mercedes Vazquez, Dermot Brabazon, A review of physical, chemical and biological synthesis methods of bimetallic nanoparticles and applications in sensing, water treatment, biomedicine, catalysis and hydrogen storage. *Advances in Colloid and Interface Science* 321 (2023) 103010. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103010>.
- [54] Atiđa Selmani, Davor Kovačević, Klemen Bohinc, Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. *Advances in Colloid and Interface Science* 303 (2022) 102640. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>.
- [55] Muhammad Sajid, Justyna Płotka-Wasyłka, Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchemical Journal* 154 (2020) 104623. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>.
- [56] Ansam Wadia Alshameri, Mohammad Owais, Antibacterial and cytotoxic potency of the plant-mediated synthesis of metallic nanoparticles Ag NPs and ZnO NPs: A review. *OpenNano* 8 (2022) 100077. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100077>
- [57] Nadeem Baig, Irshad Kammakakam and Wail Falath, Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater. Adv.*, 2021, 2, 1821. DOI: 10.1039/d0ma00807a.
- [58] Vincenzo Amendola and Moreno Meneghetti, Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 3805–3821. DOI: 10.1039/b900654k.
- [59] Alongkorn Pimpin and Werayut Srituravanich, Review on Micro- and Nanolithography Techniques and their Applications. *ENGINEERING JOURNAL* Volume 16 Issue 1. DOI:10.4186/ej.2012.16.1.37.
- [60] S. Ramesh, Sol-Gel Synthesis and Characterization of $\text{Ag}_{3(2+x)}\text{Al}_x\text{Ti}_{4-x}\text{O}_{11+\delta}$ ($0.0 \leq x \leq 1.0$) Nanoparticles. *Journal of Nanoscience*, Volume 2013, Article ID 929321, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/929321>.
- [61] L. Klein et al. (eds.), *Handbook of Sol-Gel Science and Technology*. Springer Nature 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32101-1_87.

- [62] Longman Li and Xiaobo Yang. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2018, Article ID 7580707, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/7580707>.
- [63] Sergey V. Gudkov, Dmitriy E. Burmistrov, Dmitriy A. Serov, Maxim B. Rebezov, Anastasia A. Semenova and Andrey B. Lisitsyn, A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. *Front. Phys.* 9:641481. (2021). doi: 10.3389/fphy.2021.641481.
- [64] Bruno Baudin. Déficits nutritionnels en oligoéléments. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* • N° 533 • JUIN 2021.
- [65] Fathi Habashi. Zinc-the metal from the East. *Metall* 94(6):71-76.
- [66] H. Rai, Prashant and N. Kondal, A review on defect related emissions in undoped ZnO nanostructures, *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.343>.
- [67] Bruna Lallo da Silva, Marina Paiva Abuçafy, Eloisa Berbel Manaia, João Augusto Oshiro Junior, Bruna Galdorfini Chiari-Andréo, Rosemeire CL R Pietro & Leila Aparecida Chiavacci (2019) Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview, *International Journal of Nanomedicine*, , 9395-9410, DOI: 10.2147/IJN.S216204.
- [68] H. Ahmoum, M. Boughrara, M.S. Su'ait, S. Choprac, M. Kerouad, Impact of position and concentration of sodium on the photovoltaic properties of zinc oxide solar cells. *Physica B: Condensed Matter* 560 (2019) 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2019.02.011>.
- [69] Ü. Özgür, Ya. I. Alivov, C. Liu, A. Teke, M. A. Reshchikov, S. Doğan, V. Avrutin, S.-J. Cho, and H. Morkoç, A comprehensive review of ZnO materials and devices. *Journal of Applied Physics* 98, 041301 (2005); doi: 10.1063/1.1992666.
- [70] Hadis Morkoç, Ümit Özgür, *Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Device Technology*. (2009). ISBN: 9783527408139. DOI:10.1002/9783527623945.
- [71] Marina Bandeira, Marcelo Giovanela, Mariana Roesch-Ely, Declan M. Devine, Janaina da Silva Crespo, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis

- methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 15 (2020) 100223. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>.
- [72] Murugeswaran Dayana Senthamarai, Balasubramanian Malaikozhundan, Synergistic action of zinc oxide nanoparticle using the unripe fruit extract of *Aegle marmelos* (L.) - Antibacterial, antibiofilm, radical scavenging and ecotoxicological effects. *Materials Today Communications* 30 (2022) 103228. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103228>.
- [73] Eduarda Roberta Bordin, Wanessa Algarte Ramsdorf, Luana Maria Lotti Domingos, Luís Phelipe de Souza Miranda, Ney Pereira Mattoso Filho, Marta Margarete Cestari, Ecotoxicological effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on aquatic organisms: Current research and emerging trends. *Journal of Environmental Management* 349 (2024) 119396. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119396>.
- [74] Antonio Vassallo, Maria Francesca Silletti, Immacolata Faraone, Luigi Milella, "Nanoparticulate Antibiotic Systems as Antibacterial Agents and Antibiotic Delivery Platforms to Fight Infections", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2020, Article ID 6905631, 31 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6905631>.
- [75] Christaki, E., Marcou, M. & Tofarides, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* **88**, 26–40 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>.
- [76] Imroi El-Habib, Anne Roynette, Houda Morakchi-Goudjil, Alex Lemarchand, Christine Mielcarek, Rabah Azouani and Mamadou Traore, Synthesis by soft chemistry of size-controlled zinc oxide (ZnO) nanocrystals for antimicrobial applications. *MATEC Web of Conferences* **379**, 06003 (2023). <https://doi.org/10.1051/mateconf/202337906003>.
- [77] Infections nosocomiales, Ces microbes qu'on « attrape » à l'hôpital, Inserm (2017). <https://www.inserm.fr/dossier/infections-nosocomiales/>
- [78] Sartaj Ahmad Mir, Vipin Shrotriya, Tahani I. Al-Muhimeed , Md. Amzad Hossain, M Burhanuz Zaman, Metal and metal oxide nanostructures applied as alternatives of antibiotics. *Inorganic Chemistry Communications* 150 (2023) 110503. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110503>

- [79] G. Chuto, P. Chaumet-Riffaud, Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire* 34 (2010) 370–376. doi:10.1016/j.mednuc.2010.03.003.
- [80] Myocet liposomal (doxorubicine). European Medicines Agency. www.ema.europa.eu. EMA/631375/2019. EMEA/H/C/000297
- [81] Caelyx pegylated liposomal (doxorubicin). European Medicines Agency. www.ema.europa.eu. EMA/635791/2019. EMEA/H/C/000089
- [82] Hortobagyi GN, Ueno NT, Xia W, Zhang S, Wolf JK, Putnam JB, Weiden PL, Willey JS, Carey M, Branham DL, Payne JY, Tucker SD, Bartholomeusz C, Kilbourn RG, De Jager RL, Sneige N, Katz RL, Anklesaria P, Ibrahim NK, Murray JL, Theriault RL, Valero V, Gershenson DM, Bevers MW, Huang L, Lopez-Berestein G, Hung MC. Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J Clin Oncol*. 2001 Jul 15;19(14):3422-33. doi: 10.1200/JCO.2001.19.14.3422. PMID: 11454891.
- [83] Nurit Beyth, Yael Houry-Haddad, Avi Domb, Wahid Khan, and Ronen Hazan, Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2015, Article ID 246012, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/246012>
- [84] Girma A. Alternative mechanisms of action of metallic nanoparticles to mitigate the global spread of antibiotic-resistant bacteria. *Cell Surf*. 2023 Oct 20;10:100112. doi: 10.1016/j.tcs.2023.100112. PMID: 37920217; PMCID: PMC10618811.
- [85] Crane JK. Metal Nanoparticles in Infection and Immunity. *Immunol Invest*. 2020 Oct;49(7):794-807. doi: 10.1080/08820139.2020.1776724. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32524902; PMCID: PMC7554245.
- [86] Ansari, M.A., Khan, H.M., Khan, A.A. et al. Characterization of clinical strains of MSSA, MRSA and MRSE isolated from skin and soft tissue infections and the antibacterial activity of ZnO nanoparticles. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 1605–1613 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0966-1>

- [87] Pati R, Mehta RK, Mohanty S, Padhi A, Sengupta M, Vaseeharan B, Goswami C, Sonawane A. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine*. 2014 Aug;10(6):1195-208. doi: 10.1016/j.nano.2014.02.012. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24607937.
- [88] Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U.H. *et al.* Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *J Animal Sci Biotechnol* 10, 57 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0368-z>.
- [89] Singh, A., Singh, N.B., Afzal, S. *et al.* Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *J Mater Sci* **53**, 185–201 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1544-1>.
- [90] Skwarczynski, M.; Bashiri, S.; Yuan, Y.; Ziora, Z.M.; Nabil, O.; Masuda, K.; Khongkow, M.; Rimsueb, N.; Cabral, H.; Ruktanonchai, U.; et al. Antimicrobial Activity Enhancers: Towards Smart Delivery of Antimicrobial Agents. *Antibiotics* 2022, 11, 412. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030412>
- [91] Neha Sharma, Savita Jandaik and Sanjeev Kumar, Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2016) 88(3 Suppl.): 1689-1698. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150713>.
- [92] Usama H Abo-Shama, Hanem El-Gendy, Walid S Mousa, Ragaa A Hamouda, Wesam E Yousuf, Helal F Hetta & Eman E Abdeen (2020) Synergistic and Antagonistic Effects of Metal Nanoparticles in Combination with Antibiotics Against Some Reference Strains of Pathogenic Microorganisms, *Infection and Drug Resistance*, 351-362, DOI: 10.2147/IDR.S234425.
- [93] Aliaa Abdelghafar, Nehal Yousef and Momen Askoura, Zinc oxide nanoparticles reduce biofilm formation, synergize antibiotics action and attenuate *Staphylococcus aureus* virulence in host; an important message to clinicians. *BMC Microbiology* (2022) 22:24. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02658-z>.

- [94] Sharif M, Tunio SA, Bano S. Synergistic effects of Zinc oxide nanoparticles and conventional antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (2021). *Adv. Life Sci.* 8(2): 167-171.
- [95] Sarah F. Al-Taie, Dhafar N. Al-Ugaili, Khawla A. Kasar, Laith A. Yaaqoob, Antibacterial effects of Ceftriaxone/Zinc Oxide Nanoparticles Combination Against Ceftriaxone resistant *Escherichia coli* isolated from Urinary Tract Infections. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, January-March 2022, Vol. 16, No. 1.
- [96] Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, Hasan H, Mohamad D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nanomicro Lett.* 2015;7(3):219-242. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x. Epub 2015 Apr 19. PMID: 30464967; PMCID: PMC6223899.
- [97] Jin SE, Jin HE. Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nano/Microparticles and Their Combinations against Pathogenic Microorganisms for Biomedical Applications: From Physicochemical Characteristics to Pharmacological Aspects. *Nanomaterials* (Basel). 2021 Jan 20;11(2):263. doi: 10.3390/nano11020263. PMID: 33498491; PMCID: PMC7922830.
- [98] Shah, N., Sandhu, H., Choi, D. S., Chokshi, H., & Malick, A. W. (2014). *Amorphous solid dispersions. Theory and Practice*; Springer: Berlin, Germany.
- [99] BHUJBAL, Sonal V., MITRA, Biplob, JAIN, Uday, et al. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, vol. 11, no 8, p. 2505-2536.
- [100] Robert O. Williams III, Daniel A. Davis Jr., Dave A. Miller. *Formulating Poorly Water Soluble Drugs* (AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series) 3rd ed. New York : Springer, 2022.
- [101] SABERI, Arezoo, KOUHJANI, Maryam, YARI, Davood, et al. Development, recent advances, and updates in binary, ternary co-amorphous systems, and ternary solid dispersions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023, p. 104746.

