

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Saad Dahleb Blida 1**



**Faculté des Sciences**  
**Département de chimie**

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en :  
**Chimie Analytique**

**Titre**

**Synthèse et caractérisation de systèmes hybrides  
pour l'encapsulation des huiles essentielles**

**Présenté Par**

Kimba Seyni Faizatou

**Et**

Diallo Sira

**Soutenu le 25/06/2024 à Blida, devant le jury composé de :**

A. Kezzim	MCB, Université Blida1	Présidente
Z. Zeffouni	MCB, Université Blida1	Examinatrice
F. M'zyene	MCB, Université Blida1	Promotrice

**Promotion 2023/2024**

## RESUME

Des nanoparticules d'hydroxyapatite (HAp) et d'hydroxyapatite/ $\beta$ -cyclodextrine:eugénol (HAp/ $\beta$ -CD:Eg) ont été préparées dans la solution modifiée de fluide corporel simulé (SBF) dans les conditions physiologiques (pH=7,4, température = 37 °C).

Le complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg a servi de matrice pour la synthèse de nanoparticules HAp/ $\beta$ -CD:Eg afin d'améliorer la nanoarchitecture de l'HAp ainsi que sa cristallinité. Les nanoparticules ont été caractérisées par spectroscopie FT-IR et microscopie électronique à balayage (MEB). Le complexe d'inclusion à base de  $\beta$ -CD et d'Eg (4-allyl-2-méthoxyphénol), principal composé actif de l'huile essentielle de clou de girofle, connu pour son large éventail d'activités biologiques, a été préparé par la méthode de pétrissage et de co-précipitation. Le complexe d'inclusion ainsi formé est caractérisé par un rapport stœchiométrique 1:1 et par une constante de formation de  $419,56 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3$ ; et analysé par FTIR et UV-Visible. Après immersion des particules d'HAp/ $\beta$ -CD:Eg dans la solution SBF, nous avons remarqué un début de nucléation favorisé par la présence de l'HAp, percevable par une croissance régulière et concentrique de particules bien structurées formant des paquets reliés les uns aux autres par des jonctions, donnant ainsi un aspect chou-fleur (cauliflower) à la morphologie ultime du système hybride.

**Mots clés :**  $\beta$ -cyclodextrine, Eugénol, Complexe d'inclusion, Hydroxyapatite, Fluide corporel simulé.

## ABSTRACT

Hydroxyapatite (HAp) and hydroxyapatite/ $\beta$ -cyclodextrin:eugenol (HAp/ $\beta$ -CD:Eg) nanoparticles were successfully prepared in the modified simulated body fluid (SBF) solution at the physiological conditions (pH 7.4, temperature = 37 °C).  $\beta$ -CD:Eg inclusion complexes acted as templates for the synthesis of HAp/ $\beta$ -CD:Eg nanoparticles to improve the nanoarchitecture of HAp and its crystallinity. The nanoparticles were characterized by FT-IR spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Kneading and coprecipitation methods were applied to prepare the inclusion complex involving  $\beta$ -CD and Eg (4-allyl-2-méthoxyphénol), main active compound of the essential oil of clove, known for its wide range of biological activities. The 1:1 stoichiometric ratio of the formed inclusion complex was characterized by a formation constant of  $419,56 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  and analyzed by FTIR, and UV–Vis. After immersion of the HAp/ $\beta$ -CD:Eg particles in the SBF solution, we noticed an onset of nucleation promoted by the presence of HAp, perceivable by a steady and concentric growth of well-structured particles forming packets connected to each other by junctions, thus giving a cauliflower look to the ultimate morphology of the hybrid system.

**Keywords:**  $\beta$ -Cyclodextrin, Eugenol, Inclusion complex, Hydroxyapatite, Simulated body fluid

## ملخص

تم تحضير جسيمات نانوية هيدروكسي ابنتيت (HAp) و هيدروكسي ابنتيت/بيتا-سيكلوديسترين (HAp/ $\beta$ -CD :Eg) بنجاح في محلول سائل الجسم المحاكي المعدل (SBF) عند الظروف الفسيولوجية (درجة الحموضة 7.4 ، درجة الحرارة = 37 درجة مئوية). أدت الجسيمات النانوية  $\beta$ -CD :Eg دورا كقوالب لتخليق الجسيمات النانوية HAp / $\beta$ -CD وذلك لتحسين البنية النانوية لـ HAp وتبلورها. تم تحديد الجسيمات النانوية بواسطة التحليل الطيفي FT-IR ، والمسح المجهر الإلكتروني (SEM) ، كما تم استخدام طرق العجن والترسيب المتزامن لتحضير مركب التضمين والذي يحتوي على  $\beta$ -CD و 4-اللي-2-ميتوكسفينول ، المركب النشط الرئيسي للزيت الأساسي للقرنفل ، المعروف بتنوعه الواسع من الأنشطة البيولوجية. تميزت نسبة القياس المتكافئ 1 : 1 لمركب التضمين المتكون بثابت تكوين يقدر ب 419,56 مول<sup>-1</sup> دسم<sup>3</sup> وتم تحليلها بواسطة UV-Vis و FTIR

بعد غمر جزيئات HAp/ $\beta$ -CD:Eg في محلول SBF ، لا نأخذنا بداية من النويدات التي يروج لها وجود HAp ، والتي يمكن أن تتحقق من خلال نمو ابنتيت ومشارك بين جزيئات جيدة التنظيم تشكل عبات متصلة ببعضها البعض بواسطة المفراقات ، وبالتالي إعطاء نظرة قرنيبيط إلى الشكل النهائي للنظام الهجين.

الكلمات المفتاحية : بيتا-سيكلوديسترين ، 4-اللي-2-ميتوكسفينول ، مركب التضمين ، هيدروكسي ابنتيت ، سائل الجسم المحاكي.

## REMERCIEMENTS

Nous exprimons tout d'abord notre gratitude envers Allah pour nous avoir accordé la santé, la volonté, le courage et la foi nécessaires pour atteindre nos objectifs et surmonter les moments difficiles.

Nous tenons à remercier chaleureusement madame M'zyene Fatima, professeure à l'université Saad Dahleb de Blida 1, pour avoir accepté de nous encadrer, pour sa patience et sa disponibilité constante lorsque nous avons eu besoin d'elle.

Nous adressons nos remerciements sincères à tous les membres du jury qui ont honoré ce travail en le corrigeant, ainsi que pour le temps précieux qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire.

Nous souhaitons également exprimer notre reconnaissance à tous les enseignants du département de chimie, en particulier ceux de chimie analytique.

Nous exprimons notre gratitude à tout le personnel du laboratoire d'analyse du pavillon 5 de l'université de Blida1.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont apporté leur soutien, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

## DÉDICACES

Du plus profond de mon cœur, je dédie ce travail à toute ma famille en général et à mes parents en particulier.

### *À ma mère Fatí Djíbo*

Merci pour votre patience, vos prières et votre soutien moral. Sans ces éléments, je ne serais pas arrivée là où je suis aujourd'hui. Malgré la distance, vous avez toujours été présente pour moi, me remontant le moral. Merci d'être à la fois ma meilleure amie éternelle et une mère exemplaire. Qu'Allah vous récompense ici-bas et dans l'au-delà, vous accorde une longue vie et une santé robuste pour que vous puissiez bénéficier des fruits de ce travail que j'ai accompli. In sha Allah, je ferai votre fierté.

### *À mon père Kimba Seyní*

Merci papa de m'avoir éduquée de la meilleure des manières. Vous resterez toujours mon amour éternel. Qu'Allah vous récompense ici-bas et dans l'au-delà pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Qu'Allah vous accorde une longue vie et une santé robuste pour que vous puissiez bénéficier des fruits de l'éducation que vous m'avez donnée. Je ferai toujours de mon mieux pour être votre fierté.

### *À mes sœurs Yasmína, Bouchíra, Roufayatou et Nana Firdaoussou*

Je vous aime énormément et je prie Allah de nous accorder une longue vie afin que nous puissions profiter ensemble des fruits de ce travail et faire la fierté de nos parents.

### *À mon mari Alí*

Merci pour la confiance que vous avez placée en moi, pour m'avoir permis de poursuivre mes études dans un autre pays. Qu'Allah vous récompense ici-bas et dans l'au-delà. Merci également pour votre patience et votre soutien.

### *À mes amies Nana Mariama, Asmaou, Houreimatou et Síra*

Merci de m'avoir soutenue toutes ces années.

À toutes mes amies de la cité 5 et cité 7, ainsi qu'à ceux et celles que j'aime de près ou de loin, et à tous ceux qui m'ont soutenue et ont contribué à la réalisation de ce travail.



**KIMBA SEYNI FAIZATOU 2024**



## DÉDICACES

Je dédie ce travail à ma très chère famille DIALLO, Vous êtes les plus chers à mon cœur.

*À ma chère mère AMINA:*

Tu es un modèle de dévouement qui n'a cessé de m'encourager et de prier pour moi. Que Dieu, le Tout-Puissant, te préserve, t'accorde santé, longue vie et bonheur.

*À mon cher père BAKARY*

Rien au monde ne vaut les efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour moi, et je ne te remercierai jamais assez.

À mes chères sœurs et mon frère : HAWA, ROKIA, KADIDIA, MOHAMED, MOUSSA et KARIM.

À mon cher fiancé MOUSSA pour son soutien, ses encouragements et sa confiance.

À mes grands-mères, grands-pères, mes oncles, tantes et leurs enfants.

À toute ma grande famille et tous mes amis.

Sans oublier mes chères amies de la cité 05 et cité 07 qui ont partagé avec moi les moments difficiles, pour leur soutien moral et leur patience tout au long de ce travail.



*Diallo Sira 2024*



## TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b>	1
<b>REMERCIEMENTS</b>	4
<b>DEDICACES</b>	5
<b>TABLE DES MATIERES</b>	7
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX</b>	9
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES</b>	11
<b>INTRODUCTION</b>	12
<b>CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1.1. L'encapsulation	16
1.1.1 Définition	16
1.1.2 Intérêts de l'encapsulation	16
1.1.3 Procédés d'encapsulation	16
1.2. Cyclodextrines et les complexes d'inclusion	17
1.2.1 Cyclodextrines	17
a. Structure chimique des cyclodextrines	17
b. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines	19
c. Toxicité et métabolisme des cyclodextrines	21
d. Domaine d'application	22
1.2.2 Les complexes d'inclusion	23
a. Définition	23
b. Mécanisme de formation	23
c. Facteurs influençant le procédé d'inclusion	25
d. Forces stabilisantes les complexes d'inclusions	26
e. Préparation des complexes d'inclusion	27
f. Caractérisation des complexes	28
1.3. Huile essentielle de clou de girofle	29
1.3.1 Composition chimique	29
1.3.2 L'eugénol	29
1.3.3 Complexation des huiles essentielles	30
1.4. Hydroxyapatite	31
1.4.1 Généralités	31

1.4.2	Domaines d'application (HAp)	32
1.4.3	Les nanoparticules d'hydroxyapatite	35
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>		
2.1.	Produits et Matériel	37
2.2.	Synthèse du complexe d'inclusion $\beta$ -cyclodextrine : Eugénol ( $\beta$ -CD : Eg)	38
2.2.1.	Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue	38
2.2.2.	Détermination de la constante de formation par UV-Visible	38
2.2.3.	Préparation du complexe d'inclusion $\beta$ -CD : Eg	39
2.2.4	Caractérisation physico-chimique du complexe d'inclusion	40
2.3.	Préparation des nanoparticules d'HAp chargées de l'Eg sous forme d'un complexe $\beta$ -CD : Eg	40
2.3.1.	Préparation de fluide corporel simulé (SBF)	40
2.3.2.	Préparation biomimétique des nanoparticules HAp et HAp/ $\beta$ -CD : Eg	41
2.3.3.	Comportement de l'HAp et de l'HAp/ $\beta$ -CD : Eg dans un bio-fluide (Test de bioactivité)	43
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION</b>		
4.1.	Synthèse du complexe d'inclusion $\beta$ -cyclodextrine : Eugénol ( $\beta$ -CD : Eg)	44
4.1.1.	Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue	44
4.1.2.	Détermination de la constante de formation Kf	44
4.1.3.	Analyse par spectroscopie infrarouge FTIR	47
4.2.	Biominéralisation des particules composites	51
4.2.1.	Analyse par FTIR	51
4.2.2.	Analyse morphologique	52
<b>CONCLUSION</b>		54
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE</b>		55

## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Structure chimique des Cyclodextrines. (A) Unités glucose, (B) Représentation des faces primaire et secondaire	18
Figure 1.2	Structure développée des trois principales CDs	18
Figure 1.3	Liaisons hydrogènes intramoléculaires au sein d'une $\beta$ -CD	21
Figure 1.4	Effet des cyclodextrines sur les membranes biologiques et libération de l'invité	22
Figure 1.5	Domaine d'application des CDs	23
Figure 1.6	Mécanisme de formation du complexe d'inclusion	24
Figure 1.7	Représentation schématique de la formation des complexes d'inclusion de stœchiométries différentes.	25
Figure 1.8	Eugénol : (a) structure chimique, (b) aspect physique	30
Figure 1.9	Implants dentaires	34
Figure 1.10	joint artificiel	34
Figure 1.11	Mise en place d'une cale en Hydroxyapatite	35
Figure 2.1	Protocole expérimental suivi pour la détermination de la stœchiométrie par UV-Vis	37
Figure 2.2	Protocole expérimental suivi pour la détermination de la constante de formation par UV-Vis	37
Figure 3.1	Courbes de Job du système $\beta$ -CD:Eg	43
Figure 3.2	Spectres d'absorption de solutions d'Eg dans l'éthanol (10 $\mu$ M) contenant différentes concentrations de $\beta$ -CD (0-100 $\mu$ M).	44
Figure 3.3	Image du complexe d'inclusion $\beta$ -CD:Eg : (a) Eugénol (Eg) ; (b) $\beta$ -Cyclodextrine ( $\beta$ -CD) ; (c) complexe	45

	d'inclusion $\beta$ -CD:Eg.	
Figure 3.4	Diagramme de la double réciproque de Benesi-Hildebrand de l'absorbance de la Eg en fonction de $1/[\beta\text{-CD}]$ .	46
Figure 3.5	Spectre FTIR du complexe d'inclusion synthétisé par co-précipitation et par pétrissage.	46
Figure 3.6	Spectres IR : (a) complexe d'inclusion de $\beta$ -CD:Eg; (b) $\beta$ -CD; (c) Eg	49
Figure 3.7	Spectres FT-IR des particules HAp et HAp/ $\beta$ -CD :Eg synthétisées dans la solution SBF modifiée, dans les conditions biomimétiques (température 37 °C ; pH 7,4)	50
Figure 3.8	Images MEB des particules d'HAp/ $\beta$ -CD:Eg, réalisées dans les conditions biomimétiques, après immersion dans la solution SBF : 3 jours (a) ; 6 jours (b) ; 9 jours (c) et (d)	51
Schéma 2.1	Organigramme pour la synthèse biomimétique des nanoparticules HAp et HAp/ $\beta$ -CD :Eg dans une solution SBF modifiée, à 37 °C et pH 7,4	41
Tableau 1.1	Propriétés physico-chimiques des principales Cyclodextrines	20
Tableau 1.2	propriétés de l'hydroxyapatite	33
Tableau 2.1	Réactifs pour la préparation de la solution SBF.	39
Tableau 3.1	Nombres d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ ) et attributions des bandes observées dans les spectres FTIR de l'Eg, de la $\beta$ -CD et de leur complexe d'inclusion $\beta$ -CD:Eg	47

## LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

ABS	Absorbance
$\beta$ -CD	Beta-cyclodextrine
CI	Complexe d'inclusion
CD/CDs	Cyclodextrine
Eg	Eugénol
FT-IR	Infra-rouge a transformé de fourrier
HAp	Hydroxyapatite
HE	Huile Essentielle
Kf	Constante de formation
MEB	Microscope électronique à balayage
SBF	Simulated Body Fluid
VDW	Van Der Waals
R	Proportion molaire de la molécule invitée

## INTRODUCTION

Les nanoparticules (NP) ont suscité un intérêt particulier dans diverse domaines en tant que nouveaux systèmes de délivrance de molécules actives. De tels vecteurs nanométriques présentent plusieurs facettes vis-à-vis de la molécule transportée [1-3]: (1) sa solubilisation dans les milieux Physiologique, (2) sa protection contre la dégradation, (3) l'amélioration de sa diffusion à travers l'épithélium, d'où sa biodisponibilité, et (4) la modification de son profil de distribution tissulaire. Le principal avantage de ces nanoparticules en tant que véhicules spécifiques de libération de molécules actives est la capacité de ciblage précis [4]. En effet, les nanoparticules ont été fabriquées à partir de plusieurs matériaux, notamment des métaux, des polymères organiques, des céramiques et des produits biologiques, avec des structures sphériques, ramifiées ou en coque.