- [102] KHATER, AL-Japairai, ALMURISI, Samah Hamed, MAHMOOD, Syed, et al. Strategies to improve the stability of amorphous solid dispersions in view of the hot melt extrusion (HME) method. *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, p. 123536.
- [103] KUMARI, Beena et BISHNOI, Harish Kumar. Solid dispersion: its types and mechanism of enhancement of solubility by solid dispersion. *Journal of pharma Research*, 2019, vol. 8, no 3, p. 65-71. DOI: 10.5281/zenodo.2594669.
- [104] Avinash Ramrao Tekade, Jyoti Narayan Yadav, A Review on Solid Dispersion and Carriers Used Therein for Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drugs. *Adv Pharm Bull*, 2020, 10(3), 359-369. doi: 10.34172/apb.2020.044
- [105] KAWAKAMI, Kohsaku. *Recent Progress in Solid Dispersion Technology*. MDPI-Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019.
- [106] Ruba Malkawi, Walla I. Malkawi, Yahia Al-Mahmoud, Jawad Tawalbeh, *Current Trends on Solid Dispersions: Past, Present, and Future*, *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, vol. 2022, Article ID 5916013, 17 pages, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5916013>
- [107] G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, and J. R. Crison, “A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability,” *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 3, pp. 413–420, 1995.
- [108] Dengale SJ, Grohganz H, Rades T, Löbmann K. Recent advances in co-amorphous drug formulations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 May 1;100:116-25. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.009. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26805787.
- [109] KARAGIANNI, Anna, KACHRIMANIS, Kyriakos, et NIKOLAKAKIS, Ioannis. Co-amorphous solid dispersions for solubility and absorption improvement of drugs: Composition, preparation, characterization and formulations for oral delivery. *Pharmaceutics*, 2018, vol. 10, no 3, p. 98.
- [110] YU, Deng-Guang, LI, Jiao-Jiao, WILLIAMS, Gareth R., et al. Electrospun amorphous solid dispersions of poorly water-soluble drugs: A review. *Journal of controlled release*, 2018, vol. 292, p. 91-110.

- [111] Tambe S, Jain D, Meruva SK, Rongala G, Juluri A, Nihalani G, Mamidi HK, Nukala PK, Bolla PK. Recent Advances in Amorphous Solid Dispersions: Preformulation, Formulation Strategies, Technological Advancements and Characterization. *Pharmaceutics*. 2022 Oct 16;14(10):2203. doi: 10.3390/pharmaceutics14102203. PMID: 36297638; PMCID: PMC9609913.
- [112] MA, Xiangyu et WILLIAMS III, Robert O. Characterization of amorphous solid dispersions: An update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019, vol. 50, p. 113-124. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.017>.
- [113] Bhusnure, O.G., Kazi, P.A., Gholve, S.B., Ansari, M.M.A.W. and Kazi, S.N. (2014) Solid Dispersion: An Ever Green Method for Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drugs. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 4, 906-918.
- [114] Th. Abhishek Singh, Anirudh Sharma, Neeraj Tejwan, Noyel Ghosh, Joydeep Das, Parames C. Sil, A state of the art review on the synthesis, antibacterial, antioxidant, antidiabetic and tissue regeneration activities of zinc oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science* 295 (2021) 102495. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102495>.
- [115] LU, Yushen, DONG, Wenkai, DING, Junjie, *et al.* Hydroxyapatite nanomaterials: synthesis, properties, and functional applications. In : *Nanomaterials from clay minerals*. Elsevier, 2019. p. 485-536.
- [116] Sridev, D., Rajendran, K.V. Synthesis and optical characteristics of ZnO nanocrystals. *Bull Mater Sci* **32**, 165–168 (2009). <https://doi.org/10.1007/s12034-009-0025-9>
- [117] Pharmacopée Européenne 10ème édition. Zinc (Oxyde de). P. 4508. (2020)
- [118] Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE 423. « Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë ». P. 1-14. (Décembre 2001)
- [119] Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE 404. « Effet irritant/corrosif aigu sur la peau ». P.2-4. (Juillet 2015)

- [120] VIDAL. NIFLURIL 250 mg gél. <https://www.vidal.fr/medicaments/nifluril-250-mg-gel-11792.html>.
- [121] NIFLURIL 250 mg, gélule - Notice patient. BASE DE DONNÉES PUBLIQUE DES MEDICAMENTS.<https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?typedoc=N&specid=66085510>.
- [122] Mehul R. Kateshiya, Dharaben J. Joshi, Mungara Anil Kumar, Naved I. Malek, Suresh Kumar Kailas, Fluorescence “turn-off–on” approach for the detection of niflumic acid and ammonium persulfate using 2,3-dialdehyde starch-cysteine molybdenum nanoclusters as a nanosensor. *Journal of Molecular Liquids* 365 (2022) 120139. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120139>
- [123] R. Ambrus, Z. Aigner, L. Catenacci, G. Bettinetti, P. Szabo´-Révész, M. Sorrenti, Physico-chemical characterization and dissolution properties of niflumic acid-cyclodextrin-PVP ternary systems. *J Therm Anal Calorim* (2011) 104:291–297. DOI 10.1007/s10973-010-1069-1.
- [124] Norbert Radacsi, Konstantinos P. Giapis, George Ovari, Piroska Szabó-Révész, Rita Ambrus, Electrospun nanofiber-based niflumic acid capsules with superior physicochemical properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 166 (2019) 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.037>.
- [125] Kifayat Ullah Khan, Muhammad Usman Minhas, Syed Faisal Badshah, Muhammad Suhail, Aousaf Ahmad, Shakeel Ijaz, Overview of nanoparticulate strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. *Life Sciences* 291 (2022) 120301. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120301>.
- [126] P. Nagajyothi, S.J. Cha, I.J. Yang, T. Sreekanth, K.J. Kim, H.M. Shin, Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 146 (2015) 10–17.
- [127] M.O. Kyene, E.K. Droepenu, F. Ayertey, G.N. Yeboah, M.-A. Archer, D. Kumadoh, S.O. Mintah, P.K. Gordon, A.A. Appiah, Synthesis and characterization of ZnO nanomaterial from *Cassia sieberiana* and determination of its anti-inflammatory, antioxidant and

antimicrobial activities, *Scientific African*. 19 (2023) e01452.
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01452>.

- [128] VELSANKAR, K., VENKATESAN, A., MUTHUMARI, P., et al. Green inspired synthesis of ZnO nanoparticles and its characterizations with biofilm, antioxidant, anti-inflammatory, and anti-diabetic activities. *Journal of Molecular Structure*, 2022, vol. 1255, p. 132420. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132420>.
- [129] L. Kiran Babu, E. Sarala, O. Audisheshaiah, K. Madhusudana Reddy , Y. V. Rami Reddy, Synthesis, Characterization of Nanocrystalline ZnO Via Two Different Chemical methods and its Antibacterial Activity., *Surfaces and Interfaces* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.surPn.2019.05.002>
- [130] Tariq Jan, Javed Iqbal, Muhammad Ismail, Noor Badshah, Qaisar Mansoor, Aqsa Arshad, Qazi M. Ahkam, Synthesis, physical properties and antibacterial activity of metal oxides nanostructures. *Materials Science in Semiconductor Processing* 21(2014)154-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mssp.2014.01.006>.
- [131] M. Rocha, F.P. Araujo, S. Castro-Lopes, I.S. de Lima, E.C. Silva-Filho, J.A. Osajima, C.S. Oliveira, B.C. Viana, L.C. Almeida, Y. Guerra, R. Peña-Garcia, Synthesis of Fe–Pr co-doped ZnO nanoparticles: Structural, optical and antibacterial properties, *Ceramics International*. 49 (2023) 2282–2295. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.196>.
- [132] A.S. Sá, R.P. Feitosa, L. Honório, R. Peña-Garcia, L.C. Almeida, J.S. Dias, L.P. Brazuna, T.G. Tabuti, E.R. Triboni, J.A. Osajima, A brief photocatalytic study of zno containing cerium towards ibuprofen degradation, *Materials*. 14 (2021) 5891.
- [133] N. Ashkenov, B. Mbenkum, C. Bundesmann, V. Riede, M. Lorenz, D. Spemann, E. Kaidashev, A. Kasic, M. Schubert, M. Grundmann, Infrared dielectric functions and phonon modes of high-quality ZnO films, *Journal of Applied Physics*. 93 (2003) 126–133.
- [134] A. Manohar, J. Park, D.D. Geleta, C. Krishnamoorthi, R. Thangam, H. Kang, J. Lee, Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles for photocatalysis, antibacterial and cytotoxicity in kidney cancer (A498) cell lines, *Journal of Alloys and Compounds*. 874 (2021) 159868. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.159868>.

- [135] N. Moghni, H. Boutoumi, H. Khalaf, N. Makaoui, G. Colón, Enhanced photocatalytic activity of TiO₂/WO₃ nanocomposite from sonochemical-microwave assisted synthesis for the photodegradation of ciprofloxacin and oxytetracycline antibiotics under UV and sunlight, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 428 (2022) 113848. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.113848>.
- [136] S. Choudhary, M. Sharma, V. Krishnan, S. Mohapatra, Facile synthesis of Ce doped ZnO nanowires for efficient photocatalytic removal of organic pollutants from water, *Materials Today Communications*. 34 (2023) 105361. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105361>.
- [137] WU, Zhang-Wei, TYAN, Shing-Long, CHEN, Hsin-Hsien, et al. Temperature-dependent photoluminescence and XPS study of ZnO nanowires grown on flexible Zn foil via thermal oxidation. *Superlattices and Microstructures*, 2017, vol. 107, p. 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2017.04.016>.
- [138] K.S. Ranjith, R.T. Rajendra Kumar, Regeneration of an efficient, solar active hierarchical ZnO flower photocatalyst for repeatable usage: controlled desorption of poisoned species from active catalytic sites, *RSC Adv.* 7 (2017) 4983–4992. <https://doi.org/10.1039/C6RA27380G>.
- [139] Z. Obeizi, H. Benbouzid, S. Ouchenane, D. Yılmaz, M. Culha, M. Bououdina, Biosynthesis of Zinc oxide nanoparticles from essential oil of *Eucalyptus globulus* with antimicrobial and anti-biofilm activities, *Materials Today Communications*. 25 (2020) 101553. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101553>.
- [140] E. Dinga, D.M.N. Mthiyane, U. Marume, T.-L. Botha, S. Horn, R. Pieters, V. Wepener, A. Ekennia, D.-C. Onwudiwe, Biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Melia azedarach* seed extract: Evaluation of the cytotoxic and antimicrobial potency, *OpenNano*. 8 (2022) 100068. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100068>.
- [141] M.S. Akhtar, M.K. Swamy, A. Umar, A. Abdullah, A. Sahli, Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from methanol leaf extract of *Cassia didymobotrya* and assessment of their antioxidant and antibacterial activities, *Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2015.10966>.

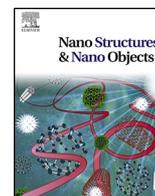
- [142] G.R. Rudramurthy, M.K. Swamy, U.R. Sinniah, A. Ghasemzadeh, Nanoparticles: alternatives against drug-resistant, *Molecules* 21 (2016) 1–30, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070836>.
- [143] M. Banoee, S. Seif, Z.E. Nazari, P. Jafari-Fesharaki, H.R. Shahverdi, A. Moballegh, K.M. Moghaddam, A.R. Shahverdi, ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 93 (2010) 557–561.
- [144] P.K. Tyagi, D. Gola, S. Tyagi, A.K. Mishra, A. Kumar, N. Chauhan, A. Ahuja, S. Sirohi, Synthesis of zinc oxide nanoparticles and its conjugation with antibiotic: Antibacterial and morphological characterization, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 14 (2020) 100391. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100391>.
- [145] Happy Agarwal, Soumya Menon, S. Venkat Kumar, S. Rajeshkumar, Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route, *Journal of Chemico-Biological Interactions* 286 (2018) 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.008>.
- [146] O.K. Putri, H. Syafdhan, Holilah, A. Fadlan, Y. Kusumawati, M. Santoso¹, D. Prasetyoko, and H.J. Achmad, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF PHYTOSYNTHESISED ZnOs BY *Hibiscus tiliaceus* LEAF EXTRACT AGAINST FOUR PATHOGENIC BACTERIA. *Rasayan J. Chem.*, 15(4), 2835-2843(2022). <http://doi.org/10.31788/RJC.2022.1546935>.
- [147] A.O. Fadwa, D.K. Alkoblan, A. Mateen, A.M. Albarag, Synergistic effects of Zinc oxide Nanoparticles and various antibiotics Combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated bacterial strains, *Saudi Journal of Biological Sciences* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.064>.
- [148] J.P. Shabaaz Begum et al., Bioreduction synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Delonix regia* leaf extract (Gul Mohar) and its agromedicinal applications, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.07.009>.
- [149] J.K. Patra, K. Baek, C.O. Perera, Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria

along with its anticandidal and antioxidant effects, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–14, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00167>.

- [150] Sema CAGLAR, Ahmet ALTAY, Bulent CAGLAR, Esmâ YENİCERİ, Betül HARURLUOĞLU, In Vitro Cytotoxic Evaluation of a Silver(I) Complex Including Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Niflumic Acid and 3-Picoline on Human-Derived Cancer Cell Lines. *Journal of Science and Technology* 2022, 15(3), 736-748. DOI: 10.18185/erzifbed.1130634
- [151] Nedjma Assas, Zineb Elbahri, Milad Baitiche, Ferhat Djerboua, Effects of some process parameters on the niflumic acid controlled release polymeric microspheres: Optimization using designs of experiments. *Asia-Pac J Chem Eng.* 2019;e2283. <https://doi.org/10.1002/apj.2283>.
- [152] Răzvan Constantin Barbaresso, Ileana Rău, Roxana Gabriela Zgârian, Aurelia Meghea, Mihaela Violeta Ghica, Niflumic acid-collagen delivery systems used as anti-inflammatory drugs and analgesics in dentistry. *C. R. Chimie* 17 (2014) 12–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2013.07.007>.
- [153] Chenchen Yu, Chungang Zhang, Xuefeng Guan, Dan Yuan, The solid dispersion of resveratrol with enhanced dissolution and good system physical stability. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 84 (2023) 104507. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104507>.
- [154] Duyen Thi My Huynh, Huynh Thien Hai, Nguyen Minh Hau, Huynh Kim Lan, Truong Phu Vinh, Van De Tran, Duy Toan Pham, Preparations and characterizations of effervescent granules containing azithromycin solid dispersion for children and elder: Solubility enhancement, taste-masking, and digestive acidic protection. *Heliyon* 9 (2023) e16592. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16592>.
- [155] Denis A. Baranov, Sofia O. Vysotskaya, Elena P. Zarochentseva, Dmitry A. Lisachenko, Daria A. Nosova, Alexey A. Tsyganenko, Spectral studies of niflumic acid aggregation in dissolved, solid and adsorbed states. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 222 (2019) 117224. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117224>.

- [156] Mikołaj Czajkowski, Ann-Christin Jacobsen, Annette Bauer-Brandl, Martin Brandl, Paulina Skupin-Mrugalska, Hydrogenated phospholipid, a promising excipient in amorphous solid dispersions of fenofibrate for oral delivery: Preparation and in-vitro biopharmaceutical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 644 (2023) 123294. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123294>.
- [157] Harsh Chauhan, Anuj Kuldipkumar, Timothy Barder, Ales Medek, Chong-Hui Gu, Eman Atef, Correlation of Inhibitory Effects of Polymers on Indomethacin Precipitation in Solution and Amorphous Solid Crystallization Based on Molecular Interaction. *Pharm Res* (2014) 31:500–515. DOI 10.1007/s11095-013-1178-1.
- [158] Sheng Qi, Andreas Gryczke, Peter Belton, Duncan Q.M. Craig, Characterisation of solid dispersions of paracetamol and EUDRAGIT® E prepared by hot-melt extrusion using thermal, microthermal and spectroscopic analysis. *International Journal of Pharmaceutics* 354 (2008) 158–167. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.048
- [159] Palpandi Pandi, Raviteja Bulusu, Nagavendra Kommineni, Wahid Khan, Mandip Singh, Amorphous solid dispersions: An update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products. *International Journal of Pharmaceutics* 586 (2020) 119560. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119560>.
- [160] Norbert Radacsi, Georgios D. Stefanidis, Piroska Szabó-Révész, Rita Ambrus, Analysis of niflumic acid prepared by rapid microwave-assisted evaporation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 98 (2014) 16–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.020>.
- [161] Poovi Ganesan, Rajpriyadarsini Soundararajan, Uma Shanmugam, Vinothini Ramu, Development, characterization and solubility enhancement of comparative dissolution study of second generation of solid dispersions and microspheres for poorly water soluble drug. *asian journal of pharmaceutical sciences* (2015) 433–441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2015.05.001>.
- [162] Smruti P. Chaudhari, Rohit P. Dugar, Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. *Journal of Drug*

- [163] T. Szunyogh, R. Ambrus, P. Szabó-Révész, Formation of niflumic acid particle size by solvent diffusion and solvent evaporation as precipitation methods. *J. DRUG DEL. SCI. TECH.*, 22 (4) 307-312 2012.
- [164] Dehghan M H G, Saifee M, Hanwate R M, Comparative Dissolution Study of Glipizide by Solid Dispersion Technique. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 2 (9)*, 2010,293-297.
- [165] Tanvir Halim, Nilufa Haque, Md. Didaruzzaman Sohel, Rajibul Islam Khan, Mohammad Menhaj Ovi, Labiba Amal and Md. Hassan Kawsar, Study of Dissolution Enhancement of Furosemide by Solid Dispersion Technique Using Different Polymer. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 2019, 9, 329-338. DOI: <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2019.09.06.6>.
- [166] Jingzhou Guo, Yuanzuo Zou, Bo Shi, Yuan Pu, Jiexin Wang, Dan Wang, Jianfeng Chen, Experimental verification of nanonization enhanced solubility for poorly soluble optoelectronic molecules. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 60 (2023) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2023.02.017>.



Synergistic effect of synthesized ZnO nanoflowers coupled with various antibiotics against pathogenic microbes: Characterization, antibacterial and antifungal activity assessment

Nassima Makaoui^{a,b}, Nassiba Moghni^a, Khalida Boutemak^c, Lynda Akkache^b,
Hicham Imoudache^{b,d}, Amel Hadj-Ziane Zafour^{a,*}

^a Chemical Engineering Laboratory, Process Engineering Department, Faculty of Technology, University Saad Dahleb, Blida 1, BP270, 09000 Blida, Algeria

^b Research and Development Center, SAIDAL GROUP, Algiers, Algeria

^c Functional Analysis of Chemical Processes Laboratory, Process Engineering Department, Faculty of Technology, University Saad Dahleb, Blida 1, BP270, 09000 Blida, Algeria

^d Pharmaceutical Inorganic Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine, University Saad Dahleb, Blida 1, BP270, 09000 Blida, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

ZnO
Nanoflowers
Antibiotics
Antibacterial activity
Antifungal activity
Synergistic effect

ABSTRACT

In this study, zinc oxide nanoparticles (denoted as ZnO NPs) were synthesized via a simple sol-gel technique using only two precursors. Various techniques were utilized to characterize the prepared ZnO nanoparticles. X-ray diffraction analysis indicated the formation of nanoparticulated crystallite ZnO, whilst XPS spectra confirmed the occurrence of Zn and O atoms. SEM imaging showed a nanoflower morphology with varying particle sizes at the nanoscale, whereas DLS characterization revealed a mean particle diameter that equalled 19 nm. The EDX technique confirmed the presence of Zn and O with 85.43% and 12.4%, respectively. Meanwhile the adopted colorimetric method revealed a 99.9% ZnO loading, implying the high purity of the synthesized material. The synergistic effect of combining ZnO nanoflowers with antibiotics, namely chlortetracycline hydrochloride, spiramycin and azithromycin, on enhancing the antibacterial activity against various bacterial strains was investigated via the disc diffusion technique. The antifungal activity of the synthesized ZnO-antibiotic was also examined. The antibacterial and antifungal activities of chlortetracycline hydrochloride and spiramycin were enhanced in the presence of the ZnO nanomaterial, confirming the synergistic impact of the ZnO-chlortetracycline and ZnO-spiramycin conjunctions. The ZnO-CTC materials exhibited the best synergistic effect both against gram-negative and gram-positive organisms. The inhibitory zone of ZnO-CTC in *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* plates were 26.3%, 18.3%, 20.0% and 18.3% higher than that of CTC alone. The inhibition zone of ZnO-CTC against *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus brasiliensis* increased by 45.0%, 26.3% and 21.5% in comparison to bare ZnO, respectively. This implies the combination of ZnO-CTC outperforms ZnO in terms of antibacterial efficiency. On the other hand, the antibacterial and antifungal efficiencies were decreased on coupling ZnO with the azithromycin antibiotic, implying that pairing it with azithromycin had no effect. The obtained findings confirm that the synthesized ZnO-antibiotic material could be utilized in combination with different antibiotics as a powerful alternate antibacterial and antifungal agent against highly pathogenic resistant species.

1. Introduction

Nanomaterials with enhanced antimicrobial, and anti-inflammatory activities exhibit appealing potential for a variety of pharmacological applications because of their distinctive physicochemical features [1]. Nanomaterials, in particular zinc oxide, have lately received widespread

interest among nanomaterials owing to their antibacterial effectiveness against both gram-positive and gram-negative bacteria, as well as their fungicidal and anti-inflammatory efficiency [2–4]. Additionally, ZnO NPs are acknowledged to be low-cost, harmless, bio-safe and biocompatible [5].

An urgent need for the development of novel drugs has arisen as a

* Corresponding author.

E-mail address: hadj.ziane2020@gmail.com (A.H.-Z. Zafour).

<https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2023.101047>

Received 12 May 2023; Received in revised form 15 August 2023; Accepted 24 September 2023

Available online 10 October 2023

2352-507X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

result of the emergence of drug resistance to a variety of antibiotics. In this context, the combination of ZnO NPs with antibiotics appears to be a promising strategy to overcome antibiotic microbial resistance [6]. ZnO nanoparticles (NPs) have strong antimicrobial activity by interfering with the synthesis of the cell wall and cell membrane. This leads to increased membrane permeability and nanoparticle internalization, which subsequently influence cellular lipid peroxidation, destruction of the proton motive force and mitochondrial dimming due to the absorption of liquefied metal cations, intracellular release and the discharge of the oxidative stress gene expression, ultimately inhibiting bacterial reproduction [7–9].