Les nanoparticules que nous voulons concevoir sont destinées à l'encapsulation des huiles essentielles, dont l'utilisation est souvent entravée par leur dégradation et leur biodisponibilité réduite dans le corps humain. Généralement, à cause de leur faible solubilité dans l'eau, leur forte volatilité et leur sensibilité aux conditions environnementales (lumière, chaleur, oxygène) [5]. Etant très sensibles à l'oxydation, les huiles essentielles peuvent être dégradées pendant la formulation, le transport et le stockage au point qu'elles deviennent inefficaces, voire néfastes avec la formation de dérivés toxiques [6]. La nanoencapsulation de ces huiles essentielles semble être une méthode efficace pour surmonter les contraintes physico-chimiques susmentionnées, améliorant leurs activités biologiques, leurs stabilités et leurs biodisponibilités.

Pour cela le choix des matériaux s'est fait en se basant sur des critères vitaux tels que: l'absence de toxicité, la bonne biocompatibilité ainsi que d'autres propriétés bioactives. Ainsi, le vecteur doit être non toxique, protège le principe actif jusqu'à sa cible, et permet une libération adéquate. Il peut être de nature biologique (virus, bactéries, hématies, ...), particulaire (nanoparticule, liposome, ...), ou moléculaire (polymère, molécule-cage, ...). Le choix du matériau pour synthétiser les nanoparticules se fait selon les propriétés désirées et leurs domaines d'application, soit en utilisant un seul type de matériaux, soit en combinant plusieurs matériaux de la même nature ou de natures différentes (systèmes hybrides binaires, ternaires, ...), ce qui nous permet d'obtenir des nanoparticules aux propriétés extrêmement variées et/ou améliorées.

Nous avons choisi Les hydroxyapatites (HAp)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , qui sont des matériaux inorganiques très importants en biologie et en chimie, et la  $\beta$ -cyclodextrine en raison de ses caractéristiques multifonctionnelles en plus de son pouvoir complexant.

Les nanoparticules de biocéramique à base de phosphate de calcium, à savoir l'hydroxyapatite, ont été largement utilisées, en raison de leur grande bioactivité et biocompatibilité [7-9]. En effet, une excellente adhérence des nanoparticules de phosphate de calcium aux molécules d'ADN a été observée, résultant de l'affinité des ions  $\text{Ca}^{2+}$  à la surface de ces nanoparticules à former des liaisons avec les groupements phosphates hélicoïdaux des acides nucléiques. Aussi l'HAp est souvent utilisée en tant que biomatériau pour le revêtement de prothèses osseuses, car elle est ostéoconductive, biocompatible, non toxique, ne produisant aucune réponse inflammatoire, et forme une bonne adhérence avec l'os sans formation de capsule fibreuse.

La principale performance de la  $\beta$ -cyclodextrine dans diverses applications, est étroitement liée à sa capacité à former des complexes d'inclusion (CI) avec des molécules organiques (substances biologiquement et pharmaceutiquement importantes) et à fabriquer des vecteurs hôtes-invités; les molécules lipophiles peuvent être insérées dans la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -cyclodextrine, améliorant la solubilité, la stabilité (contre l'effet de la lumière, de la chaleur et de l'oxydation) et la biodisponibilité de divers molécules hydrophobes, et modifiant certaines propriétés chimiques et physiques des molécules invitées [1, 10]. De plus, ce qui fait de la  $\beta$ -cyclodextrine un bon candidat pour les systèmes de nanovectorisation spécifiques, c'est son hydrolyse et son absorption faciles dans l'estomac et sa fermentation en saccharides plus petits par la microflore intestinale.

L'utilisation de la  $\beta$ -cyclodextrine pour l'encapsulation des huiles essentielles est largement répandue [11–13].

L'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol) est un hydroxyphénylpropène aromatique extrait de l'huile essentielle de clou de girofle [14]. Le rôle de cette molécule dans la prévention et le traitement des maladies a fait l'objet d'une grande attention [15]. Elle sert d'analgésique, anti-inflammatoire, antiviral, antifongique, antiseptique, antispasmodique, antiémétique et anesthésique local, et elle est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique [16-19]. Elle a été utilisée pour le traitement des maladies gastriques, de la diarrhée chronique, de l'acné, de l'asthme, de la polyarthrite rhumatoïde et de diverses allergies [20,21]. De plus, ses propriétés

et applications antifongiques et antibactériennes ont été démontrées par la Food and Drug Administration [22,23]. L'eugénol est extrêmement utilisé dans l'industrie cosmétique, la parfumerie ainsi que l'alimentation et les arômes. L'arôme de vanille le plus exigeant est synthétisé à partir de l'eugénol [24]. L'enrobage d'amidon modifié par l'eugénol est souvent utilisé pour l'emballage antioxydant de la viande et du poisson [25,26].

Cependant, sa faible solubilité dans l'eau, sa volatilité et sa thermolabilité limitent ses applications et sa biodisponibilité. De plus, l'Eg s'oxyde, se décompose ou s'évapore facilement lorsqu'il est exposé à l'air, à la lumière ou à la chaleur. Inclure cette substance dans des molécules hôtes appropriées, c'est-à-dire la nanoencapsulation assure la protection, la stabilité, la conservation et la libération contrôlée de ce composé [27]. L'inclusion de l'eugénol dans le  $\beta$ -CD favorise sa solubilité dans l'eau, sa biodisponibilité et augmente sa stabilité moléculaire [28-30]. Plusieurs études expérimentales ont rapporté la formation de complexes d'inclusion de l'eugénol avec des agents encapsulants, comme la  $\beta$ -cyclodextrine, pour réduire les effets indésirables (irritation localisée de la peau et dermatite allergique de contact), augmenter sa solubilité aqueuse et prolonger son activité biologique.

Dans cette étude, un complexe d'inclusion à base de  $\beta$ -CD et le composant principal de l'huile essentielle de clou de girofle, en l'occurrence l'eugénol a été préparé par la méthode de co-précipitation et de pétrissage. Ce complexe a été analysé par FTIR et UV-Vis.

L'encapsulation de l'eugénol dans la  $\beta$ -CD fut la première étape de notre travail, ensuite nous avons procédé à la préparation de nanoparticules à base d'HAp, et d'un système binaire 'HAp/ $\beta$ -CD' dans un milieu biomimétique (liquide corporel simulé, SBF) dans des conditions physiologiques, soit une température de 37 °C et un pH de 7,4. D'autre part, nous avons consacré une partie de ce travail à l'étude du comportement des particules d'HAp, et d 'HAp/ $\beta$ -CD:Eg' qui ont été préparées dans un fluide biomimétique ayant une composition similaire à la composition du plasma sanguin, dont le but est le développement de nouveaux biomatériaux de substitution osseuse et vecteurs de molécules actives.

Le bio-nanomatériau hybride HAp/ $\beta$ -CD devrait être doté de certaines propriétés spécifiques à la libération de l'eugénol, à savoir: (a) une biocompatibilité, (b) une protection contre la décomposition enzymatique, (c) une diminution de perte de médicament pendant le transport, (d) une moindre toxicité, (e) grande efficacité thérapeutique, et (f) une stabilité photochimique et thermique. Mais surtout et en raison de l'existence de l'entité

hydroxyapatite dans sa composition il sera capable d'acheminer des molécules bioactives vers les tissus osseux spécifiquement d'une part, et peut être utilisé comme matériaux de substitution osseux destinés à faciliter la réossification d'un défaut ne pouvant se cicatriser sans apport extérieur lors d'une perte osseuse.

Le but principal de ce travail est de combiner des molécules aux propriétés intéressantes, pour la conception d'un nano-vecteur aux propriétés améliorées, grâce à la synergie engendrée par des perturbations mutuelles, pour l'encapsulation des huiles essentielles ainsi que d'autres composés organiques intéressants, dont l'intérêt est mis à profit dans divers domaines surtout le secteur pharmaceutique et médical.

Ce manuscrit débute avec une introduction globale sur le sujet, et s'articule en trois parties :

- La première partie appelée étude bibliographique, expose et clarifie toutes les notions et propriétés chimiques des éléments entrepris dans ce travail.
- La deuxième partie, matériel et méthodes, détaillera le volet expérimental de ce travail.
- La troisième partie, nommée résultats et discussion, est consacrée à l'exhibition de tous les résultats de synthèses et de caractérisations avec les méthodes analytiques spectroscopiques, et bien sûr, tous les résultats de ce travail sont ainsi discutés dans ce même chapitre.

Enfin, la conclusion de ce manuscrit a pour objectif de tirer un bilan de cette étude et propose des ouvertures quant à la poursuite du projet.

# CHAPITRE 1

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. L'encapsulation

#### 1.1.1 Définition

L'encapsulation est un procédé qui consiste à piéger une substance ou un mélange de substances à l'intérieur de matériaux adaptés pour isoler la substance encapsulée de son milieu extérieur et la protéger de la dégradation ou l'inhibition de son activité jusqu'à ce qu'elle atteigne son milieu cible [31]. L'encapsulation joue un rôle très important dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, agro-alimentaires, industries chimiques, nutraceutiques, agriculture et textile du fait que les matériaux protègent les composés sensibles de l'humidité, la chaleur ou des conditions extrêmes, améliorant aussi leur stabilité et leur viabilité.

#### 1.1.2 Intérêts de l'encapsulation

L'encapsulation peut protéger la molécule invitée contre l'oxydation ou les dommages causés par la chaleur. Elles peuvent aussi jouer le rôle de transporteurs dans des formulations pharmaceutiques. Elles peuvent augmenter la capacité d'encapsulation de la molécule invitée, améliorer la stabilité du médicament et réguler efficacement le taux de libération du médicament. Elles sont largement appliquées dans les formulations pharmaceutiques pour améliorer la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité des médicaments. Les CD sont également utilisés pour améliorer le goût et la saveur des boissons, pour dissoudre les parfums et supprimer leur volatilité ou pour protéger les composés instables lorsqu'ils sont exposés à la lumière ou à l'oxygène. La grande importance des CD dans les applications industrielles et la recherche réside principalement dans leur capacité à former sélectivement des complexes d'inclusions avec d'autres substances [32,33].

#### 1.1.3 Procédés d'encapsulation

Le choix d'une technique d'encapsulation se fera en fonction de la nature du principe actif à encapsuler, de ses propriétés physique et chimique et du matériau de paroi, de la taille des particules souhaitée, de l'application envisagée (pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire), etc. [34]. La vitesse et les conditions de libération prévues, des rendements

d'encapsulation nécessaires et des contraintes de fabrication et de coût. Les principales méthodes d'encapsulation sont : coacervation, polymérisation in situ.

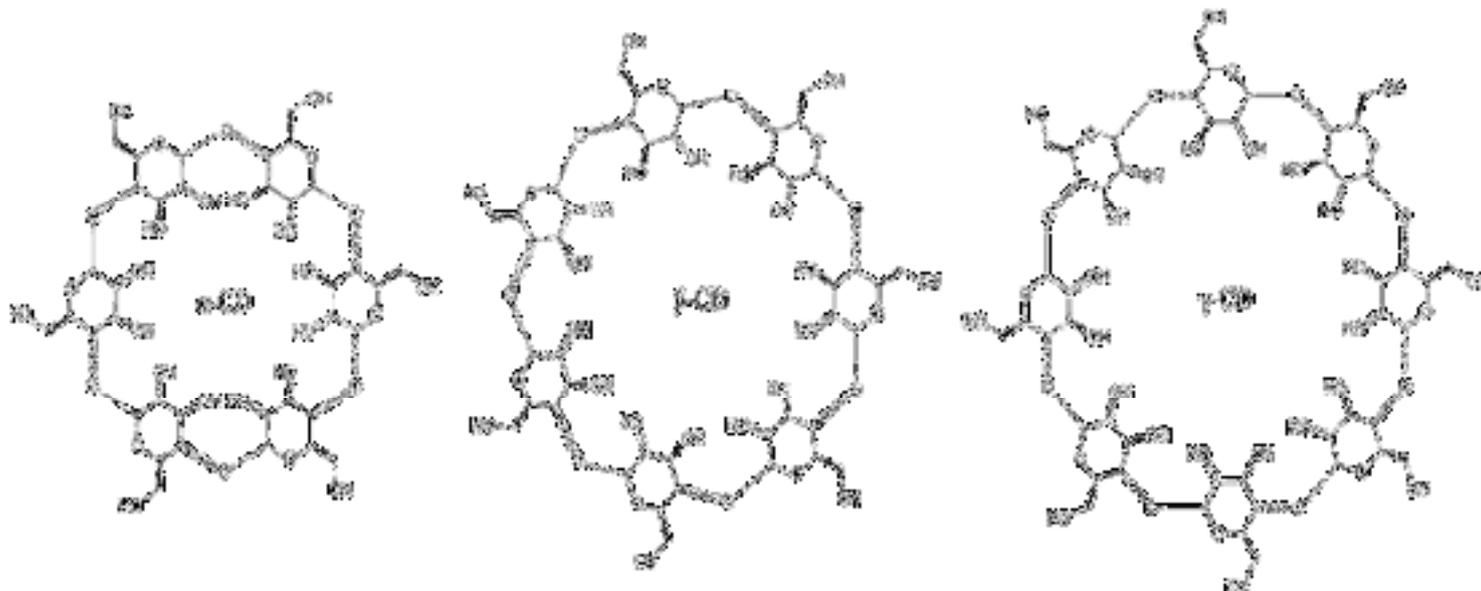
## **1.2. Cyclodextrines et les complexes d'inclusion**

### **1.2.1 Cyclodextrines**

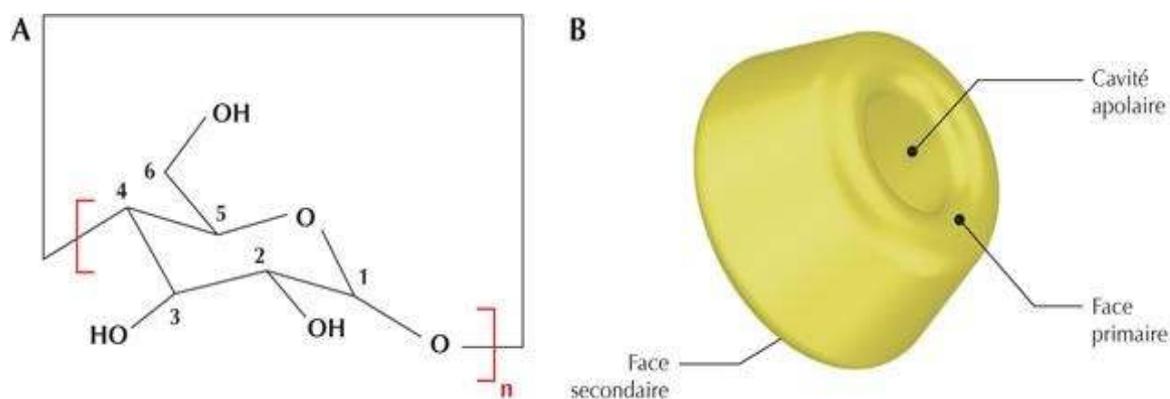
Les cyclodextrines sont très utilisées dans l'industrie pharmaceutique, surtout dans le domaine de la délivrance des médicaments, en raison de leur capacité de complexation. Les caractéristiques principales qui ont rendu la cyclodextrine une molécule très convoitée par les scientifiques, consiste à améliorer la solubilité, la stabilité, ainsi que la protection et la biodisponibilité des molécules médicamenteuses. La vectorisation par la  $\beta$ -cyclodextrine a résolu beaucoup de problèmes associés à la délivrance des médicaments hydrophobes par des voies différentes vers des sites spécifiques.

#### **a. Structure chimique des cyclodextrines**

Les CD sont une famille d'oligosaccharides cycliques avec une surface externe hydrophile et une cavité centrale lipophile. Les molécules de cyclodextrine sont relativement grandes avec un certain nombre de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène, par conséquent, elles ne pénètrent pas dans les membranes lipophiles. Les cyclodextrines proviennent de la dégradation enzymatique suivie d'une transglycosylation intramoléculaire de l'amidon sous l'action de la CGTase [35]. Les CD naturelles les plus rencontrées renferment 6, 7 et 8 unités glycosidiques (**Figure 1.1A**) en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et sont désignées  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD, respectivement (**Figure 1.2**). Cet arrangement est à l'origine de la forme d'un cylindre conique des CD.