The antimicrobial effectiveness of antibiotics drugs, such as chloramphenicol [10], ampicillin [11], meropenem [12], colistin [13] and others, were shown to increase in the presence of ZnO oxide [14]. Most importantly, ZnO NPs, alone or combined with other materials, demonstrated synergistic activity with various antibiotics against an array of bacterial strains, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter aerogens* [10,14,15]. For example, Banoee et al. [16] confirmed that the combination of ZnO with the ciprofloxacin antibiotic led to better antibacterial activity towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. Nevertheless, with the addition of ZnO, the antimicrobial property of amoxicillin against *Staphylococcus aureus* was significantly reduced. Bhande et al. [11], on the other hand, explored the synergistic action of various β -lactam drugs, like ceftriaxone and ampicillin, with pure ZnO nanoparticles against diverse bacterial species. The study showed that the combination of ZnO NPs with β -lactam drugs resulted in increased antibacterial activity against the selected bacteria. This improvement was ascribed mostly to an increase in the rate of cell membrane damage. Furthermore, Tyagi et al. [17] prepared ZnO coupled with ciprofloxacin medication and assessed their efficiency against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. This mixture enhanced the antibacterial efficiency against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* by 4.3 and 2.7 times, respectively, in comparison to bare ZnO. Recently, a published paper looked into the impact of ZnO NPs alone or in conjunction with ciprofloxacin, meropenem or colistin drug on collected clinical samples of *P. aeruginosa* as well as its referenced ATCC strain. Interestingly, the conjunction of ZnO nanopowder and colistin demonstrated a synergistic activity, implying that it could be useful as an alternative therapy for infections caused by the highly antibiotic-resistant *P. aeruginosa* bacteria [18]. Moreover, Fadwa et al. [19] examined the synergism of ZnO NPs in conjunction with colistin, ciprofloxacin and meropenem antibiotics towards isolated clinical strains of *A. Baumannii* and *Escherichia coli*, with varying concentrations of the selected antibiotics and ZnO NPs. The authors concluded that the ZnO NPs' influence was concentration-dependent since the strongest antibacterial activity was observed at the highest loading of ZnO NPs. Meantime, El-Telbany et al. [20] reported an antimicrobial enhanced synergy of the prepared ZnO-meropenem conjunction against *Pseudomonas aeruginosa* strains.

The majority of the investigations have focused on the antibacterial efficiency of the ZnO-antibiotic combination, yet the antifungal activity of this type of conjunction has rarely been addressed. For instance, Abo-Shama et al. [21] reported that the ZnO metal with antibiotics like azithromycin and fosfomycin showed no effect against *Candida albicans* strains. On the other hand, a recent study explored the synergistic effect of itraconazole and amphotericin B drugs and synthesized zinc oxide against *Aspergillus fumigatus* species [22]. The study concluded that the combination of 0.5 mg/ml of ZnO NPs with the mentioned antifungal agents resulted in increased antibiotic activity against the studied fungi [22].

Chlortetracycline hydrochloride (CTC), azithromycin dihydrate (AZ) and spiramycin (SPM) antibiotics have been heavily used to treat the majority of existing infections, particularly respiratory infections. For instance, the consumption of azithromycin dehydrate antibiotics has increased dramatically for treating Covid virus infections during the corona crisis [23]. However, several studies have reported that different

bacteria species are developing high resistance to chlortetracycline hydrochloride and spiramycin [24–27]. Even though the conjunction of ZnO-antibiotics has been addressed, the association of ZnO NPs with chlortetracycline hydrochloride, spiramycin or azithromycin dihydrate with enhanced microbial activity has not been reported.

Therefore, in this work, ZnO nanomaterials were synthesized and thoroughly characterized by multiple techniques to assess their textural properties. The as-prepared ZnO NPs were coupled with chlortetracycline hydrochloride, azithromycin or spiramycin antibiotics. The antimicrobial activity and synergistic effect of the synthesized ZnO-antibiotic conjunctions were tested towards different categories of gram-positive and gram-negative bacteria, and fungi, particularly against the highly resistant *Pseudomonas aeruginosa* specie. The optimal loading of ZnO NPs was determined to ensure the greatest bactericidal potency.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Zinc acetate dihydrate (99.5–100%, Merck), oxalic acid dihydrate ($\geq 99.0\%$, Merck), potassium bromide ($\geq 99.5\%$, PanReac), ethanol (96%, Biochem), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.1 M, PanReac), sodium hydroxide ($\geq 97.0\%$), hydrochloric acid (36.5–38.0%), ammonium chloride (99.5%), acetic acid glacial ($\geq 99.0\%$), sodium sulfide (97.0–103.0%), Glycerol (83.5–89.5%), xylene orange tetrasodium salt, potassium nitrate ($\geq 99.0\%$) and hexamethylenetetramine ($\geq 99.0\%$) were purchased from Sigma Aldrich Company. The chlortetracycline hydrochloride (CTC), azithromycin dihydrate (AZ), and spiramycin (SPM) drugs, commercial ZnO as well as the used bacterial strains were kindly supplied by Soidal Research and Development Center (Algeria). All employed chemicals in this study were of reagent grade and were used without further purification. Distilled water was used during this experimental work.

2.2. Synthesis of the ZnO NPs

The ZnO nanoparticles were prepared through a sol-gel method. First, 11 g of zinc acetate dihydrate was dissolved in 100 ml of distilled water under magnetic stirring to obtain a clear solution. An oxalic acid aqueous solution (2.5%) was slowly introduced to the zinc acetate solution under constant stirring for half an hour at ambient temperature before being allowed to precipitate overnight. The obtained precipitate was then filtered, washed 3 times with distilled water, dried and calcined at 600 °C for 2 h 30 min. The obtained powder was ground and kept in a sealed container for future use.

2.3. Characterization of the ZnO NPs

X-ray diffraction analysis (XRD) was used to evaluate the phases present and the crystal structure of the prepared ZnO material. The XRD patterns were registered using a Bruker AXS D8 ADVANCE X-ray diffractometer using a Cu K α radiation source with $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$. The scanning range for 2θ was set between 10° and 80° with an analyzing step of 0.05°. The mean ZnO crystallite size (d) was estimated using the Scherrer equation:

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

where d is the crystallite size (nm), k is a constant that equals 0.89, λ represents the X-ray wavelength (nm), θ represents the Bragg diffraction angle and B refers to the full width at half maximum of the most intense peak. To further describe the prepared ZnO structure, a Raman spectrum was acquired at room temperature via a high-resolution confocal Lab-RamHR Horiba Jobin Yvon instrument, using an excitation laser edge of

633 nm, with a power of 17 mW. X-ray photoelectron spectroscopy examination (XPS) was conducted using an X-ray photoelectron analyzer (Thermo Scientific) equipped with an Al K α anode as the irradiation source to determine the valence state of the prepared ZnO oxide. The particle size distribution and profile were evaluated through Dynamic Light Scattering (DLS) via a Horiba Nanoparticle Analyzer (SZ 100 series).

A scanning electron microscope (FEG-SEM, HORIBA Scientific) connected to an energy-dispersive X-ray (EDX) system was used to examine the external morphology and the elemental composition of the prepared zinc oxide. Furthermore, the content of the synthesized ZnO NPs was determined using the method described in the 10th edition of the European Pharmacopoeia (EP). After dissolving 0.15 g of the ZnO NPs in acetic acid, this solution was diluted to 200 ml. Following that, xylenol orange triturate (50 mg) and hexamethylenetetramine (50 mg) were added until the solution turned pink. An additional 2 g of hexamethylenetetramine was added. Titration with EDTA 0.1 M was performed until the pink color changed to yellow.

2.4. Antibacterial and antifungal activities

The antimicrobial efficiency was evaluated through the disk diffusion technique against four bacterial strains, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), and three fungi strains, namely: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) and *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

The antibacterial and antifungal activities were examined against the aforementioned bacteria and fungi to determine the synergistic impact of the interaction between ZnO and the selected drugs. All solutions of ZnO NPs (500 $\mu\text{g}/\text{disk}$), CTC (2500 $\mu\text{g}/\text{disk}$), AZ (1250 $\mu\text{g}/\text{disk}$) and SPM (2500 $\mu\text{g}/\text{disk}$), in addition to the combination of ZnO-CTC (500–2500 $\mu\text{g}/\text{disk}$), ZnO-SPM (500–2500 $\mu\text{g}/\text{disk}$) and ZnO-AZ (500–1250 $\mu\text{g}/\text{disk}$), were prepared in sterile water.

Each bacterial species was grown separately in trypticase soy broth and incubated at 35 °C. Meanwhile, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* were cultured in Sabouraud agar at 25 °C for 48 h and *Aspergillus brasiliensis* was grown at 25 °C between 7 and 10 days. After the incubation process, each organism was suspended in sterile saline to achieve a final microbial concentration of 10⁸ CFU/ml, while that of *Aspergillus brasiliensis* was 10⁷ CFU/ml and then adjusted using 0.5 McFarland standards or by measuring the optical densities. These suspensions were spread in Petri dishes on Mueller Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for fungi. Sterile discs (9 mm) were impregnated with 50 μL of each sample solution. The used dishes were then incubated at 35 °C for 24 h for bacterial strains, 48 h at 25 °C for *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, and from 48 to 72 h at 25 °C for *Aspergillus brasiliensis*. The inhibition zone was then measured. Each test was repeated in sextuplicate.

3. Results and discussion

3.1. Characterization results

XRD analysis was performed to examine the crystallite structure of the ZnO nanopowder. Fig. 1 shows the XRD pattern for the ZnO NPs. The prepared ZnO exhibit a diffraction pattern that coincides with the hexagonal structure of ZnO (JCPDS No. 36–1451) [3]. Furthermore, the XRD pattern showed only the peaks of ZnO nanocrystals, without any other abnormal peaks, indicating the purity of the sample and confirming the efficiency of the disclosed sol-gel method for producing highly pure ZnO NPs and the complete decomposition of the used precursors [28]. The sharp diffraction peaks signify the optimal production of ZnO with a high crystallinity [29]. According to the Scherrer formula, the average crystallite size of the ZnO NPs is equal to 18 nm.

The Raman spectrum of ZnO-prepared nanomaterial, obtained at

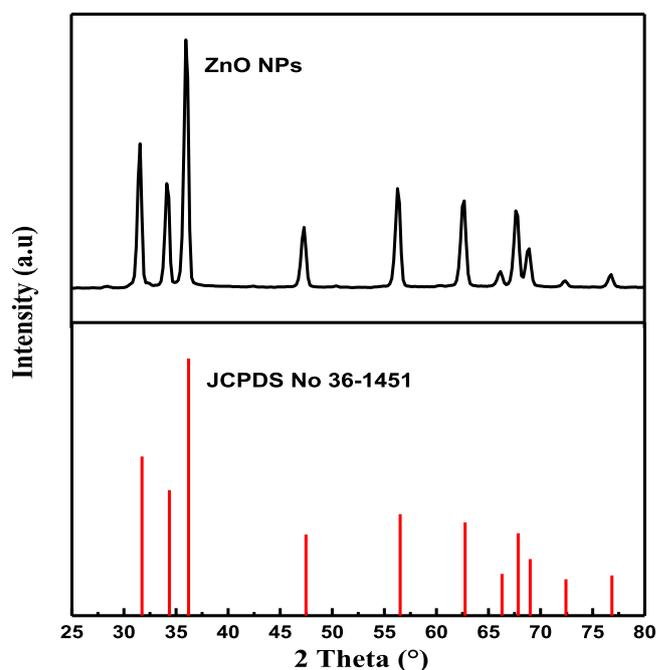


Fig. 1. XRD patterns of the standard ZnO JCPDS card No. 36–1451 and the synthesized ZnO NPs.

room temperature, is depicted in Fig. 2. A strong peak is centered about 439 cm^{-1} , referred to as E₂^{high}, which primarily concerns the displacement of oxygen atoms. It is worth mentioning that the high mode is an indication of the significant crystallinity of the ZnO structure [30]. Furthermore, this dominant peak also bears the fingerprint of the production of the highly pure hexagonal structure, as shown previously by XRD analysis. The prepared ZnO sample shows a peak around 330 cm^{-1} that is assigned to a second-order vibration, which is attributed to E₂(high) - E₂(low) [31]. The peaks at 381 cm^{-1} and the tiny shoulder peaks around 414 cm^{-1} are attributed to transverse optical phonon [32]. The various peaks at 539, 657, 1104 and 1150 cm^{-1} are associated with the multiple-phonon scattering phenomenon, whereas the value around 585 cm^{-1} is assigned to the longitudinal optical mode [33].

The XPS analysis was conducted to investigate the chemical state of the prepared ZnO nanomaterial. The XPS survey spectrum, shown in Fig. 3a, indicates the occurrence of Zn, O and C atoms; the presence of C cannot be avoided since it is due to the instrument itself and the sample

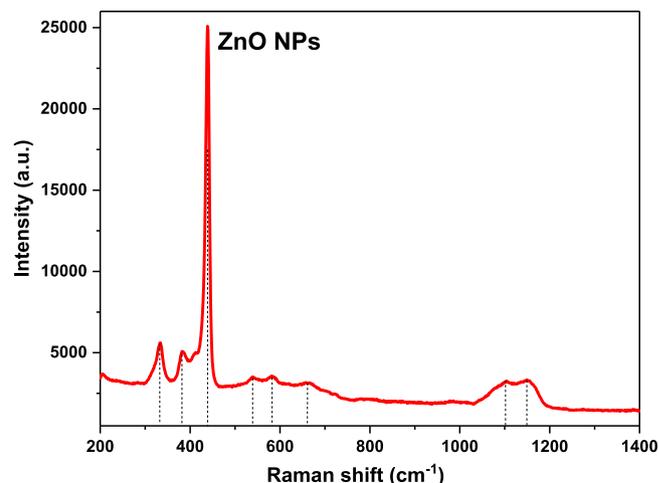


Fig. 2. Raman spectrum of the synthesized ZnO NPs.

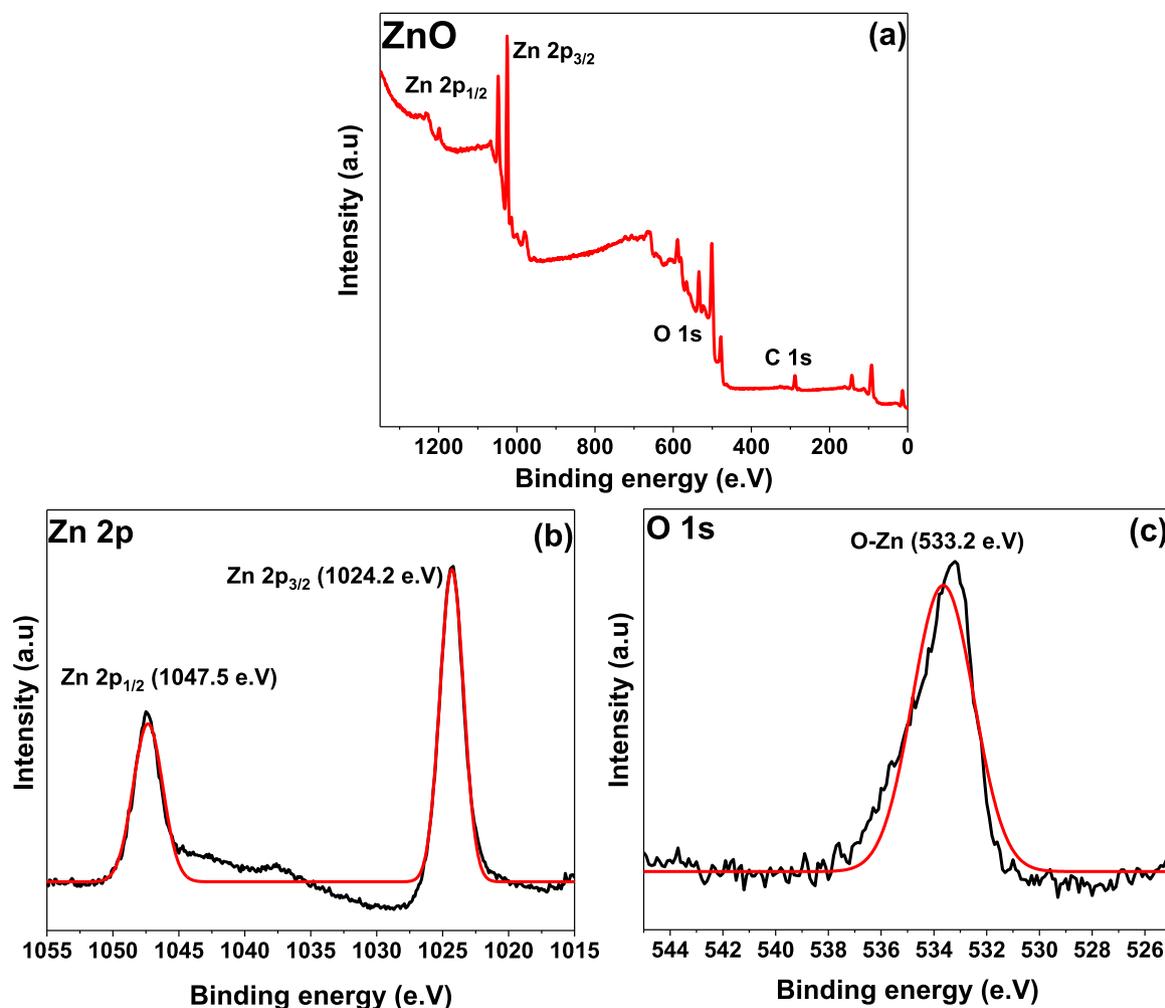


Fig. 3. XPS spectra of (a) the prepared ZnO, (b) Zn 2p and (c) O 1 s.

mounting [27]. As presented in Fig. 3b, the Zn 2p consists of two distinguished peaks at 1047.5 and 1024.5 eV, which are assigned to Zn 2p_{1/2} and Zn 2p_{3/2} [34]. Thus, both the occurrence of the pure hexagonal structure, which is consistent with the XRD findings, as well as the presence of Zn²⁺ in the developed ZnO can be confirmed [35]. For the O 1 s XPS spectrum (Fig. 3c), a large peak is observed at 533.2 eV, which is attributed to the lattice oxygen of the O–Zn bond [36].

The DLS pattern of the elaborated ZnO nanoparticles is exhibited in Fig. 3. It demonstrates the formation of a monodispersed system composed of particles with uniform sizes of 19 nm. These findings support not only the development of a highly pure ZnO material, but also the production of nanosized particles. It is worth noting that the obtained particle size agrees perfectly with the one obtained through XRD analysis.

The morphology of the ZnO material was examined by the SEM technique. Fig. 4 represents the SEM images taken at low magnification (1 μm). A nanoflower-like structure, more specifically similar to a rose-like morphology, is observed with some noticeable agglomeration. The same images depict an almost spherical surface morphology with varying particle sizes. The presence of highly adherent cotton-like aggregates is also noticed. These observations are in perfect agreement with the results of previous investigations that have been reported in the literature [37,38].

Meanwhile, a quantitative analysis was accomplished on ZnO by EDS to assess the chemical composition and the amount of each component. The EDX plot, as revealed in Fig. 5, displayed two main peaks of the zinc element at 1.0 and 8.6 KeV, and another small peak at 9.6 KeV. Other

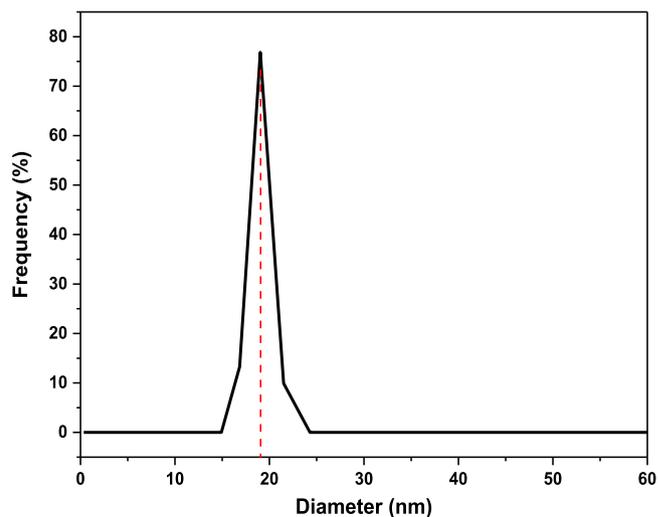


Fig. 4. DLS pattern of the as-prepared ZnO nanomaterial.

peaks were also detected for carbon, and oxygen, at other KeV values. The immersed carbon during analysis cannot be dismissed since it originated from the sample mounting and the grid during analysis. Fig. 6.

The presented findings in Table 1 show that the obtained ZnO

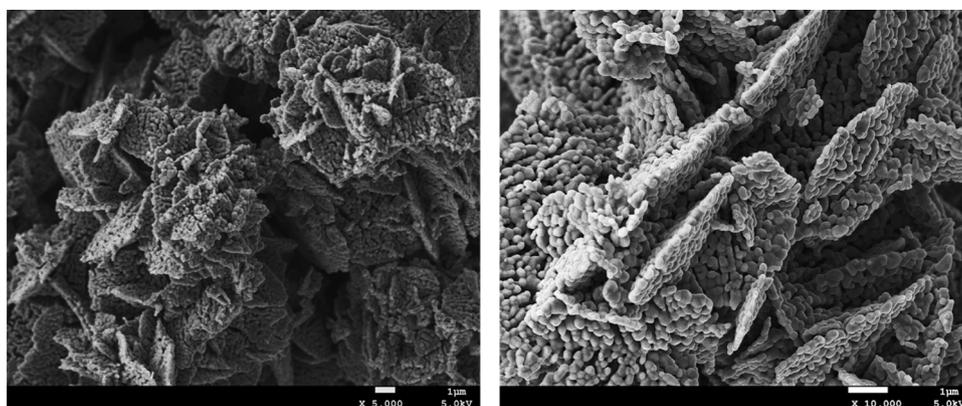


Fig. 5. SEM images of the synthesized ZnO NPs, at different amplifications.

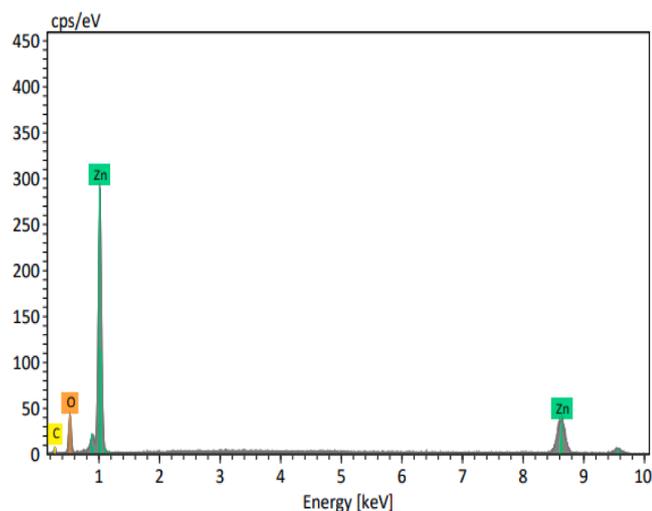


Fig. 6. EDX spectrum of the prepared ZnO NPs.