**Figure 1.1.** Structure chimique des Cyclodextrines. (A) Unités glucose, (B) Représentation des faces primaire et secondaire.



**Figure 1.2.** Structure développée des trois principales CDs.

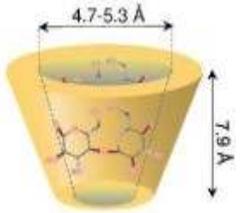
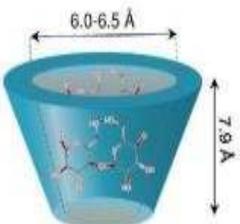
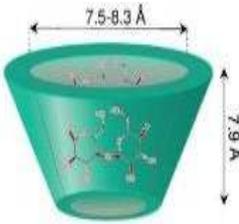
La partie extérieure des cyclodextrines (surface de contact avec le solvant) est hautement hydrophile à cause des groupements hydroxyles qui se trouvent sur sa surface. Sur le côté large du cône se trouvent les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 d'où l'appellation face secondaire (**Figure 1.1B**), alors que sur le côté étroit on trouve les hydroxyles primaires (d'où l'appellation face primaire) portés par le carbone C6, qui ont plus tôt une libre rotation par rapport aux hydroxyles secondaires, ce qui fait diminuer le diamètre effective de ce côté. Quant à la partie intérieure, cette dernière est tapissée par des atomes de carbone et d'hydrogène, les hydrogènes étant portés par les carbones C3 et C5. On trouve aussi les atomes d'oxygène impliqués dans la liaison glycosidiques, cela confère à la cavité un caractère hydrophobe apolaire [36,37].

## **b. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines**

Les principales caractéristiques physicochimiques de ces trois CD sont regroupées dans le **Tableau 1.1**.

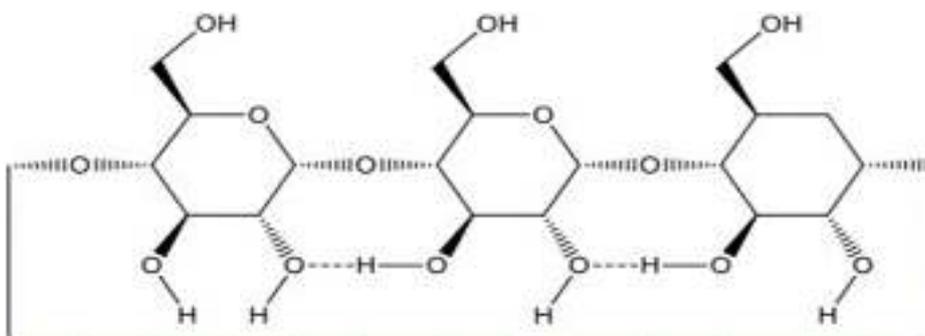
Les CD sont des molécules cristallines, homogènes et non hygroscopiques, et se trouvent sous forme hydratée à l'état solide. Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glycopyranoses alors que la hauteur est la même pour les trois CD. Par contre, la solubilité de ces trois cyclodextrines est indépendante des paramètres géométriques, la  $\beta$ -CD étant la moins soluble. Ceci s'explique par la rigidité de la structure due à la présence d'une ceinture complète de sept liaisons hydrogènes au niveau de la couronne secondaire. Ces liaisons hydrogènes mettent en jeu un groupe hydroxyle d'une unité glucose (OH2) avec un autre groupe hydroxyle (OH3) de l'unité adjacente. L' $\alpha$ -CD et la  $\gamma$ -CD plus flexibles et ayant des unités glucose inclinées, ne contiennent pas cette ceinture continue de liaisons hydrogène des hydroxyles secondaires (OH2 et OH3). Elles favorisent donc les liaisons hydrogènes avec le solvant augmentant ainsi leur solubilité aqueuse.

**Tableau 1.1** : Propriétés physico-chimiques des principales Cyclodextrines [38].

Type	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Structure			
Nombre de D- glucoses	6	7	8
Formule brute (anhydre)	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
Carbones asymétriques	30	35	40
Masse atomique (anhydre)	972,85	1134,99	1297,14
Longueur de la cavité (Å)	7,9 ±0,1	7,9 ±0,1	7,9 ±0,1
Diamètre de la cavité (Å)	4,7-5,3	6,0-6,6	7,5-8,4
Diamètre extérieur (Å)	14,6±0,4	15,6±0,4	17±0,4
Volume de la cavité (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
pKa, 25°C	2,33	12,20	12,08
Solubilité (eau, 25°C) mol.l <sup>-1</sup>	0,1211	0,0163	0,168
Solubilité (eau, 25°C) g/l	14,5	1,85	23,2
Point de fusion (°C)	275	280	275

Plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer sa solubilité dont la plus importante est la modification chimique par greffage de groupements la transformant en dérivés plus solubles [39-41]. Néanmoins, la  $\beta$ -CD reste la molécule la plus intéressante et la plus utilisée pour la complexation, d'ailleurs elle représente plus de 95% de la production totale des cyclodextrines [42].

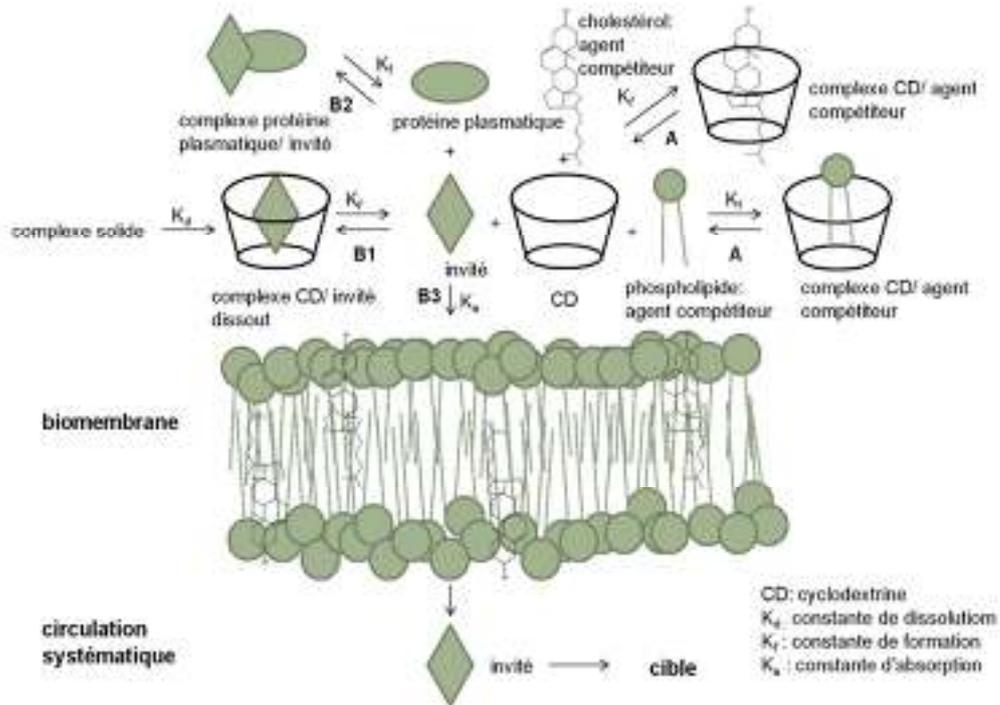
La structure des CD et l'orientation particulière des diverses fonctions hydroxyles des unités glycopyranose, leur confèrent un caractère amphiphile caractéristique qui leur permet de jouer le rôle de molécules hôtes et d'inclure dans leur cavité des invités hydrophobes pour former des complexes d'inclusion.



**Figure 1.3.** Liaisons hydrogènes intramoléculaires au sein d'une  $\beta$ -CD.

### c. Toxicité et métabolisme des cyclodextrines

Les CD s'hydrolysent dans l'organisme humain en libérant du glucose, en plus son absorption par le tractus humain est négligeable et se dégrade immédiatement par le biais des bactéries qui colonisent le colon [43], ce qui induit qu'elles sont dépourvues de toute toxicité. Des études faites ont démontré que la toxicité, *in vivo*, reste négligeable, parce que les CD perdent absolument leur capacité à interagir avec les constituants membranaires quand leur cavité est occupée [44-47].



**Figure 1.4.** Effet des cyclodextrines sur les membranes biologiques et libération de l'invité. **A** : extraction du cholestérol et des phospholipides par les cyclodextrines ; **B1** : libération de l'invité par la cyclodextrine, **B2** : liaisons aux protéines plasmatiques, **B3** : absorption par les tissus.

La cytotoxicité induite par les CD (à fortes concentrations) est due à l'extraction des composants vitaux (cholestérol et phospholipides) et à la perméabilisation membranaire indépendamment du type cellulaire (**Figure 1.4**).

Toutefois ces composés peuvent causer quelque désagrément non dangereux, par exemple, la  $\beta$ -CD peut provoquer des diarrhées quand elle est administrée en forte concentration. Aussi, sa faible solubilité ( $1,85 \text{ mg mL}^{-1}$ ) peut provoquer une néphrotoxicité due à sa cristallisation quand elle est administrée par voie parentérale. Un autre problème fréquent est l'interaction des CD avec les molécules du cholestérol, qui cause leur extraction des tissus rénaux [48].

#### **d. Domaine d'application**

Elle est utilisée dans divers domaines : pharmaceutique, dépollution de l'eau ou de l'air, cosmétique ou agroalimentaire...

## 1.2.2 Les complexes d'inclusion

### a. Définition

Un complexe d'inclusion est une association d'au moins deux molécules, dont l'une, le substrat ou « molécule invitée » est encapsulée totalement ou partiellement (suivant sa taille) par l'autre appelée le récepteur ou « molécule hôte », sous l'effet d'interactions faibles.

La molécule hôte est capable d'inclure la molécule invitée dans sa cavité, ce qui résulte en une encapsulation stable sans formation de liaison covalente ce qui permet une dissociation aisée et douce du complexe formé [49].

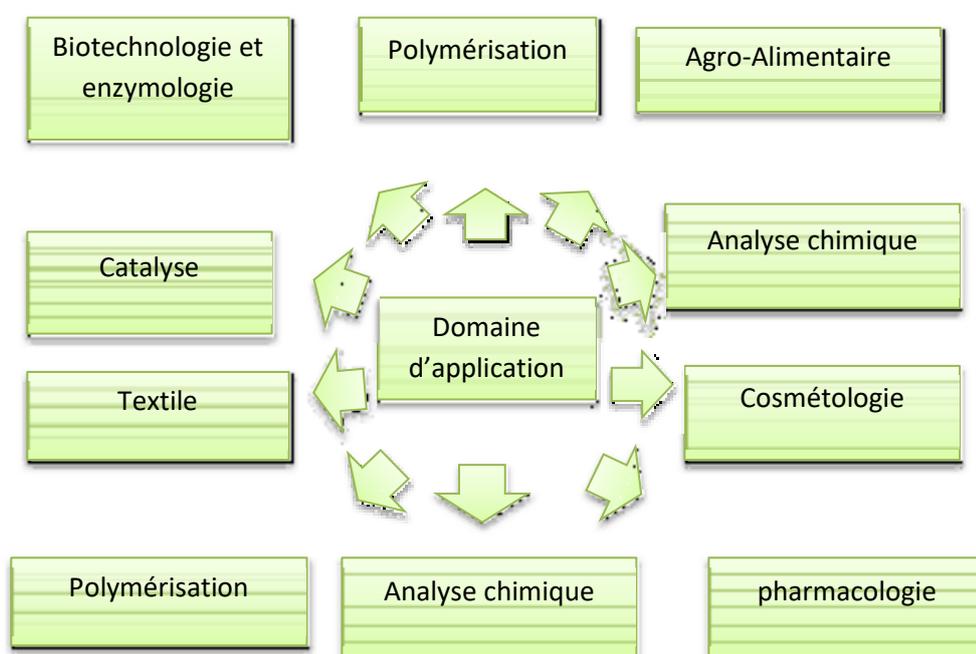


Figure 1.5. Domaine d'application des CDs.

### b. Mécanisme de formation

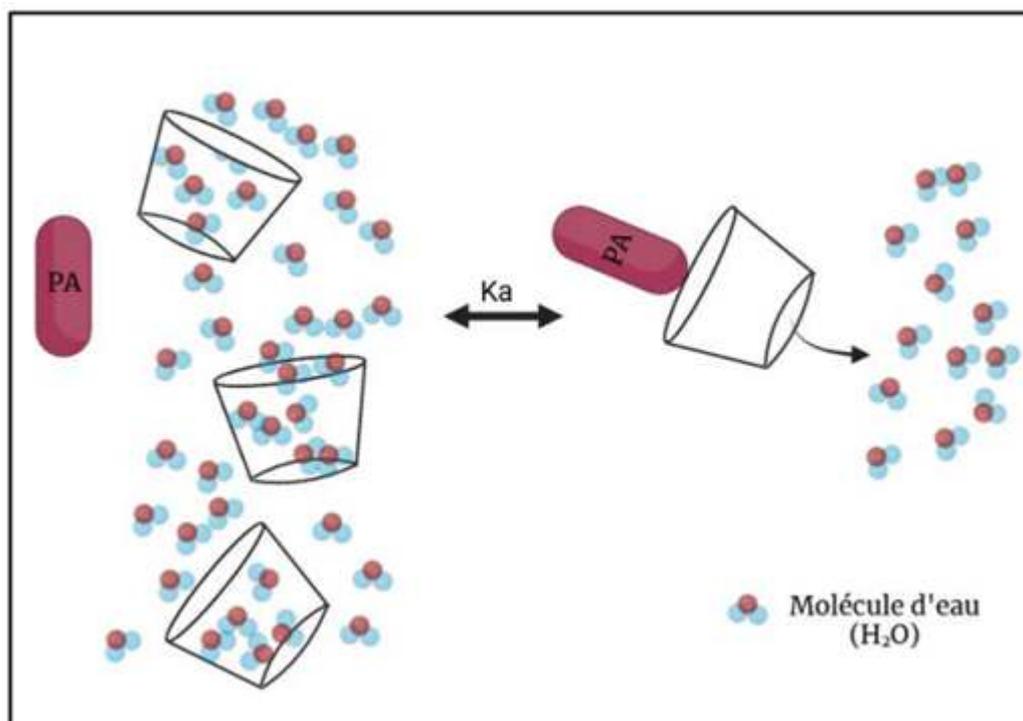
Compte tenu du rôle essentiel joué par l'eau, le mécanisme d'inclusion peut être divisé en plusieurs étapes (Figure 1.6):

- ✓ Rapprochement entre l'hôte et l'invité ;
- ✓ Elimination du solvant au sein de la cavité impliquant ainsi l'expulsion de molécules d'eau ;
- ✓ Libération de l'eau autour de l'invité et transfert de molécules d'eau vers le reste de la solution ;

- ✓ Interactions entre les substituants de l'invité et les groupements fonctionnels de la CD en bordure ou à l'intérieur de la cavité (interactions de Van der Waals);
- ✓ Formalisation possible de liaisons hydrogène entre l'invité et la CD;
- ✓ Restructuration de l'eau autour des parties de l'invité exposées au solvant après son inclusion.

Ce processus est très rapide, mais la vitesse de formation du complexe ainsi que sa stabilité dépendent néanmoins de la géométrie des molécules impliquées ; en effet, la première étape, la quatrième ainsi que la cinquième peuvent être retardées par des gênes stériques.

La compatibilité géométrique entre la CD et la molécule invitée s'avère primordiale pour le mécanisme de formation du complexe d'inclusion. En effet, des invités de taille importante ne peuvent s'insérer dans la cavité centrale, même de façon partielle, ils ne peuvent pas former des complexes d'inclusion stables. Il en est de même pour les invités de petite taille qui pourront s'insérer dans la cavité parce que les CDs ne pourront pas les maintenir dedans du fait des faibles interactions formées entre eux.