Table 1
Main textural and morphological properties of the synthesized ZnO NPs.

Crystallite size by DRX (nm)	Particle size by DLS (nm)	Elemental weight by EDX (%)	ZnO by colorimetric method (%)
18	19	Zn 85.43 O 12.24 C 2.34	99.93

nanoflowers are mainly made up of Zn and O elements, with the actual loading percentages of Zn and O being in excellent harmony with the theoretical values.

The normalized colorimetric technique, according to the European pharmacopeia, was used to determine the amount of ZnO oxide. The loading of ZnO synthesized was greater than 99%, as shown in Table 1, confirming the high purity of the fabricated material. Furthermore, in comparison to traditional quantitative techniques, such as Fluorescence X and EDS, which are costly, the colorimetric method used here is a simple analytic technique that allows for a precise result in a short period of time at a lower cost.

3.2. Antibacterial and antifungal activity assessment

The synergetic effect of the as-developed ZnO nanopowder with each selected antibiotic (AB) was examined against both gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria as well as on different fungi by the

disc diffusion technique. The obtained inhibition zone diameters (ZI), either in the presence or absence of ZnO nanoparticles against different strains, are outlined in Tables 2, 3 and 4. The results were compared to the antibacterial activity of the bare ZnO NPs. The enhancement or reduction in antibactericidal activity of the selected antibiotics after conjunction with prepared ZnO NPs has been estimated using the two following equations:

$$\text{Enhancement of ZI}(\%) = \frac{ZI_{(ZnO-AB)} - ZI_{ZnO}}{ZI_{ZnO}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Enhancement of ZI}(\%) = \frac{ZI_{(ZnO-AB)} - ZI_{AB}}{ZI_{AB}} \times 100 \quad (3)$$

The synthesized ZnO had excellent antibacterial and antifungal activity against all the tested strains. The strongest antimicrobial activity of ZnO was detected against *Bacillus subtilis* and *Aspergillus brasiliensis* strains, with inhibition diameters of 18.4 and 26.0 mm, respectively.

As depicted in Table 2 and Fig. 7, the inhibitory zone of CTC for *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* plates increased by 26.3%, 18.3%, 20.0% and 18.3%, respectively, in the presence of the ZnO NPs. These results demonstrate the efficient synergistic combination of ZnO and CTC antibiotics against gram-negative and gram-positive organisms.

For the case of fungi, the CTC drug displays a fungistatic effect on the three species, whereas ZnO has fungicidal activity. The inhibition zone of ZnO against *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus*

Table 2
Inhibition zone diameters of ZnO (500 μg/disk), CTC (2500 μg/disk) and ZnO-CTC (500–2500 μg/disk) against various strains.

Strains	Inhibition zone (mm) Mean ± SD			Increase/decrease in inhibition zone (%)	
	ZnO	CTC	ZnO-CTC	As compared to ZnO	As compared to CTC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14.75 ± 0.02	17.08 ± 0.05	21.58 ± 0.07	46.3	26.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.00 ± 0.14	37.33 ± 0.04	44.17 ± 0.06	145.4	18.3
<i>Bacillus subtilis</i>	18.42 ± 0.25	42.50 ± 0.06	51.00 ± 0.04	176.9	20.0
<i>Escherichia coli</i>	14.25 ± 0.09	26.42 ± 0.06	31.25 ± 0.04	119.3	18.3
<i>Candida albican</i>	15.92 ± 0.07	21.75 ± 0.1 ^(a)	23.08 ± 0.06	45.0	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16.17 ± 0.05	12.00 ± 0.04 ^(a)	20.42 ± 0.18	26.3	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26.00 ± 0.04	14.17 ± 0.06 ^(a)	31.58 ± 0.01	21.5	-

(a): fungistatic

Table 3

Inhibition zone diameters of ZnO (500 µg/disk), SPM (2500 µg/disk) and ZnO-SPM (500–2500 µg/disk) against various strains.

Strains	Inhibition zone (mm) Mean ± SD			Increase/decrease in inhibition zone (%)	
	ZnO	SPM	ZnO-SPM	As compared to ZnO	As compared to SPM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14.75 ± 0.02	12.00 ± 0.04	14.08 ± 0.07	-4.5	17.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.00 ± 0.14	24.67 ± 0.03	34.50 ± 0.04	91.7	39.9
<i>Bacillus subtilis</i>	18.42 ± 0.25	25.75 ± 0.05	32.50 ± 0.02	76.5	26.2
<i>Escherichia coli</i>	14.25 ± 0.09	16.67 ± 0.02	18.33 ± 0.09	28.7	10.0
<i>Candida albicans</i>	15.92 ± 0.07	-	15.25 ± 0.05 ^(a)	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16.17 ± 0.05	11.50 ± 0.04 ^(a)	12.25 ± 0.02	-24.2	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26.00 ± 0.04	-	16.42 ± 0.04	-36.9	-

Table 4

Inhibition zone diameters of ZnO (500 µg/disk), AZ (1250 µg/disk) and ZnO-AZ (500–1250 µg/disk) against various strains.

Strains	Inhibition zone (mm) Mean ± SD			Increase/decrease in inhibition zone (%)	
	ZnO	AZ	ZnO-AZ	As compared to ZnO	As compared to AZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14.75 ± 0.02	35.00 ± 0.03	35.42 ± 0.04	140.1	1.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.00 ± 0.14	34.42 ± 0.02	35.00 ± 0.03	94.4	1.7
<i>Bacillus subtilis</i>	18.42 ± 0.25	32.75 ± 0.04	33.92 ± 0.02	84.2	3.6
<i>Escherichia coli</i>	14.25 ± 0.09	21.00 ± 0.05	23.25 ± 0.08	63.2	10.7
<i>Candida albicans</i>	15.92 ± 0.07	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16.17 ± 0.05	-	-	-	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26.00 ± 0.04	15.25 ± 0.05 ^(a)	12.58 ± 0.03	-51.6	-

brasiliensis was found to be increased from 15.9, 16.2 and 26.0 mm to 23.1, 20.4 and 31.6 mm with ZnO-CTC, corresponding to a 45.0%, 26.3% and 21.5% increase in diameter, respectively. This implies that the combination of ZnO and CTC in ZnO-CTC outperforms ZnO in terms of antibacterial efficiency.

The overall study results reveal a significant improvement in the antibacterial and antifungal efficiencies of the chlortetracycline hydrochloride antibiotic on all tested bacterial species and fungi when associated with ZnO-developed nanoparticles. The achieved antimicrobial activity results highlight the potential synergistic influence of ZnO-CTC and that ZnO NPs should be regarded as a worthy adjunct to tetracycline in combination treatment.

ZnO-Spiramycin had a synergistic effect against all studied bacteria (Table 3); particularly *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, whose zones of inhibition were expanded by 39.9% and 26.2%, respectively. Meantime, as seen in Fig. 8, the SPM antibiotic had no antifungal action against *Candida albicans* or *Aspergillus brasiliensis*, but the ZnO-SPM combination had a fungistatic impact against *Candida albicans* and a fungicidal effect against *Aspergillus brasiliensis*. With a reduction of the inhibition zone by 36.9%, SPM alone had a fungistatic impact on *Saccharomyces cerevisiae*, which merely inhibited the growth of harmful fungi, whereas the ZnO-SPM combination had an antifungal effect.

As seen in Table 4 and Fig. 9, ZnO-AZ had no effect on *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus*. A synergistic effect was observed in the *Escherichia coli* plates, where the inhibition zone was raised by 10.7%. Additionally, ZnO-AZ had no significant effect on all tested fungi in this investigation, indicating that the fungicidal activity of ZnO NPs is not affected by pairing with azithromycin.

Differences in bacterial and fungal susceptibility resulting from variations in the structure of cell walls, physiology, metabolic activity or level of interaction, as well as bacterial resistance to specific antibiotics, in addition to the concentration of ZnO NPs and the structure of the chosen antibiotic, are the major causes of the positive or negative effects of combining ZnO with various antibiotics [18,39].

To better understand the impact of combining the three chosen antibiotics with the developed ZnO NPS on the improvement or diminution of the inhibition zone in the case of the selected strains, all the antibacterial and antifungal test results were grouped in Fig. 10.

The synergistic action mechanism of the ZnO-antibiotic can be explained as follow: ZnO NPs display an electrostatic interaction when exposed to the negatively charged surface of the cellular wall of microbes, enabling antibiotic transport into the cell lines [7]. Moreover, ZnO NPs produce highly reactive oxygen substances, known as ROS, in the aqueous environment and trigger lipid peroxidation in the membrane structure [40,41]. Because of the stress that ZnO NPs generate, carbohydrates, proteins and DNA segments are also damaged, which ultimately disrupts vital cellular function and causes cell wall breakage [42]. Furthermore, the as-produced ROS species cause enzyme oxidation and increase, in particular, transpeptidase enzyme inhibition, which ultimately prevents bacteria from reconstructing their cell wall structure [41].

Small crystallite size, spherical morphological shape and low recombination rate, which result in greater ROS formation and ultimately induce cell death, are additional key contributors to the ZnO-enhanced antibiotic's synergetic antibacterial and antifungal performances [19,43,44]. According to the research conducted by Gratton et al. [45] on various particle morphologies, rods have the greatest absorption rate by cell walls, followed by spheres, cylinders and cubes.

4. Conclusion

To combat the growing concern of antibiotic resistance among various diseases, numerous efforts have been made to overcome this. Combining these antibiotics with nanomaterials is one strategy that could be employed to address the antibiotic resistance of pathogenic bacteria and strains. Zinc oxide nanomaterials (ZnO NPs) are antibacterial agents, known to be harmless and eco-friendly materials. Herein we present the effective synthesis of ZnO NPs via the sol-gel approach. Various adopted techniques confirm the formation of highly pure ZnO with a nanoflower structure.

The main purpose of this study is to investigate the antibacterial and antifungal efficiency, together with the synergistic impact of the formulated ZnO-antibiotic conjunctions against various pathogenic strains via the disc diffusion technique, where three antibiotics were selected for study, namely chlortetracycline, spiramycin and azithromycin. The results of the inhibition zone measurements revealed that ZnO nanoparticles enhance the bactericidal and fungicidal efficacy of the selected antibiotics. The overall data strongly suggest that coupling with ZnO NP increases the performances of chlortetracycline and spiramycin for the majority of tested strains, particularly the highly resistant *Pseudomonas aeruginosa*, implying the synergistic activity of the ZnO-CTC and ZnO-SPM combination. Hence, ZnO NP may be considered an excellent adjunct to chlortetracycline and spiramycin in combination therapies. However, the ZnO-azithromycin conjunction exhibited no influence on all tested fungi in the present investigation.