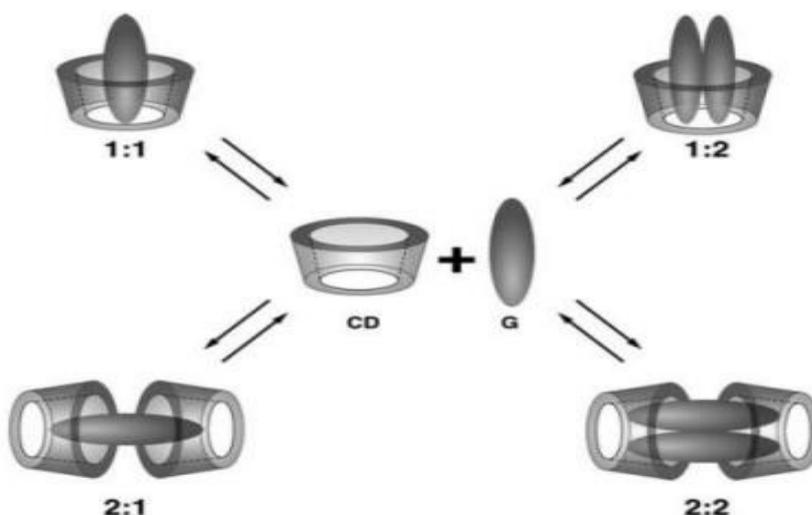


**Figure 1.6.** Mécanisme de formation du complexe d'inclusion.

La stœchiométrie des complexes obtenus dépend de la taille et de la géométrie de la molécule invitée. Si la molécule est de petite taille, la  $\beta$ -CD peut encapsuler plus de deux invités, des rapports (molécules :  $\beta$ -CD) de 2:1, 3:1 ... sont ainsi obtenus. Par contre, si la

molécule invitée est de grande taille, plusieurs  $\beta$ -CD interviennent dans la complexation de cette dernière avec des rapports (molécules :  $\beta$ -CD) de 1:2, 1:3,... Enfin, le cas le plus fréquent est le complexe de stœchiométrie 1:1 obtenu par l'interaction d'une molécule invitée avec une molécule de  $\beta$ -CD (Figure 1.7).

Enfin la complexation peut se faire en solution ou à l'état solide par un simple contact des deux molécules 'host-guest', seulement les techniques et les conditions diffèrent selon le besoin.



**Figure 1.7.** Représentation schématique de la formation des complexes d'inclusion de stœchiométries différentes.

### **c. Facteurs influençant le procédé d'inclusion**

#### **➤ Taille de la cavité**

Le type de la CD peut influencer la formation, la nature et la stabilité des complexes des CDs. Pour la complexation, la taille de la cavité des CDs est un facteur à prendre en considération avant d'entamer la réaction de complexation. La taille des trois types de CD diffère [50].

#### **➤ Influence du PH**

Le pH des solutions influence considérablement la nature (neutre ou ionisée) des molécules ionisables (selon leur constante d'acidité pKa). Pour la plupart des molécules, la

forme ionisée de la molécule invitée à une interaction plus faible au CD comparé aux molécules non ionisées ou neutres particulièrement si la CD est neutre.

➤ ***Influence de la température***

Évidemment, la variation de la température peut affecter le procédé de complexation. Dans la plupart des cas, l'augmentation de la température, diminue la constante apparente de stabilité du complexe formé. L'effet a été expliqué par la réduction possible des forces d'interaction internes.

**d. Forces stabilisantes les complexes d'inclusions :**

Le phénomène d'inclusion-complexation ne fait intervenir aucune liaison covalente, mais uniquement des forces telles que les liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, ce qui permet ainsi à la molécule invitée, d'ouvrir la voie à de multiples applications.

Plusieurs contributions énergétiques ont été mises en évidence pour expliquer les interactions mises en jeu lors de la formation de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines.

➤ ***Interactions de Van der Waals***

Les forces de Van der Waals (VDW), du nom du Hollandais Johannes Diederik Van der Waals, (1837 -1923), prix Nobel de physique 1910, sont des forces électromagnétiques résiduelles faibles, d'origine quantique, s'exerçant entre des molécules et même des atomes neutres. En fait, il s'agit de la combinaison de trois types de forces distinctes résultant de différents effets :

- ✓ Force de Keesom (effets d'orientation) ;
- ✓ Force de Debye (effets d'induction) ;
- ✓ Force de London (effets de dispersion).

➤ ***Formation des liaisons hydrogène***

Parmi les molécules polaires, celles qui comportent des atomes d'hydrogène présentent parfois des interactions plus fortes que celles des forces de Van der Waals. L'atome d'hydrogène « fait le pont » entre deux atomes ou plus alors qu'il n'a qu'un électron.

Cette liaison hydrogène n'est donc pas une liaison ordinaire. Elle ne se manifeste qu'avec des atomes très électronégatifs. Une liaison hydrogène peut s'établir entre un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome A très électronégatif (F, O, N) et un atome B très électronégatif porteur d'un doublet non liant. La longueur de la liaison hydrogène est de 200 pm (picomètre) environ.

➤ ***Energie de transfert de charge***

Lorsque deux molécules interagissent, une faible quantité d'électrons circulent de l'une vers l'autre. Par exemple, dans l'équilibre géométrique d'un dimère linéaire de molécules d'eau HO-H...OH<sub>2</sub>, la molécule d'eau accepteuse de protons a transféré environ 0.05N à la molécule d'eau donneuse de protons. L'énergie attractive associée à ce transfert de charge est appelée énergie de transfert de charge. C'est l'action simultanée de plusieurs de ces interactions qui rend effective l'inclusion spécifique, les phénomènes de reconnaissances moléculaires étant dus à la coopération de multiples interactions faibles.

**e. Préparation des complexes d'inclusion :**

Il existe diverses techniques de préparation des complexes d'inclusion. La méthode de préparation doit être choisie selon les applications envisagées car elle influence sur les caractéristiques physicochimiques et la dissolution du complexe. La préparation peut s'effectuer en milieu liquide ou solide en allant de simples méthodes de laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle.

Elle consiste généralement à dissoudre la CD en présence de l'invité puis laisser un équilibre s'établir. Le complexe sera par la suite récupéré sous forme solide. Les méthodes souvent utilisées sont les suivantes [51]:

- ✓ Inclusion par cristallisation de la solution (co-précipitation)
- ✓ Inclusion par co-mélange (co-grinding)
- ✓ Inclusion en suspension (slurry)
- ✓ Inclusion par pétrissage (paste/kneading)
- ✓ Inclusion en méthode humide (damp)
- ✓ Inclusion par extrusion
- ✓ Inclusion à sec
- ✓ Inclusion par neutralisation
- ✓ Inclusion par co-évaporation

- ✓ Séchage par atomisation/ pulvérisation (spray drying)
- ✓ Séchage par lyophilisation (freeze drying)
- ✓ Inclusion au CO2 supercritique
- ✓ Inclusion par microondes

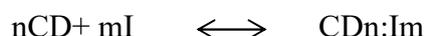
#### f. Caractérisation des complexes

L'étude des complexes d'inclusion s'appuie sur différentes étapes. La première étape est la détermination de la stœchiométrie du système formé. Après avoir défini la stœchiométrie du complexe, il faut étudier la constante d'association et les paramètres thermodynamiques qui reflètent la stabilité et les différentes forces d'interactions intervenantes durant l'inclusion.

##### ➤ *Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue*

La méthode de job ou la méthode de variation continue est une méthode de titration simple et largement utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion de CDs.

Supposant que la formation du complexe implique n molécules de CD et m molécules à inclure (I), ceci sera décrit par :



[CD]<sup>+</sup> [I]: Constant

R : [I] / ([I] + [CD]) est la proportion molaire de la molécule invitée

En UV-Vis, la détermination de la stœchiométrie se fait par l'enregistrement d'une série de spectres d'absorption de l'invité, vu que les CDs ne présentent pas de chromophore, puis on suit la variation des spectres qui doivent se déplacer en présence de CD. La stœchiométrie d'un système est obtenue en rapportant  $\Delta\text{ABS} \times R$  en fonction du R. En générale, le tracé de job ou la courbe obtenue est sous forme d'une cloche qui passe par un maximum.

##### ➤ *Détermination des constantes d'association et les paramètres thermodynamiques par UV-Visible*

L'UV-visible est utilisée pour déterminer la stœchiométrie du complexe  $\beta$ -cyclodextrine:Eugenol, et sa constante de formation  $K_f$  en utilisant la méthode de la double réciproque se basant sur l'équation de Benesi–Hildebrand:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{\varepsilon[\text{Eg}]_0 K_f [\beta - \text{CD}]^n} + \frac{1}{\xi[\text{Eg}]_0} \quad \text{Eq 3. 1}$$

Où :

A : Absorbance de la solution de l'Eg à chaque concentration de la  $\beta$ -CD.

[Eg]<sub>0</sub> : Concentration initiale de la solution d'Eg.

[ $\beta$ -CD] : Concentration de la  $\beta$ -cyclodextrine.

$K_f$  : Constante de formation apparente.

n : Taux d'inclusion

$\varepsilon$  : Coefficient d'absorption du system supramoléculaire  $\beta$ -CD : Eg.

La valeur de n est le taux d'inclusion lorsque la courbe est une ligne droite et la valeur de  $K_f$  est la valeur de l'interception par rapport à la pente.

### 1.3. Huile essentielle de clou de girofle :

#### 1.3.1 Composition chimique :

L'étude de la composition chimique d'huile essentielle de clou de girofle a permis de déterminer les éléments chimiques naturels qui la constituent, elle est dominée par l'eugénol (pouvant atteindre 82,27% du produit). L'acétate d'eugényle fait également partie des composants de l'huile essentielle de girofle avec un taux de 12,7% ainsi que la bêta-caryophyllène (3,99%) et l'alpha-humulène (0,48%).

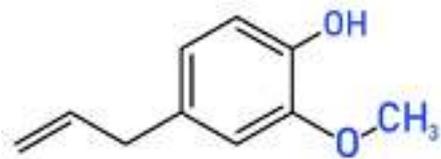
Une autre étude a montré aussi qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines bio-synthétiques distinctes [52]:

- ✓ Le groupe des terpénoïdes constitué exclusivement de mono et sesquiterpènes et leurs produits d'oxydation.
- ✓ Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquents.

#### 1.3.2 L'eugénol

Eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol) (**Figure 1.8**) est un hydroxyphénylpropène aromatique et est extrait de l'huile de clou de girofle. Il sert d'analgésique, anti-inflammatoire, antiviral, antifongique, antiseptique, antispasmodique, antiémétique et anesthésique local, et il est largement utilisé dans les industries pharmaceutiques. L'eugénol a également été utilisé pour le traitement des maladies gastriques, de la diarrhée chronique, de l'acné, de l'asthme, de la polyarthrite rhumatoïde et de diverses allergies. Il démontre également un effet timicrobien et antioxydant propriétés dans plusieurs rapports. L'eugénol est extrêmement utilisé dans les

industries des cosmétiques, de la parfumerie ainsi que de l'alimentation et des arômes. L'arôme de vanille le plus exigeant est synthétisé à partir de l'eugénol. L'amidon modifié à l'eugénol est souvent utilisé pour l'emballage antioxydant de la viande et du poisson [53-55].



(a)



(b)

**Figure 1.8.** Eugénol : (a) structure chimique, (b) aspect physique

### 1.3.3 Complexation des huiles essentielles

Les cyclodextrines ont la capacité de former des complexes d'inclusion avec des molécules hydrophobes telles que les huiles essentielles, les huiles végétales, etc. le but de cette union supramoléculaire est :

➤ ***Augmentation de la solubilité***

Les HEs et leurs composants sont utilisés dans diverses industries. Ils souffrent cependant d'une faible solubilité aqueuse. Les complexes d'inclusion de CDs permettent d'augmenter leur solubilité et leur vitesse de dissolution et donc leur biodisponibilité. De plus, la complexation permet de diminuer la volatilité ainsi que la tendance à l'agrégation de ces molécules lipophiles.

➤ ***Augmentation de la stabilité***

Les composants des HE sont connus pour être très sensibles à la lumière, l'air, la température et au pH. Les CDs permettent d'augmenter la stabilité de l'invité piégé vis-à-vis de l'hydrolyse, l'oxydation, les réarrangements stériques, l'isomérisation, la racémisation, la polymérisation et même la décomposition enzymatique. L'encapsulation ralentit voire supprime la réactivité de l'invité.

➤ **Réduction de la volatilité**

La complexation par les CDs en solution ou à l'état solide permet de réduire la volatilité des huiles essentielles, limitant ainsi les pertes par évaporation. Il a été démontré que l'encapsulation diminuait la volatilité du linalol et de l'acétate de benzyle.

➤ **Diminution des effets indésirables**

Le principal effet secondaire des HE est l'irritation des muqueuses et de la peau. L'augmentation de la biodisponibilité comme nous avons déjà évoqué précédemment permet de réduire les doses et ainsi que les effets indésirables.

De plus, la dissolution rapide qu'offrent les complexes de CD évite le contact direct de l'invité avec la muqueuse gastrique et l'agrégation des molécules lipophiles ce qui diminue par conséquent l'irritation de la muqueuse gastrique.

➤ **Transformation d'un liquide en poudre**

Après complexation et séchage, la poudre obtenue est facile à manier et présente l'avantage de conserver les HE sous forme solide.

➤ **L'amélioration des activités biologiques**

L'encapsulation moléculaire avec les CDs pourraient répondre à un objectif fondamental de l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de ces molécules tout en les protégeant et diminuant leurs effets indésirables.

➤ **Libération contrôlée**

Divers CDs et polymères de CD ont ainsi été utilisés pour permettre la libération prolongée d'huiles essentielles et d'arômes. Cette propriété peut être intéressante pour la réalisation de désodorisants ou pour l'aromathérapie. La libération des composés peut être modulée en fonction de la température ou de l'humidité.

## **1.4 HYDROXYAPATITE**

### **1.4.1 Généralités**

L'os est un composite multiphase, dont les principaux constituants sont la matrice de collagène osseux et l'hydroxyapatite assemblée  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  comme principal constituant inorganique [56]. L'HAp synthétique est largement utilisé dans diverses applications

biomédicales sous forme de nanopoudres, films, échafaudages et revêtements [57]. Les espèces chimiques constituant l'HAp sont : Ca, P, O et H, qui sont acceptées comme éléments non toxiques. L'hydroxyapatite est un matériau inorganique très important en biologie et en chimie [58]. Elle représente une famille de minéraux isomorphes appelés les apatites. Elle est présente dans la nature principalement comme fluoro-apatite. Les HAp biologiques les plus fréquentes sont les phosphates de calcium cristallins [59], premier constituant minéral des os, de l'émail dentaire et de la dentine. Ils sont très modulables en termes de composition et morphologie. Les apatites biologiques sont non stœchiométriques et ont une taille nanométrique dans l'os et la dentine et une taille micrométrique dans l'émail [60]. Les HAp synthétiques sont souvent utilisées en tant que biomatériaux pour le revêtement de prothèses osseuses et comme DDS.

Plusieurs études ont montré que l'HAp poreuse est osteoconductive, biocompatible, non-toxique, ne produisant aucune réponse inflammatoire, et forme une bonne adhérence - avec l'os sans formation de capsule fibreuse. Elle se résorbe avec le temps mais sa dégradation est très lente [61, 62].

Les propriétés chimiques de sa surface à l'échelle nanométrique (par exemple : groupes fonctionnels à la surface, distribution de charge), et sa structure morphologique (par exemple taille de grain, forme, distribution, rugosité) détermine le type de son interaction avec l'environnement biologique (protéines, molécules de la matrice extracellulaire, et les cellules) [63,64].

La préparation des poudres d'HAp avec des caractéristiques bien précises (morphologie, stœchiométrie, cristallinité et distribution de taille des cristaux) est importante dans la biomédecine et la science des matériaux.

#### **1.4.2 Domaines d'application(HAp)**

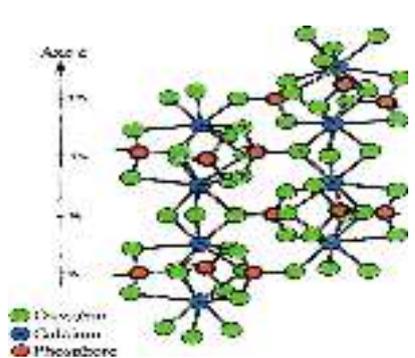
Les utilisations de l'hydroxyapatite varient dans plusieurs domaines en fonction de leur importance.

##### **➤ Applications médicales**

Comme évoqué précédemment, les HAp en tant que constituant minéral principal des os et de l'émail dentaire, possèdent de très bonnes propriétés de biocompatibilité et notamment des propriétés d'adsorption spécifique des cellules ou de protéines. Elles sont donc utilisées

fréquemment dans le domaine de la médecine et de la pharmacie. Les HAp servent par exemple de matériaux de substitution pour le remplacement ou la régénération de tissus malades ou endommagés.

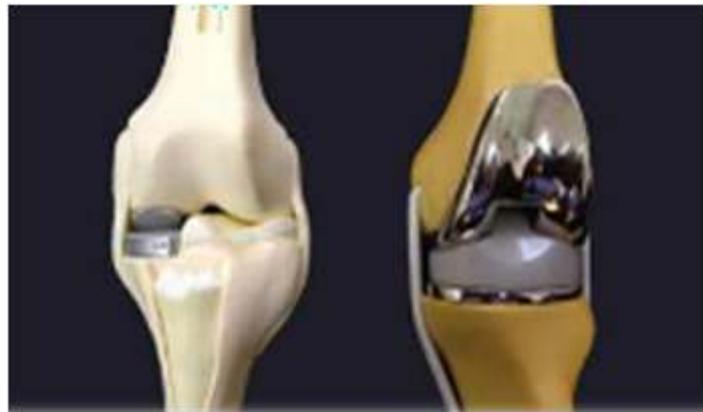
**Tableau 1.2.** Propriétés de l'hydroxyapatite[65].

<b>Aspect physique</b>	Poudre blanche, fine et poussiéreuse
<b>Densité</b>	3,156 g/cm <sup>3</sup>
$pK_s$ à $T=25^\circ\text{C}$ et $pZ_f=5-7$	Entre 115 et 117
<b>Solubilité</b>	Dans l'acide nitrique
<b>Dureté (échelle de Mohs)</b>	5
<b>Indice de réfraction</b>	$n_o=1,633-1,667$ $n_e=1,630-1,664$
<b>Structure cristalline</b>	Hexagonal, groupe spatial P63/m, paramètres de maille a — 9,37Å et c — 6,88Å  
<b>Propriétés biologique</b>	Biocompatible, osteoconductible et bioactive

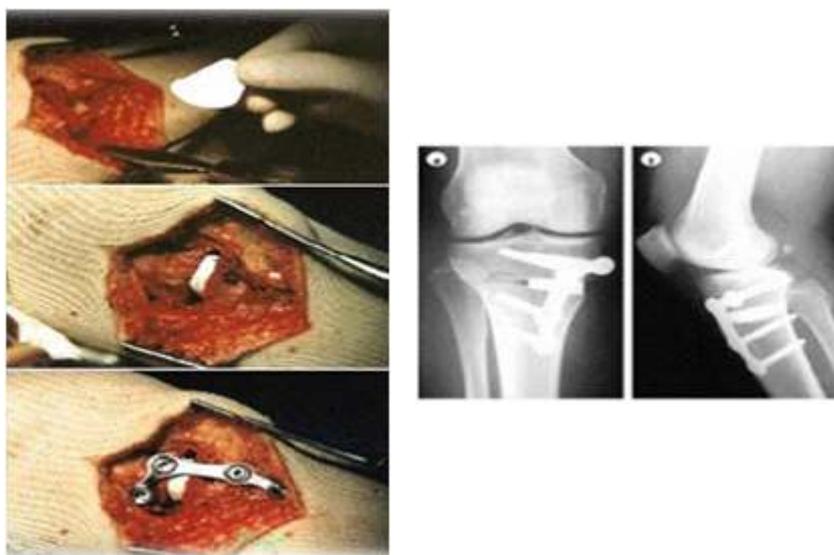


**Figure 1.9.** Implants dentaires.

Enfin, il peut être indiqué dans une tumeur osseuse, ou une partie de l'os doit être enlevé, tels que le remplissage de joints artificiels avec une couche d'Hydroxyapatite à utiliser comme alternative artificiel.



**Figure 1.10.** Joint artificiel.



**Figure 1.11.** Mise en place d'une cale en Hydroxyapatite.

### ➤ **Application industrielle**

L'hydroxyapatite synthétique est également utilisée couramment comme phase stationnaire dans les colonnes chromatographiques pour la séparation de diverses molécules.

Dans le domaine de la catalyse hétérogène, l'hydroxyapatite joue aussi un rôle important comme support catalytique en synthèse organique [66,67] ou en catalyse asymétrique pour l'obtention de composés énantiomères purs [68]. Elle est également utilisée comme catalyseur dans l'industrie des polymères pour la déshydrogénation et la déshydratation des alcools primaires, ainsi que dans l'industrie des sucres.

Les apatites sont aussi utilisées comme additifs potentiels pour le traitement des sols pollués [69,70] et comme matériaux de remblayage entrant dans la composition des barrières construites pour le confinement des déchets radioactifs [71].

#### **1.4.3 Les nanoparticules d'hydroxyapatite**

La synthèse à l'état solide met en jeu des poudres de réactifs tels que  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}(\text{s})$  avec  $\text{Ca}(\text{OH})_2(\text{s})$  dont le mélange est ensuite chauffé à très haute température, de 300 à 1200°C.

Comparativement à la préparation par voie humide, la synthèse par voie sèche a le grand avantage d'atteindre une composition stœchiométrique mais son coût reste élevé eu égard aux températures élevées.

On distingue aussi la synthèse mécano-chimique dont le principe consiste en la perturbation par pression des espèces liées en surface pour accroître les réactions thermodynamiques et cinétiques entre les solides.

Autre voie plus récente (voie biomimétique) s'inspirant des conditions in-situ est utilisée pour reproduire les phosphate de calcium (HAp) ayant des propriétés proches de l'os naturel [72].

## PARTIE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1. Produits et Matériel :

La  $\beta$ -cyclodextrine ( $C_{42}H_{70}O_{35}$ ), Le nitrate de calcium tétrahydraté  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  a été acheté auprès de Sigma-Aldrich. Le chlorure de sodium  $NaCl$  (99,5%), l'hydrogénocarbonate de sodium  $NaHCO_3$  (99,5%), le chlorure de potassium ( $KCl$ ) (99,0%), l'hydrogénophosphate de sodium dihydraté ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) (99,5%), le chlorure de magnésium hexahydraté  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (99,0%), le sulfate de sodium  $Na_2SO_4$ , le tris(hydroxyméthyl) aminométhane  $(CH_2OH)_3CNH_2$  (99,5%), le chlorure de sodium dihydraté  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (99,0 %) et l'acide chlorhydrique  $HCl$  (37 % en volume) ont été fournis par Merck. L'eugénol a été fourni par le laboratoire LCSN-BioM.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de type THERMOSCIENTIFIQUE. Les caractéristiques morphologiques et microstructurales des produits en poudre ont été étudiées par microscopie électronique à balayage (MEB) (QUANTA 650 FEI couplé avec BRUKER XFlash 6/10). Les analyses UV-visible (UV-Vis) ont été effectuées à l'aide du spectrophotomètre RAYLEIGH UV-2601.

#### 2.2. Synthèse du complexe d'inclusion $\beta$ -cyclodextrine :Eugénol ( $\beta$ -CD :Eg)

##### 2.2.1. Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue

La méthode de job ou la méthode de variation continue [73, 74] a été employée afin de déterminer la stœchiométrie du complexe étudié  $\beta$ -CD:Eg. Dans notre travail la propriété physico-chimique suivie est l'absorbance (ABS) en UV-Visible. Nous avons préparé dans l'éthanol une série de mélange  $\beta$ -CD/Eg de concentration différentes, tout en gardant  $[Eg] + [\beta\text{-CD}] = \text{constante} = 50\mu\text{M}$ . L'absorbance a été enregistrée pour chacune de ces solutions à température ambiante (**Figure 2.1**). La stœchiométrie du système est obtenue en rapportant  $\Delta\text{ABS} \times R$  en fonction du R.

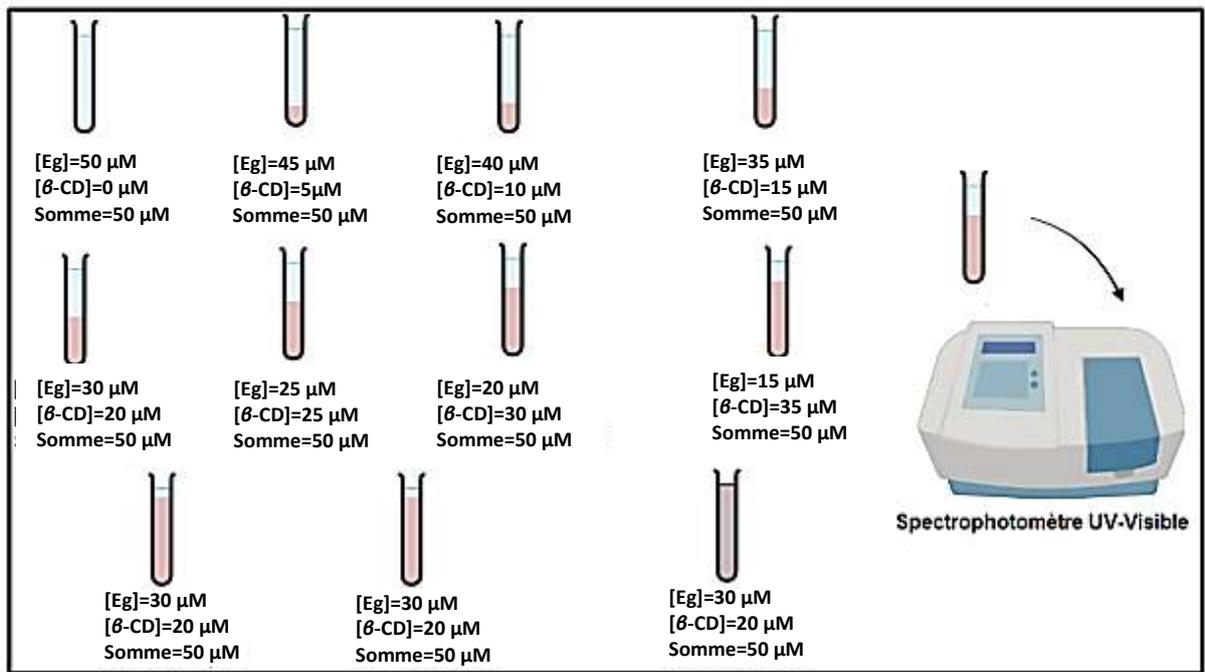


Figure 2.1. Protocole expérimental suivi pour la détermination de la stœchiométrie par UV-Vis.

2.2.2. Détermination de la constante de formation par UV-Visible

Pour déterminer la constante d'association nous avons réalisé une série de mélange, Eugénol+β-cyclodextrine, où l'Eg (molécule titrée) est maintenue à une concentration fixe de 10 μM dans l'éthanol alors que la β-CD (molécule titrante) est ajoutée à des concentrations croissantes 0-100 μM dans l'eau distillé.

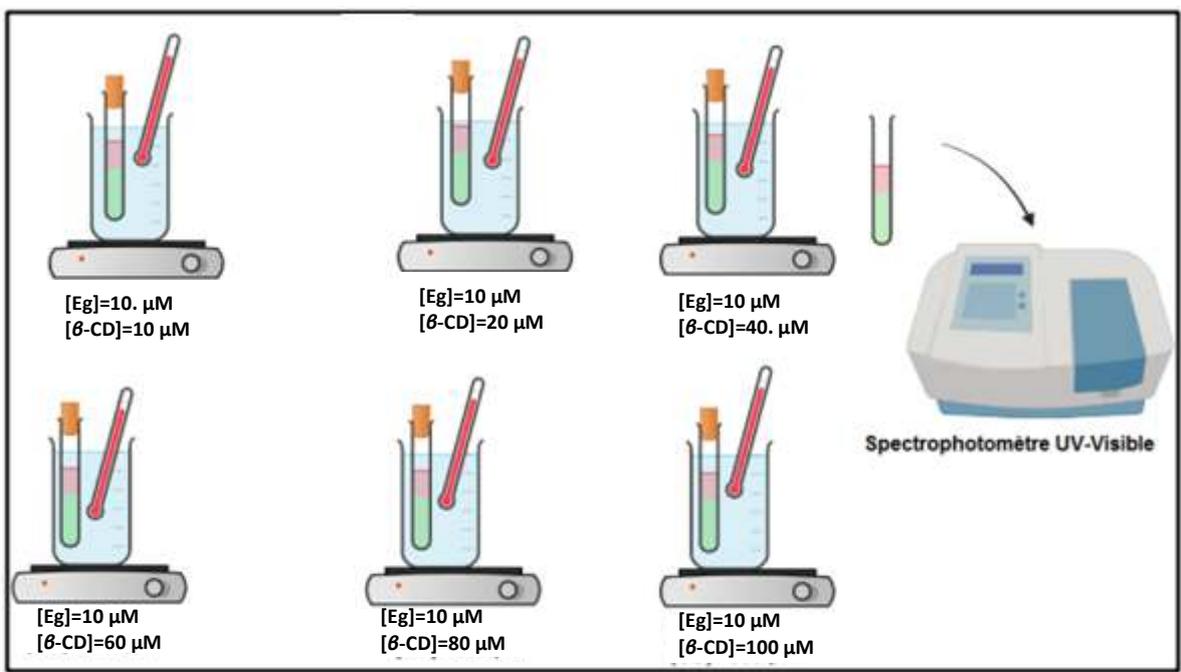


Figure 2.2. Protocole expérimental suivi pour la détermination de la constante de formation par UV-Vis.

Nous avons utilisé la spectroscopie UV-Visible pour déterminer la constante de formation (Kf) [75-77]. L'absorbance de chaque solution a été mesurée (**Figure 2.2**).

### **2.2.3. Préparation du complexe d'inclusion $\beta$ -CD:Eg**

La préparation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg est basée sur les résultats obtenus dans la partie de la méthode de variation continue, et Benesi-Hildebrand suggérant un rapport molaire  $\beta$ -CD:Eg de 1:1.

#### **➤ Inclusion par co-précipitation (ethanol-water system method)**

Une solution éthanolique de Eg est ajoutée goutte à goutte à une solution aqueuse de  $\beta$ -cyclodextrine, préalablement chauffée à 50 °C dans un rapport molaire de 1:1. Le mélange est agité pendant 1 h, puis refroidi à température ambiante, le complexe ainsi formé est laissé précipiter au repos pendant toute la nuit.

Après filtration, le précipité est lavé deux fois avec de l'eau distillée et séché à 40 °C pendant 3 jours, finalement, est stocké dans un dessiccateur couvert avec du papier aluminium pour éviter la pénétration de la lumière.

#### **➤ Inclusion par co-mélange ou méthode de pétrissage (kneading method)**

Un mélange de Eg et de  $\beta$ -CD dans un rapport molaire de 1:1 est humidifié avec de l'eau-éthanol (1:1 v/v) (agent de diffusion favorisant l'interaction de l'Eg avec la  $\beta$ -CD) et malaxé dans un mortier en agate pendant 30 minutes. Ensuite, le mélange est séché à 40 °C pendant plus 24 h. Le complexe obtenu est broyé et stocké comme indiqué ci-dessus.

### **2.2.4. Caractérisation physico-chimique du complexe d'inclusion**

#### **➤ La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)**

La spectroscopie FTIR est utilisée pour évaluer la formation du complexe d'inclusion de l'Eg avec la  $\beta$ -CD par les deux méthodes à l'aide d'un spectromètre (THERMOSCIENTIFIQUE) équipé avec un accessoire ATR (réflexion totale atténuée) dans un intervalle de fréquence entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ .

## **2.3. Préparation des nanoparticules d'HAp chargées de l'Eg sous forme d'un complexe $\beta$ -CD:Eg**

### **2.3.1. Préparation de fluide corporel simulé (SBF)**

La solution SBF (Simulated Body Fluid) ou Kokubo [78-80] est préparée comme indiqué dans le **Tableau 2.1** [81] et utilisée pour la préparation des nanoparticules d’HAp, et HAp/ $\beta$ -CD:Eg.

**Tableau 2.1.** Réactifs pour la préparation de la solution SBF.

Réactifs	SBF (g/L)
NaCl	7,996
NaHCO <sub>3</sub>	0,350
KCl	0,224
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,228
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305
1 M HCl	40 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,278
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,057

La solution SBF est préparée en dissolvant des quantités des produits chimiques indiqués dans le **Tableau 2.1** dans de l'eau désionisée. Les produits chimiques sont ajoutés dans l'ordre indiqué dans le tableau, un à la fois et après sa dissolution complète dans 700 mL d'eau.

Une quantité de 15 mL de solution de HCl (1M) est ajoutée à la solution précédente (les composants indiqués dans le **Tableau 2.1** de 1 à 5 dans 700 ml d'eau distillée) juste avant l'ajout de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. Sinon, la solution afficherait une légère turbidité. La partie restante de la solution de HCl est utilisée pendant le titrage ultérieur. Après l'ajout du *tris*(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), la température de la solution est augmentée de la température ambiante à la température de 37°C, à ce moment la solution est titrée avec du HCl (1M) jusqu'à un pH de 7,4. Au cours du processus de titrage, la solution est diluée en continu avec des ajouts successifs d'eau déminéralisée pour rendre le volume final égal à 1L. Au total, une quantité de 39 mL de solution de 1M HCl est consommée pour les ajustements de pH lors de la préparation de 1L de la solution SBF.