Despite the promising results, further investigations are necessary to determine the acceptable concentration range of the ZnO NPs and chosen antibiotics to avoid toxicity occurrence and this should be

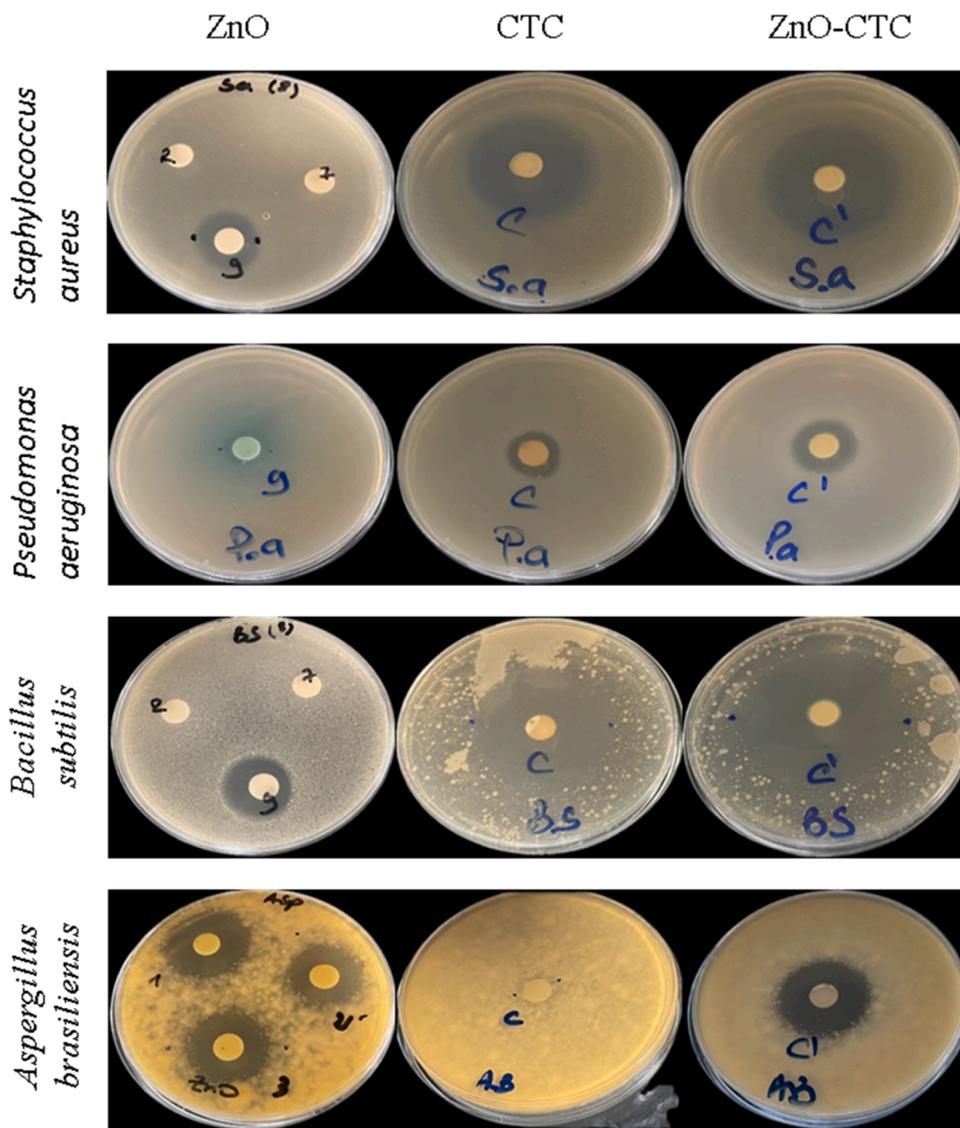


Fig. 7. The antibacterial and antifungal activities of ZnO, CTC and ZnO-CTC using different microbes.

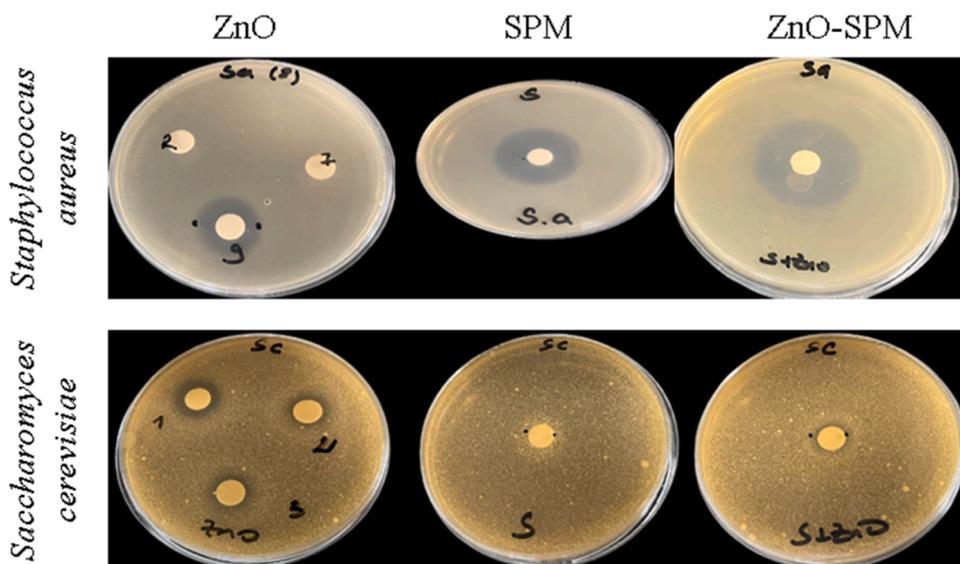


Fig. 8. The antibacterial and antifungal activities of ZnO, SPM and ZnO-SPM using different microbes.

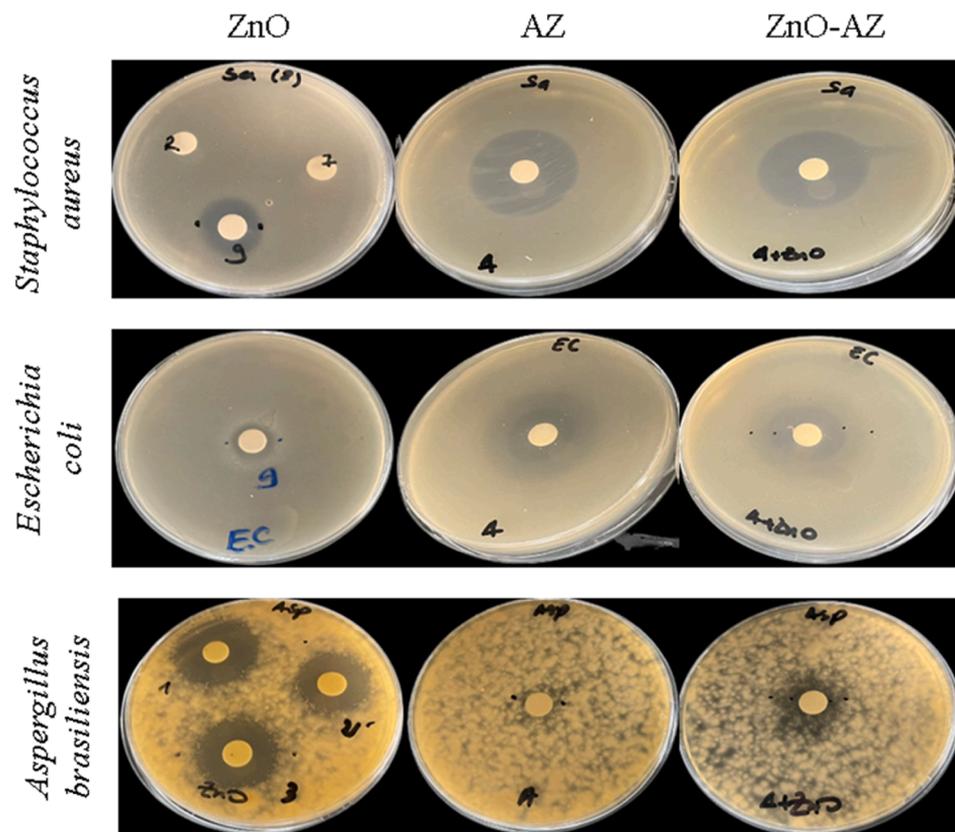


Fig. 9. The antibacterial and antifungal activities of ZnO, AZ and ZnO-AZ using different microbes.

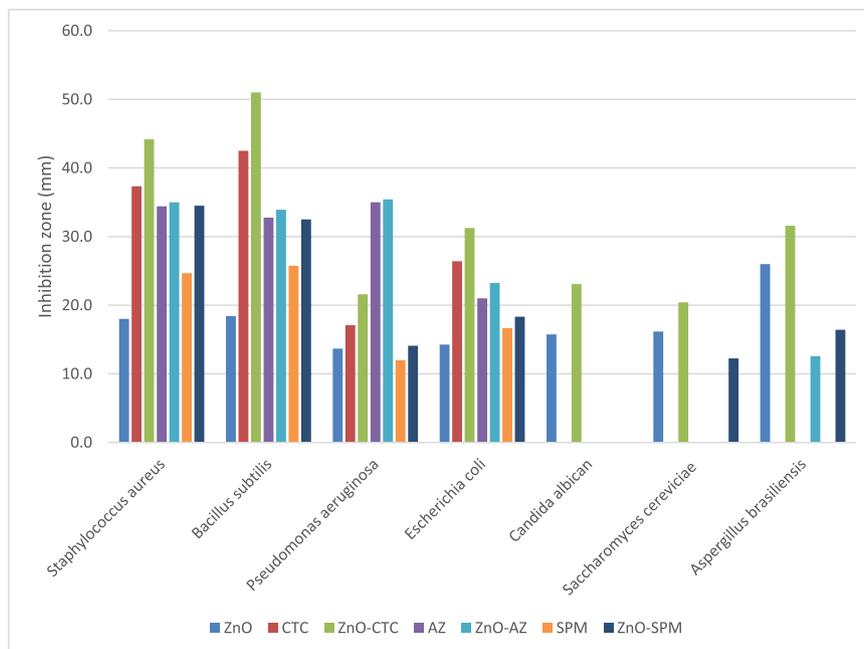


Fig. 10. Effect of ZnO-antibiotic on the antibacterial and antifungal efficiencies.

assessed for biocompatibility and biodegradability before reaching clinical trials.

CRedit authorship contribution statement

Nassima Makaoui: Methodology. Nassiba Moghni: Writing –

original draft preparation. Khalida Boutemak: Validation. Lynda Akkache: Analysis. Hicham Imoudache: Conceptualization. Amel Hadj-Ziane Zafour: Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