Dans ce présent travail, il est observé que la solution SBF préparée pouvait être stockée dans une bouteille en polyéthylène à 5°C pendant un mois sans subir de dégradation.

### **2.3.2. Préparation biomimétique des nanoparticules HAp et HAp/ $\beta$ -CD:Eg:**

Un organigramme typique du processus de la synthèse des nanoparticules d'HAp et HAp/ $\beta$ -CD:Eg est présenté sur le **Schéma 2.1**.

Dans deux béchers, des quantités des solutions de 0,4 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et de 0,16 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (ou un mélange de 0,16 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  avec une quantité appropriée de CI de  $\beta$ -CD:Eg), quantités requises pour obtenir un rapport molaire Ca/P de 1,67 (stœchiométrie standard pour l'HAp pur), sont dissoutes dans la solution SBF. Ensuite, les synthèses des nanoparticules d'HAp et HAp/ $\beta$ -CD:Eg dans la solution SBF sont réalisées. Au cours du procédé, une solution d'hydrogénophosphate d'ammonium (ou un mélange de la solution d'hydrogénophosphate d'ammonium avec le CI  $\beta$ -CD:Eg) est ajoutée en continu à la solution du sel de nitrate de calcium tétrahydraté. Une fois formé, le précipité est laissé au repos pendant 2 h à température ambiante sous agitation magnétique, puis pendant une nuit sans agitation. L'étape suivante était la centrifugation du système, le produit ainsi récupéré est ensuite lavé avec de l'eau ultrapure et désionisée puis séché durant une nuit dans une étuve à 80 °C. Le produit ainsi séché est légèrement broyée à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate.

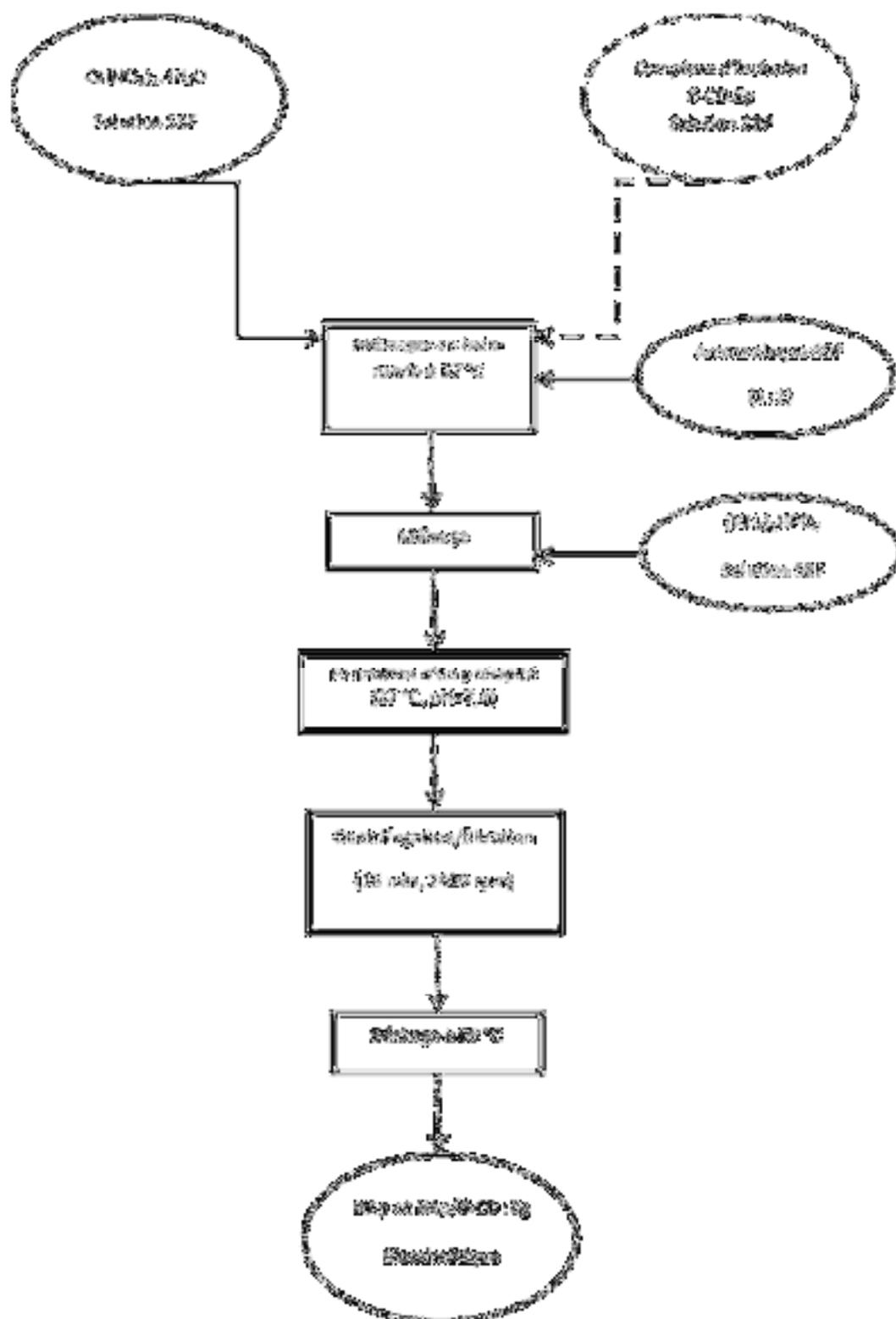


Schéma 2.1. Organigramme pour la synthèse biomimétique des nanoparticules HAp et HAp/ $\beta$ -CD:EG dans une solution SBF modifiée, à 37 °C et pH 7,4.

### **2.3.3. Comportement de l'HAp et de l'HAp/ $\beta$ -CD:Eg dans un bio-fluide (Test de bio-activité)**

L'investigation dans les solutions acellulaires avec des concentrations ioniques semblables à celles du fluide du corps permet l'étude des changements chimiques et minéralogiques de l'implant sous des conditions qui simulent les interactions physiologiques entre la surface du matériau et le site de l'implant. L'immersion de phosphate de calcium dans une solution simulant le liquide corporel (SBF) a comme conséquences des processus de dissolution et de précipitation en raison de l'instabilité structurale et biochimique du matériau. Le but de ce test est d'étudier le comportement in vitro de la poudre d'HAp et d'HAp/ $\beta$ -CD:Eg dans une solution simulant le liquide physiologique (SBF). Le test de bioactivité in vitro consiste en l'immersion de la poudre d'HAp et HAp/ $\beta$ -CD:Eg dans la solution SBF et maintenue à 37°C.

#### **➤ Procédure expérimentale**

Des échantillons de masse connue ont été placés dans des récipients en polypropylène avec 20 ml de la solution SBF préparée de la même manière décrite auparavant. Les récipients recouverts ont été portés à 37°C dans une étuve biologique (incubateur) pendant 3, 6 et 9 jours. Les échantillons ont été ensuite lavés avec de l'eau distillée et séchés à l'air libre. L'analyse morphologique a été faite par microscope électronique à balayage.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 4.1. Synthèse du complexe d'inclusion $\beta$ -cyclodextrine :Eugénol ( $\beta$ -CD :Eg)

##### 4.1.1. Détermination de la stœchiométrie par la méthode de variation continue

La courbe du système supramoléculaire  $\beta$ -CD:Eg est présentée sur la **Figure 3.1**. Un maximum à  $R=0,5$  est observé (cette condition expérimentale remplit celle recommandée dans la littérature quant à la formation d'un complexe). Donc l'Eugénol forme un complexe de stœchiométrie 1:1 avec la  $\beta$ -CD.

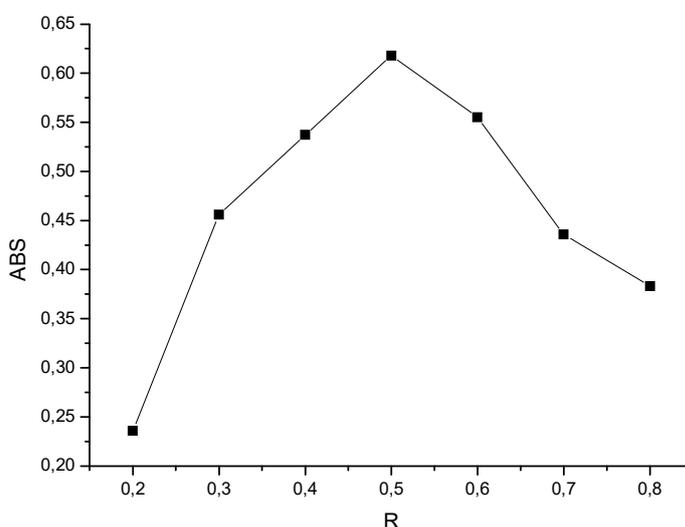
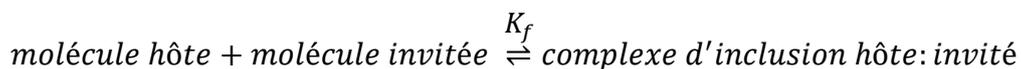


Figure 3.1. Courbes de Job du système  $\beta$ -CD:Eg.

##### 4.1.2. Détermination de la constante de formation $K_f$ :

La technique la plus adaptée pour la détermination de  $K_f$  d'un complexe d'inclusion (CI), est la méthode de titrage directe, moyennant la spectroscopie UV-visible.

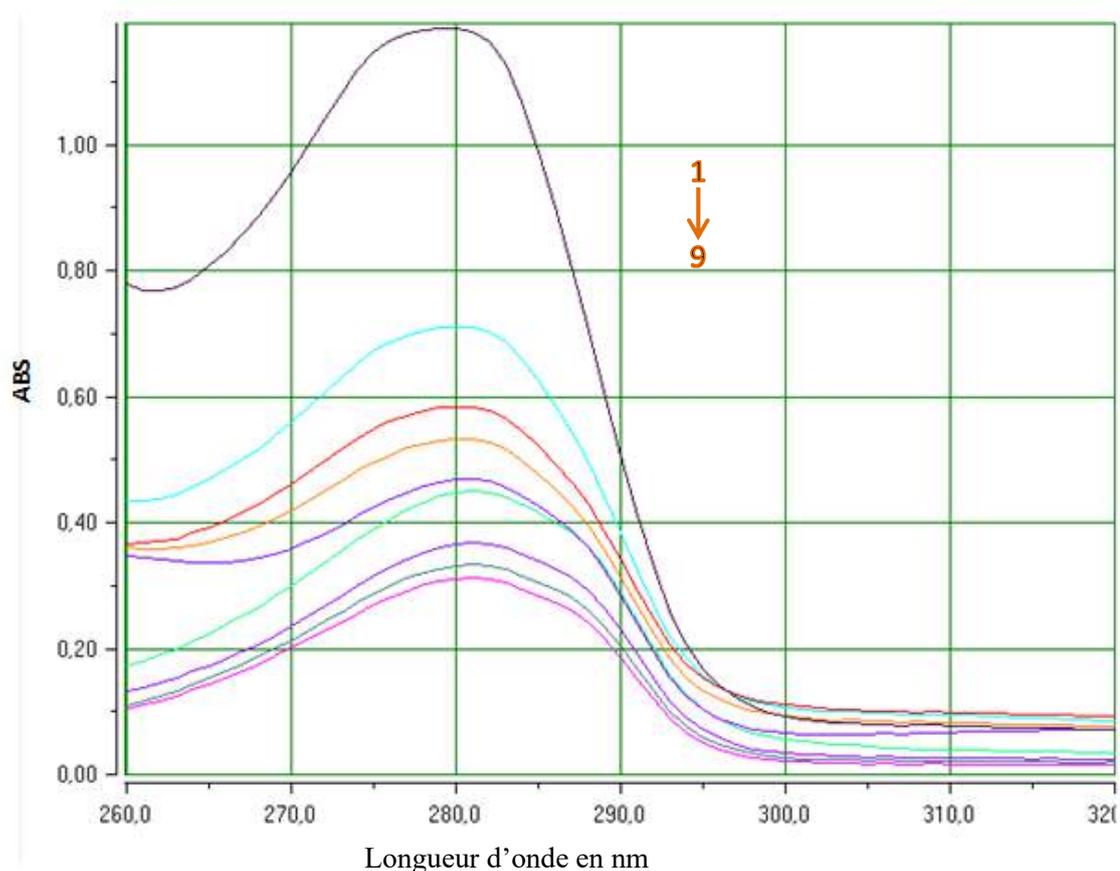


$$K_f = \frac{[CI]}{[hôte].[invité]} \quad \text{Eq 3.1}$$

Un composant du complexe (généralement la molécule hôte) est progressivement ajouté à une concentration fixe de l'autre composant du système (molécule invitée). Pendant ce temps, la variation du pic d'absorbance de l'invité est observée et enregistrée à chaque

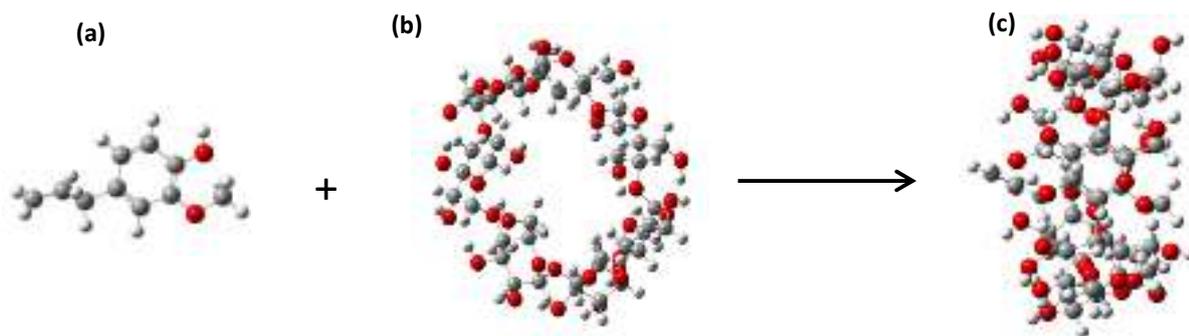
concentration. Les résultats expérimentaux obtenus (valeurs d'absorbance) sont ensuite exploités pour calculer la valeur de  $K_f$  ainsi que la stœchiométrie du système [82].

L'analyse spectrale UV-Visible nous a permis de percevoir la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg comme illustré sur la **Figure 3.2** [83-85]. Après addition progressive de  $\beta$ -Cd aux solutions de l'Eg, on peut observer une variation remarquable dans l'intensité des bandes UV ; cet écart est dû à l'inclusion de l'Eg dans la cavité non polaire de la  $\beta$ -CD, par interaction hydrophobe, suggérant fortement la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg, ce phénomène a été observé par plusieurs chercheurs [86-88].



**Figure 3.2.** Spectres d'absorption de solutions d'Eg dans l'éthanol (10  $\mu$ M) contenant différentes concentrations de  $\beta$ -CD (0-100  $\mu$ M).

Le complexe formé n'est que le résultat de l'interaction de la  $\beta$ -CD, via sa cavité hydrophobe, avec l'eugénol apolaire principalement (**Figure 3.3**). En outre, la cavité hydrophobe de la  $\beta$ -CD reste favorablement adaptée au groupement phényle de l'eugénol.



**Figure 3.3.** Image du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg : (a) Eugénol (Eg) ; (b)  $\beta$ -Cyclodextrine ( $\beta$ -CD) ; (c) complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg.

Avant de commencer la synthèse d'un complexe d'inclusion, il est essentiel de déterminer, à la fois, la stœchiométrie ( $n$ ) et la constante de formation ( $K_f$ ). Les méthodes classiques employées pour la détermination des valeurs de  $n$  et  $K_f$  sont celles de Job (méthode des variations continue) [89] ou de Benesi-Hildebrand [90].

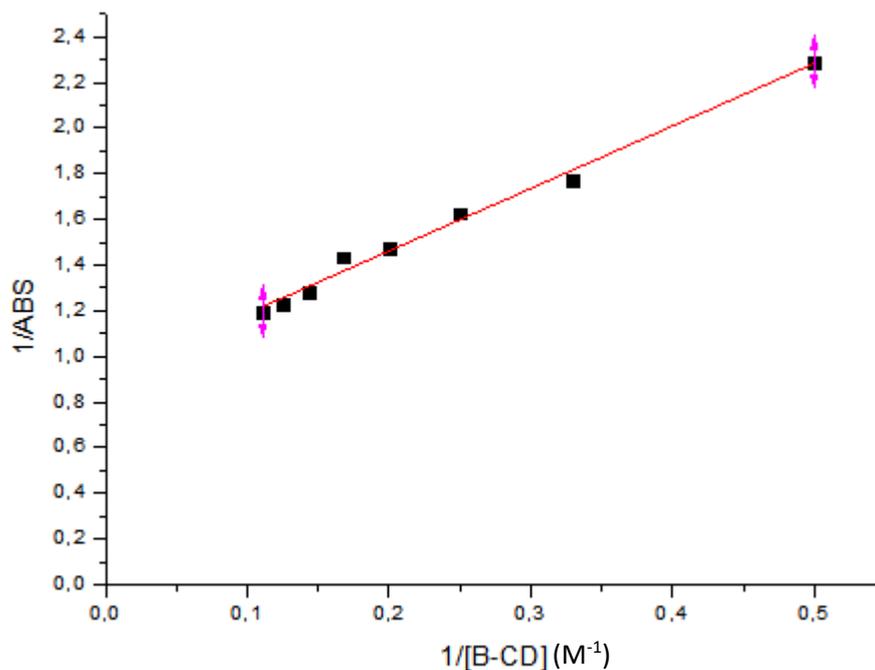
Le rapport stœchiométrique  $n$  et la valeur de  $K_f$  (constante de formation) de ce complexe d'inclusion sont déterminés en utilisant l'équation de Benesi-Hildebrand [91,76].

La valeur de  $n$  est le taux d'inclusion lorsque la courbe est une ligne droite et la valeur de  $K_f$  est la valeur de l'interception par rapport à la pente.

Le graphe linéaire de la courbe  $1/A$  vs  $1/[\beta\text{-CD}]$  montré ci-dessous dans la **Figure 3.4**, soutient fortement la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg avec une stœchiométrie de 1:1, et une constante de formation apparente  $K_f = 419,56 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . L'équilibre de la réaction est représenté par l'équilibre suivant:



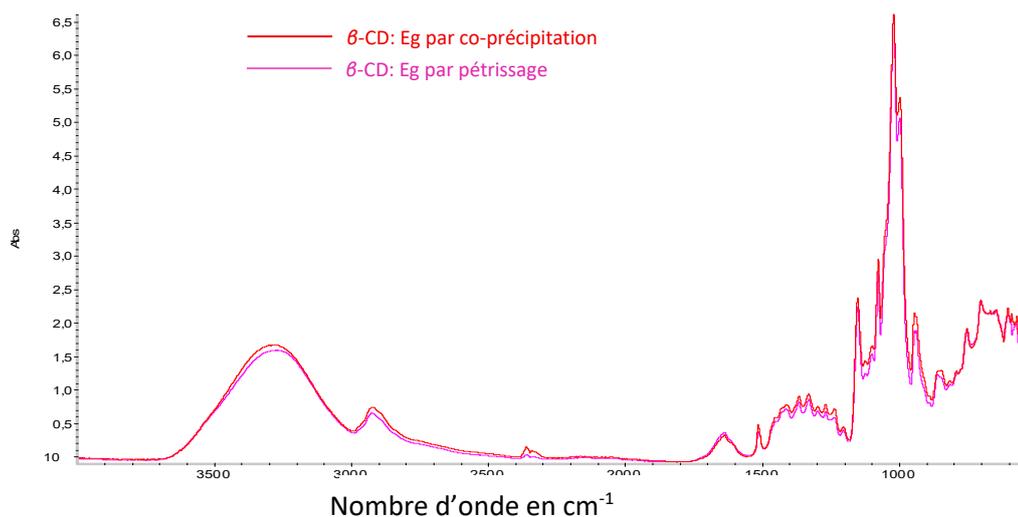
Il a été rapporté que la formation du complexe d'inclusion est un phénomène exothermique [92,93]. Cependant le calcul de la variation de l'enthalpie libre  $\Delta G$  à partir de la valeur de  $K_f$  en utilisant la relation de Gibbs,  $\Delta G = -RT \ln K_f$ , a révélé une valeur de  $-14,96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  approximativement. Cette valeur négative confirme la spontanéité de l'encapsulation et que la réaction d'inclusion est un processus exothermique.



**Figure 3.4.** Diagramme de la double réciproque de Benesi-Hildebrand de l'absorbance de la Eg en fonction de  $1/[\beta\text{-CD}](\text{mol}^{-1})$ .

#### 4.1.3. Analyse par spectroscopie infrarouge FTIR

Le complexe d'inclusion  $\beta\text{-CD}:\text{Eg}$  a été synthétisé par deux méthodes : co-précipitation (en solution) et par pétrissage (à l'état solide). L'analyse FTIR a révélé une structure identique des deux produits de synthèse préparés par deux voies différentes (**Figure 3.5**).



**Figure 3.5.** Spectre FTIR du complexe d'inclusion synthétisé par co-précipitation et par pétrissage.

L'utilisation du FTIR pour confirmer la formation du complexe d'inclusion est très fréquente, car cette méthode est simple et fiable, en général, les bandes caractéristiques de la partie incluse de la molécule invitée sont soit décalées, dissipées ou leurs intensités sont altérées (**Tableau 3.1**) [94,95].

**Tableau 3.1.** Nombres d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ ) et attributions des bandes observées dans les spectres FTIR de l'Eg, de la  $\beta$ -CD et de leur complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg [100].

Groupes fonctionnels chimiques Mode de vibration	Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	$\beta$ -CD	Eg	Eg : $\beta$ -CD
m(O-H)	3407	3513	3421
m(Ar-H) or m(C=H)	-	3078, 3008	-
Methyl and methylene m(C-H)	2925	2973, 2937, and 2960, 2842	2,925
Vinyl m(C=C)	-	1637	-
Aromatic m(C=C)	-	1612, 1513	1513
Methylene ds(C-H)	-	1463	-
Methyl ds(C-H) and das(C-H)	-	1450, 1365	-
m(C-O) and m(C-O-C)	1157, 1027	1267, 1230	1267, 1157, 1025
d(O-H), methylene ds(C-H)	1458-1338	-	1458-1338

La **Figure 3.6** montre les spectres FTIR du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg, de la  $\beta$ -CD, et de l'Eg. Le spectre du complexe est substantiellement similaire à celui de la  $\beta$ -CD (**Figure 3.6A**), révélant des changements importants (diminution de l'intensité, disparition ou déplacement) de certaines bandes liées à l'Eg, certifiant la formation du complexe. Ces changements sont dus aux modifications du microenvironnement de la molécule invitée lors de son inclusion dans la cavité hydrophobe de l'hôte (l'insertion du cycle benzénique de l'Eg dans la cavité de la  $\beta$ -CD riche en électrons induit une augmentation de la densité électronique de l'Eg) et à l'établissement des liaisons hydrogènes et des interactions de van der Waals lors de l'union de ces deux espèces en un seul dispositif supramoléculaire [96].

Le spectre de la  $\beta$ -CD (**Figure 3.6B**) révèle des bandes d'absorption caractéristiques :  $3421,27 \text{ cm}^{-1}$  (vibration d'allongement O-H),  $2923,06 \text{ cm}^{-1}$  (vibration d'allongement C-H),  $1158,04 \text{ cm}^{-1}$  (vibration d'allongement C-C) et  $1028,56 \text{ cm}^{-1}$  (vibration d'allongement C-O-C). En plus des bandes due à la déformation symétrique et asymétrique des groupes hydroxyles (-OH) primaires et secondaires dans la plage de  $3600$  à  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , spécifiquement

vers  $3384,57\text{ cm}^{-1}$ . Un déplacement de la bande d'absorbance à  $3295\text{ cm}^{-1}$  de la  $\beta$ -CD vers les faibles fréquences  $3270,10\text{ cm}^{-1}$  du complexe  $\beta$ -CD:Eg est observé (diminué de  $20\text{ cm}^{-1}$ ); ce changement d'absorption indique la libération des molécules d'eau de la cavité de la  $\beta$ -CD, la réorganisation des groupements hydroxyles ainsi que la formation de liaisons hydrogènes entre les constituants du complexe [85, 97-99].

Les pics caractéristiques de l'eugénol libre se trouvent à  $1638.09$ ,  $1612.23$  et  $1514.07\text{ cm}^{-1}$  due à l'étirement des liaisons C=C du cycle aromatique et l'étirement de la liaison C=C alcènes, respectivement. Nous remarquons aussi une série de pics entre  $720$ - $1250\text{ cm}^{-1}$  qui représente la région d'empreinte digitale de  $\nu$ C=C. De plus, pour l'eugénol, les bandes caractéristiques se situent dans les plages de  $3380$  à  $3360\text{ cm}^{-1}$  en raison de l'étirement axial du groupement (OH) [101].

Cependant, les bandes d'absorption caractéristiques de l'Eg (**Figure 3.6B**) dans le complexe sont apparues à : **(i)**  $1515,23\text{ cm}^{-1}$ , attribué aux  $\nu$ C=C du cycle aromatique de l'Eg, qui habituellement apparaît dans la région entre  $1650$  et  $1250\text{ cm}^{-1}$  correspondant à la vibration des groupes C=C et à la flexion C-H des groupes alcènes/aromatiques de l'eugénol libre, mais avec une intensité nettement plus élevée [102], **(ii)**  $1092\text{ cm}^{-1}$  et  $994\text{ cm}^{-1}$  liées à la présence d'étirements de la liaison C-O [103], **(iii)** déplacement de la bande d'étirement O-H à  $3586$ - $3319\text{ cm}^{-1}$  ou probablement sa disparition. Pourtant, la plupart des bandes d'absorption de l'Eg sont blindées par les bandes intenses de la  $\beta$ -CD. L'atténuation de l'intensité des bandes d'absorption du benzène indiquent que ce dernier est bien inclus à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -CD et peut s'expliquer par les changements dus au microenvironnement de la cavité de la  $\beta$ -CD, suite à la formation d'interactions électrostatiques (liaisons hydrogène et/ou forces hydrophobes); ces interactions sont responsables de la formation de ce complexe d'inclusion et de sa stabilité. Ces résultats indiquent tous que l'Eg est encapsulé dans la cavité hydrophobe du  $\beta$ -CD.

Plusieurs auteurs ont rapporté des variations similaires de fréquence et des changements d'intensité des signaux des bandes d'absorption, soulignant la formation du complexe d'inclusion à base de cyclodextrines [104,105].

Par conséquent, les spectres FTIR ont fortement confirmé la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg.

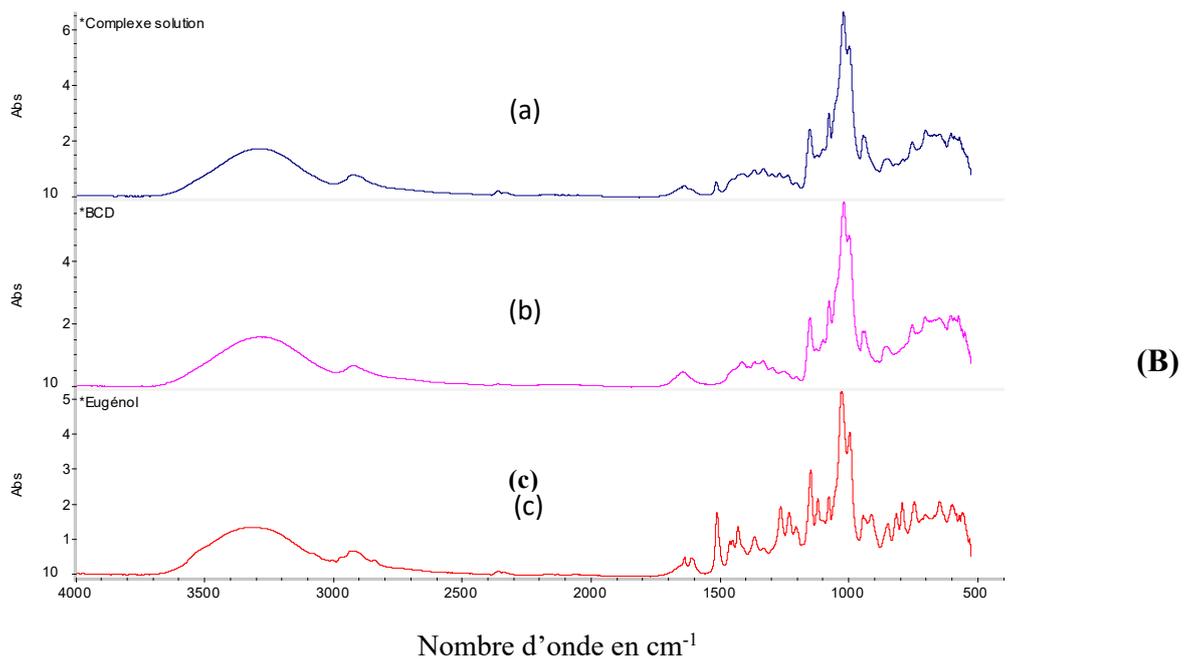
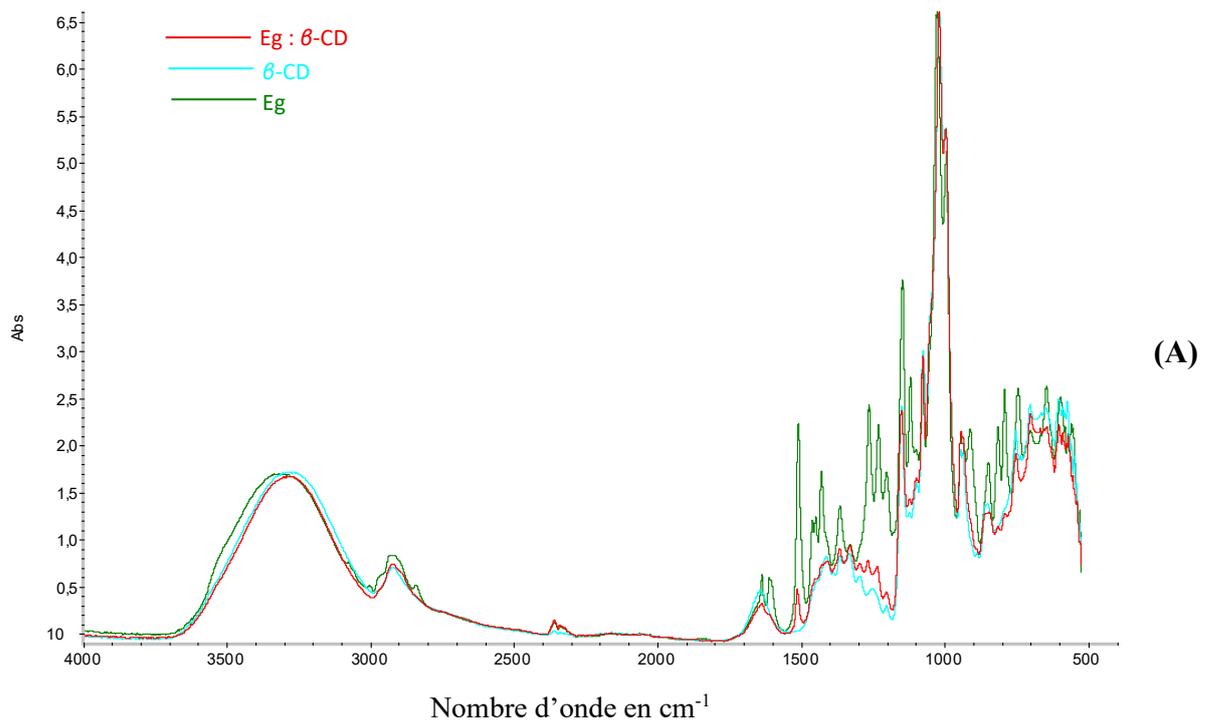


Figure 3.6. Spectres IR : (a) complexe d'inclusion de  $\beta$ -CD:Eg; (b)  $\beta$ -CD; (c) Eg.