- Verma, R. Chowdhary, Advantages of advanced carbon-based nanomaterials in medical and pharmaceuticals. *Advanced Nanocarbon Materials*, CRC Press., 2022, pp. 127–138.
- Moritz, M. Geszke-Moritz, The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles, *Chem. Eng. J.* 228 (2013) 596–613.
- Nagajyothi, S.J. Cha, I.J. Yang, T. Sreekanth, K.J. Kim, H.M. Shin, Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 146 (2015) 10–17.
- Zhang, L. Lin, X. Huang, Y.-G. Lu, D.-L. Zheng, Y. Feng, Antimicrobial properties of metal nanoparticles and their oxide materials and their applications in oral biology, *J. Nanomater.* 2022 (2022).
- Mandal, S. Katuwal, F. Tettey, A. Gupta, S. Bhattarai, S. Jaisi, D.P. Bhandari, A.K. Shah, N. Bhattarai, N. Parajuli, Current research on zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, and biomedical applications, *Nanomaterials* 12 (2022) 3066.
- K.S. Almaary, M.T. Yassin, A.M. Elgorban, F.O. Al-Otibi, A.A. Al-Askar, K. Maniah, Synergistic antibacterial proficiency of green bioformulated zinc oxide nanoparticles with potential fosfomycin synergism against nosocomial bacterial pathogens, *Microorganisms* 11 (2023), <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030645>.
- A. Singh, K. Dasgupta, T. Nailwal, B.P. Nenavathu, TeO₂ deposited ZnO nanotubes combined with cefotaxime as a nanoantibiotic against *Klebsiella pneumoniae*, *Mater. Today.: Proc.* 67 (2022) 451–455, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.05.350>.
- A. León-Buitimea, C.R. Garza-Cárdenas, M.F. Román-García, C.A. Ramírez-Díaz, M. Ulloa-Ramírez, J.R. Morones-Ramírez, Nanomaterials-based combinatorial therapy as a strategy to combat antibiotic resistance, *Antibiotics* 11 (2022) 794.
- E. Bayroodi, R. Jalal, Modulation of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by ZnO nanoparticles, *Iran. J. Microbiol.* 8 (2016) 85.
- K. Chandrasekaran, K. Varaprasad, S.K. Venugopal, L. Arun, A.S.H. Hameed, Synergistic antibacterial effect of the magnesium-doped ZnO nanoparticles with chloramphenicol, *BioNanoScience* 10 (2020) 106–111, <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00696-y>.
- R.M. Bhande, C.N. Khobragade, R.S. Mane, S. Bhande, Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum β -lactamase producers implicated in urinary tract infections, *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1413, <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1413-4>.
- B.N. Singh, P.S. Patil, H. Shah, M. Ashfaq, A. Singh, G. Upadhyay, Meropenem incorporated ZnO nanoflakes as nano antibiotics: efficient antimicrobial activity against metallo β -lactamase producing clinical isolates, *J. Pure Appl. Microbiol.* 17 (2023).
- M.T. Yassin, A.A. Al-Askar, K. Maniah, F.O. Al-Otibi, Green synthesis of zinc oxide nanocrystals utilizing origanum majorana leaf extract and their synergistic patterns with colistin against multidrug-resistant bacterial strains, *Crystals* 12 (2022), <https://doi.org/10.3390/cryst12111513>.
- A.M. Tatagar, J.I. Moodi, J. Abbar, P. Kulkarni, M.A. Phaniband, Study of induced amplification of antibacterial activity of ciprofloxacin on coupling with ZnO nanoparticles (ZnONp), *Mater. Today.: Proc.* 49 (2022) 632–637, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.157>.
- M.A. Mohammed, E.W. Elgammal, A.H. Gaara, M.A. El Raey, Synergistic effect of Silver and ZnO nanoparticles green synthesized by *Vitis vinifera* stem extract with Ampicillin against some pathogenic microbes, *Egypt. J. Chem.* 65 (2022) 697–709.
- M. Banoee, S. Seif, Z.E. Nazari, P. Jafari-Fesharaki, H.R. Shahverdi, A. Moballeg, K.M. Moghaddam, A.R. Shahverdi, ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 93 (2010) 557–561.
- P.K. Tyagi, D. Gola, S. Tyagi, A.K. Mishra, A. Kumar, N. Chauhan, A. Ahuja, S. Sirohi, Synthesis of zinc oxide nanoparticles and its conjugation with antibiotic: Antibacterial and morphological characterization, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 14 (2020), 100391, <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100391>.
- A.O. Fadwa, D.K. Alkoblan, A. Mateen, A.M. Albarag, Synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and various antibiotics combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated bacterial strains, *Saudi J. Biol. Sci.* 28 (2021) 928–935, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.064>.
- A.O. Fadwa, A.M. Albarag, D.K. Alkoblan, A. Mateen, Determination of synergistic effects of antibiotics and ZnO NPs against isolated *E. Coli* and *A. Baumannii* bacterial strains from clinical samples, *Saudi J. Biol. Sci.* 28 (2021) 5332–5337, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.057>.
- M. El-Telbany, A.A. Mohamed, G. Yahya, A. Abdelghafar, M.S. Abdel-Halim, S. Saber, M.A. Alfaleh, A.H. Mohamed, F. Abdelrahman, H.A. Fathey, Combination of meropenem and zinc oxide nanoparticles: antimicrobial synergism, exaggerated antibiofilm activity, and efficient therapeutic strategy against bacterial keratitis, *Antibiotics* 11 (2022) 1374.
- U.H. Abo-Shama, H. El-Gendy, W.S. Mousa, R.A. Hamouda, W.E. Yousuf, H. F. Hetta, E.E. Abdeen, Synergistic and antagonistic effects of metal nanoparticles in combination with antibiotics against some reference strains of pathogenic microorganisms, *Infect. Drug Resist.* 13 (2020) 351–362, <https://doi.org/10.2147/IDR.S234425>.
- H. Liu, Z. Qiao, Y.O. Jang, M.G. Kim, Q. Zou, H.J. Lee, B. Koo, S.-H. Kim, K. Yun, H.-S. Kim, Y. Shin, Diatomaceous earth/zinc oxide micro-composite assisted antibiotics in fungal therapy, *Nano Converg.* 8 (2021), 32, <https://doi.org/10.1186/s40580-021-00283-6>.
- D. Echeverría-Esnal, C. Martín-Ontiyuelo, M.E. Navarrete-Rouco, M. De-Antonio Cuscó, O. Ferrández, J.P. Horcajada, S. Grau, Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 19 (2021) 147–163.
- M. Liu, Y. Zhang, M. Yang, Z. Tian, L. Ren, S. Zhang, Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7551–7557.
- Z. Tian, A. Palomo, H. Zhang, X. Luan, R. Liu, M. Awad, B.F. Smets, Y. Zhang, M. Yang, Minimum influent concentrations of oxytetracycline, streptomycin and spiramycin in selecting antibiotic resistance in biofilm type wastewater treatment systems, *Sci. Total Environ.* 720 (2020), 137531, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137531>.
- G. Wang, H. Liu, P. Gong, J. Wang, X. Dai, P. Wang, Insight into the evolution of antibiotic resistance genes and microbial community during spiramycin fermentation residue composting process after thermally activated peroxydisulfate pretreatment, *J. Hazard. Mater.* 424 (2022), 127287, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127287>.
- N. Moghni, H. Boutoumi, H. Khalaf, N. Makaoui, G. Colón, Enhanced photocatalytic activity of TiO₂/WO₃ nanocomposite from sonochemical-microwave assisted synthesis for the photodegradation of ciprofloxacin and oxytetracycline antibiotics under UV and sunlight, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 428 (2022), 113848, <https://doi.org/10.1016/j.jpchem.2022.113848>.
- M.O. Kyene, E.K. Droepenu, F. Ayertey, G.N. Yeboah, M.-A. Archer, D. Kumadoh, S. O. Mintah, P.K. Gordon, A.A. Appiah, Synthesis and characterization of ZnO nanomaterial from *Cassia sieberiana* and determination of its anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities, *Sci. Afr.* 19 (2023), e01452, <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01452>.
- K. Velsankar, A. Venkatesan, P. Muthumari, S. Suganya, S. Mohandoss, S. Sudhahar, Green inspired synthesis of ZnO nanoparticles and its characterizations with biofilm, antioxidant, anti-inflammatory, and anti-diabetic activities, *J. Mol. Struct.* 1255 (2022), 132420, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132420>.
- M. Rocha, F.P. Araujo, S. Castro-Lopes, I.S. de Lima, E.C. Silva-Filho, J.A. Osajima, C.S. Oliveira, B.C. Viana, L.C. Almeida, Y. Guerra, R. Peña-García, Synthesis of Fe–Pr co-doped ZnO nanoparticles: Structural, optical and antibacterial properties, *Ceram. Int.* 49 (2023) 2282–2295, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.196>.
- A.S. Sá, R.P. Feitosa, L. Honório, R. Peña-García, L.C. Almeida, J.S. Dias, L.P. Brazuna, T.G. Tabuti, E.R. Triboni, J.A. Osajima, A brief photocatalytic study of ZnO containing cerium towards ibuprofen degradation, *Materials* 14 (2021) 5891.
- N. Ashkenov, B. Mbenkum, C. Bundesmann, V. Riedel, M. Lorenz, D. Spemann, E. Kaidashev, A. Kasic, M. Schubert, M. Grundmann, Infrared dielectric functions and phonon modes of high-quality ZnO films, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 126–133.
- A. Manohar, J. Park, D.D. Geleta, C. Krishnamoorthi, R. Thangam, H. Kang, J. Lee, Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles for photocatalysis, antibacterial and cytotoxicity in kidney cancer (A498) cell lines, *J. Alloy. Compd.* 874 (2021), 159868, <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.159868>.
- S. Choudhary, M. Sharma, V. Krishnan, S. Mohapatra, Facile synthesis of Ce doped ZnO nanowires for efficient photocatalytic removal of organic pollutants from water, *Mater. Today Commun.* 34 (2023), 105361, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105361>.
- Z.-W. Wu, S.-L. Tyan, H.-H. Chen, J.-C.-A. Huang, Y.-C. Huang, C.-R. Lee, T.-S. Mo, Temperature-dependent photoluminescence and XPS study of ZnO nanowires grown on flexible Zn foil via thermal oxidation, *Superlattices Micro* 107 (2017) 38–43, <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2017.04.016>.
- K.S. Ranjith, R.T. Rajendra Kumar, Regeneration of an efficient, solar active hierarchical ZnO flower photocatalyst for repeatable usage: controlled desorption of poisoned species from active catalytic sites, *RSC Adv.* 7 (2017) 4983–4992, <https://doi.org/10.1039/C6RA27380G>.
- Z. Obeizi, H. Benbouzid, S. Ouchenane, D. Yılmaz, M. Culha, M. Bououdina, Biosynthesis of Zinc oxide nanoparticles from essential oil of *Eucalyptus globulus* with antimicrobial and anti-biofilm activities, *Mater. Today Commun.* 25 (2020), 101553, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101553>.
- E. Dinga, D.M.N. Mthiyane, U. Marume, T.-L. Botha, S. Horn, R. Pieters, V. Wepener, A. Ekennia, D.-C. Onwuide, Biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Melia azedarach* seed extract: Evaluation of the cytotoxic and antimicrobial potency, *OpenNano* 8 (2022), 100068, <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100068>.
- A.A. Slman, Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on some gram-positive and gram-negative bacteria, *Iraq. J. Phys.* 10 (2012) 5–10.
- K. Feris, C. Otto, J. Tinker, D. Wingett, A. Punnoose, A. Thurber, M. Kongara, M. Sabetian, B. Quinn, C. Hanna, D. Pink, Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas*

- aeruginosa PAO1, *Langmuir* 26 (2010) 4429–4436, <https://doi.org/10.1021/la903491z>.
- [41] X. Liu, L. Ma, F. Chen, J. Liu, H. Yang, Z. Lu, Synergistic antibacterial mechanism of Bi₂Te₃ nanoparticles combined with the ineffective β -lactam antibiotic cefotaxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Inorg. Biochem.* 196 (2019), 110687, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.04.001>.
- [42] K.S. Siddiqi, A. ur Rahman, Tajuddin, A. Husen, Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes, *Nanoscale Res. Lett.* 13 (2018) 141, <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2532-3>.
- [43] A. Singh, B.P. Nenavathu, Irfan, Mohd Mohsin, Facile synthesis of Te-doped ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial studies, *Chem. Pap.* 75 (2021) 4317–4326, <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01654-3>.
- [44] N.S. Al-Radadi, Abdullah, S. Faisal, A. Alotaibi, R. Ullah, T. Hussain, M. Rizwan, Saira, N. Zaman, M. Iqbal, A. Iqbal, Z. Ali, Zingiber officinale driven bioproduction of ZnO nanoparticles and their anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-Alzheimer, anti-oxidant, and anti-microbial applications, *Inorg. Chem. Commun.* 140 (2022), 109274, <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109274>.
- [45] S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J. M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 11613–11618, <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>.