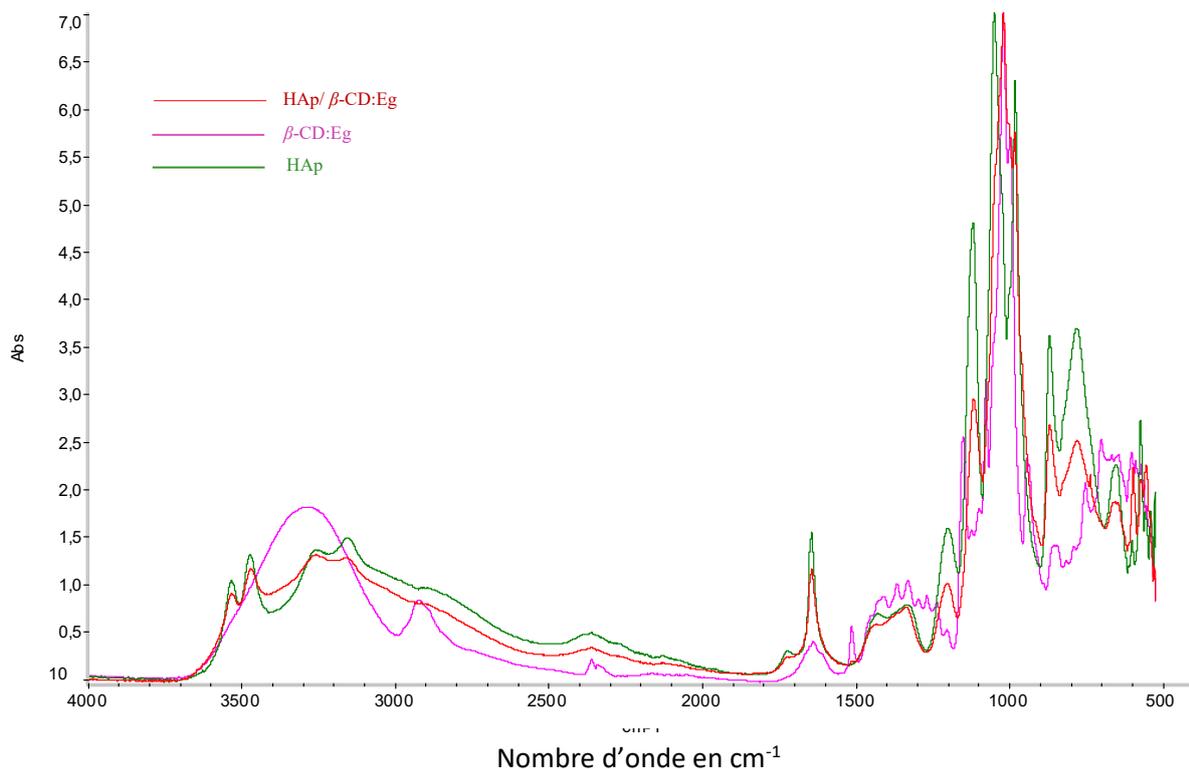
## 4.2. Bio-minéralisation des particules composites

### 4.2.1. Analyse par FTIR

Les spectres FT-IR des particules HAp et HAp/ $\beta$ -CD:Eg sont présentés sur la Figure 3.7. Le spectre de l'HAp a révélé des bandes d'absorption à  $\sim 3450$  et  $\sim 1650$   $\text{cm}^{-1}$  qui peuvent être

attribuées aux vibrations d'étirement et de déformation des groupements OH de l'eau absorbée, respectivement; 3250 and 1604  $\text{cm}^{-1}$  sont rapportées dans la littérature [106]. De plus, la bande associée à P–OH de  $\text{HPO}_4^{2-}$  est apparue en faible intensité à  $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$ ; une bande similaire a été récemment signalée [106]. Les bandes pointues à  $\sim 601$ ,  $\sim 606$  et 900-1300  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées aux modes d'étirement et de vibration de  $\text{PO}_4^{3-}$ . La bande observée à  $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$  suggère la présence de  $\text{CO}_3^{2-}$ , indiquant que l'HAp ainsi fabriquées a été carbonatées pendant le traitement [107,108].

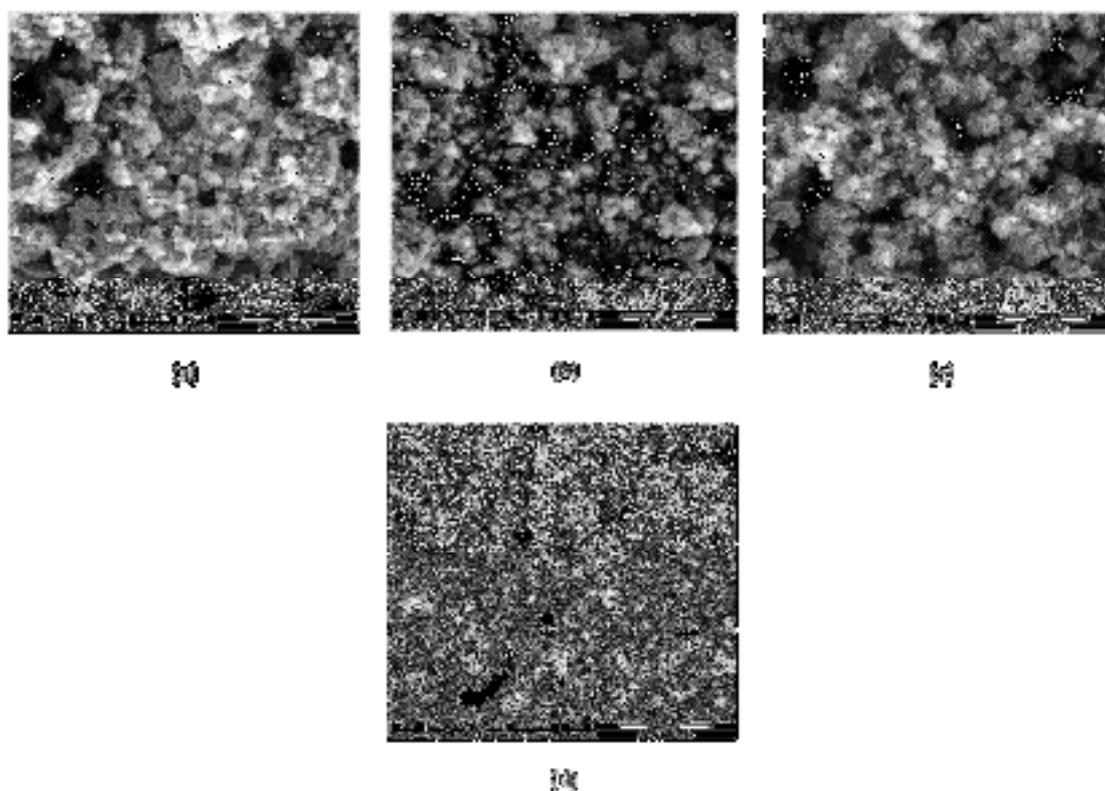
Le profil du spectre FT-IR des particules HAp/ $\beta$ -CD:Eg (**Figure 3.7**) est quelque peu différent de celui de l'HAp et nettement plus différent que celui du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg. L'intensité et la largeur de la plupart des bandes ont été considérablement réduites, suggérant l'effet de revêtement de la matrice complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg. Nous observons aussi que même quelques-unes des bandes du spectre d'HAp se trouve atténuées dans le spectre FTIR de l'hybride HAp/ $\beta$ -CD:Eg, du fait des interactions de coordination entre  $\text{Ca}^{2+}$  et les groupements OH de la matrice  $\beta$ -CD:Eg.



**Figure 3.7.** Spectres FT-IR des particules HAp et HAp/ $\beta$ -CD:Eg synthétisées dans la solution SBF modifiée, dans les conditions biomimétiques (température 37 °C ; pH 7,4).

#### 4.2.2. Analyse morphologique

Les images MEB des particules d'HAp/ $\beta$ -CD:Eg, réalisées dans la solution SBF modifiée et dans les conditions biomimétiques, après immersion dans la solution SBF sont illustrées sur la **Figure 3.8**. Au centre de l'image MEB de l'hybride après 3 jours d'immersion (**Figure 3.8a**) nous remarquons une morphologie spatiale qui apparaît sous la forme d'agrégats en forme de bâtonnets. Ces micro/nanoparticules de forme nodulaire sont dispersées de manière homogène au sein d'une surface poreuse. Tout autour de cette zone centrale, nous observant une autre forme de nature différente (sous la forme d'une série de choux-fleurs ou de brocolis en grains) séparés par des cavités, suggérant le début de la nucléation; ce phénomène d'agrégation peut être dû à la croissance cristalline selon la maturation d'Ostwalda.



**Figure 3.8.** Images MEB des particules d'HAp/ $\beta$ -CD:Eg, réalisées dans les conditions biomimétiques, après immersion dans la solution SBF : 3 jours **(a)** ; 6 jours **(b)** ; 9 jours **(c)** et **(d)**.

La formation de cette couche de phosphate de calcium à la surface de la structure poreuse des composites est favorisée par la présence des particules d'HAp. Nous remarquons aussi, qu'après 6 jours d'immersion (**Figure 3.8b**), la surface est recouverte par les particules de phosphate de calcium. Après 9 jours d'immersion (**Figure 3.8c**), la surface est entièrement revêtue d'une couche de phosphate de calcium et devenue très dense. Nous observons une

croissance régulière et concentrique de particules bien structurés formant ainsi des paquets reliés les uns aux autres par des jonctions donnant un aspect chou-fleur (cauliflower) à la morphologie ultime du système hybride (**Figure 3.8d**).

## CONCLUSION

Un complexe d'inclusion entre la  $\beta$ -CD et l'Eg a été préparé avec succès et caractérisé par différentes méthodes spectroscopiques. Le rapport stœchiométrique du complexe et sa constante de formation apparente  $K_f$  ont été déterminés au par la méthode de variation continue ainsi que la méthode Benesi-Hildebrand.

Les techniques de caractérisation usuelles (UV, FTIR) ont mis en évidence la formation du complexe d'inclusion  $\beta$ -CD:Eg avec une stœchiométrie de 1:1.

Le fluide corporel simulé (solution SBF) a été utilisé comme un milieu biomimétique pour la synthèse des nanobiomatériaux, à savoir les nanoparticules d'hydroxapatite et les hybrides organiques-inorganiques tels que les nanoparticules d'hydroxapatite/ $\beta$ -cyclo dextrine: Eugénol.

L'immersion de la poudre d'HAp/ $\beta$ -CD:Eg dans la solution qui simule le liquide physiologique (SBF) a montré une précipitation des phosphates de calcium après sursaturation de la solution et a abouti avec succès au déclenchement de la nucléation, confirmée par microscopie électronique à balayage (MEB). D'après les résultats produits dans ce travail, nous pouvons conclure que le matériau élaboré est susceptible d'être utilisé pour des applications dans la régénération du tissu osseux et la prévention et/ou le traitement des infections osseuses suite aux tumeurs, infections, interventions chirurgicales...etc. A cet effet, beaucoup de perspectives peuvent être envisagées telles que l'étude de l'efficacité du biomatériau préparé in-vivo.

Nos résultats montrent que les conditions expérimentales choisies, telles que la concentration des réactifs, la température et le temps de réaction, sont cruciales pour contrôler efficacement la nucléation.

Notre travail contribue ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de la nucléation et offre une base primaire pour des développements ultérieurs dans le domaine de la nanotechnologie mais surtout dans le domaine des substituts osseux. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives pour des recherches futures visant à affiner et à optimiser la production de nanoparticules à base de biomatériaux pour diverses applications technologiques et industrielles mais surtout pharmaceutiques et médicales.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Yuan, Z., Ye, Y., Gao, F., Yuan, H., Lan, M., Lou, K., & Wang, W. (2013). Chitosan-graft- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release. *International journal of pharmaceutics*, 446(1-2), 191-198.
2. Yih, T. C., & Al-Fandi, M. (2006). Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of cellular biochemistry*, 97(6), 1184-1190.
3. Moore, T. L., Schreurs, A. S., Morrison, R. A., Jelen, E. K., Loo, J., Globus, R. K., & Alexis, F. (2014). Polymer-coated hydroxyapatite nanoparticles for the delivery of statins. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 5(5), 237.
4. Huang, W., Zhang, J., Dorn, H. C., & Zhang, C. (2013). Assembly of bio-nanoparticles for double controlled drug release. *PLoS One*, 8(9), e74679.
5. Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53.
6. Hădărugă, D. I., Hădărugă, N. G., Costescu, C. I., David, I., & Gruia, A. T. (2014). Thermal and oxidative stability of the *Ocimum basilicum* L. essential oil/ $\beta$ -cyclodextrin supramolecular system. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10(1), 2809-2820.
7. Dorozhkin, S. V. (2011). Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates. *Biomatter*, 1(1), 3-56.
8. Manoj, M., Subbiah, R., Mangalaraj, D., Ponpandian, N., Viswanathan, C., & Park, K. (2015). Influence of growth parameters on the formation of hydroxyapatite (HAp) nanostructures and their cell viability studies. *Nanobiomedicine*, 2, 2.
9. Ferraz, M. P., Monteiro, F. J., & Manuel, C. M. (2004). Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 2(2), 74-80.
10. El-Kemary, M., & Douhal, A. (2006). Photochemistry and photophysics of cyclodextrin caged drugs: Relevance to their stability and efficiency. In *Cyclodextrin materials photochemistry, photophysics and photobiology* (pp. 79-105). Elsevier.
11. Bautista-Sanchez, A., Kasselouri, A., Desroches, M. C., Blais, J., Maillard, P., de Oliveira, D. M., ... & Delaire, J. (2005). Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 81(3), 154-162.

12. Qiu, W. G., Li, Z. F., Bai, G. M., Meng, S. N., Dai, H. X., & He, H. (2007). Study on the inclusion behavior between meso-tetrakis [4-(3-pyridiniumpropoxy) phenyl] porphyrin tetrakisbromide and  $\beta$ -cyclodextrin derivatives in aqueous solution. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(4-5), 1189-1193.
13. Guo, Y. J., Chao, J. B., & Pan, J. H. (2007). Study on the interaction of 5-pyridine-10, 15, 20-tris-(p-chlorophenyl) porphyrin with cyclodextrins and DNA by spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(2), 231-236.
14. Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., ... & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*, 43(6), 668-689.
15. Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71(10), 1397-1421.
16. Al-Trad, B., Alkhateeb, H., Alsmadi, W., & Al-Zoubi, M. (2019). Eugenol ameliorates insulin resistance, oxidative stress and inflammation in high fat-diet/streptozotocin-induced diabetic rat. *Life sciences*, 216, 183-188.
17. Kaur, G., Athar, M., & Alam, M. S. (2010). Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 49(3), 290-301.
18. Yogalakshmi, B., Viswanathan, P., & Anuradha, C. V. (2010). Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 268(3), 204-212.
19. Mnafigui, K., Hajji, R., Derbali, F., Gammoudi, A., Khabbabi, G., Ellefi, H., ... & Gharsallah, N. (2016). Anti-inflammatory, antithrombotic and cardiac remodeling preventive effects of eugenol in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rat. *Cardiovascular toxicology*, 16, 336-344.
20. Pan, C., & Dong, Z. (2015). Antiasthmatic effects of eugenol in a mouse model of allergic asthma by regulation of vitamin D3 upregulated protein 1/NF- $\kappa$ B pathway. *Inflammation*, 38, 1385-1393.
21. Yao, Z., Namkung, W., Ko, E. A., Park, J., Tradtrantip, L., & Verkman, A. S. (2012). Fractionation of a herbal antidiarrheal medicine reveals eugenol as an inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel TMEM16A. *PloS one*, 7(5), e38030.

22. Ou, H. C., Chou, F. P., Lin, T. M., Yang, C. H., & Sheu, W. H. H. (2006). Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food and chemical toxicology*, *44*(9), 1485-1495.
23. Opdyke, D. L. J. (1975). Monographs on fragrance raw materials. *Food and cosmetics toxicology*, *13*(4), 449-457.
24. Converti, A., Aliakbarian, B., Domínguez, J. M., Vázquez, G. B., & Perego, P. (2010). Microbial production of biovanillin. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*, 519-530.
25. Navikaite-Snipaitiene, V., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Rüegg, N., Rutkaite, R., Wolfram, E., & Yildirim, S. (2018). Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. *Meat science*, *145*, 9-15.
26. Joardar, A., Meher, G., Bag, B. P., & Chakraborty, H. (2020). Host-guest complexation of eugenol in cyclodextrins for enhancing bioavailability. *Journal of Molecular Liquids*, *319*, 114336.
27. Wang, T., Li, B., Si, H., Lin, L., & Chen, L. (2011). Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, *71*, 207-213.
28. Srivastava, A., Rao, L. J. M., & Shivanandappa, T. (2012). A novel cytoprotective antioxidant: 4-Hydroxyisophthalic acid. *Food chemistry*, *132*(4), 1959-1965.
29. Seddiki, H. (2022). Investigation par modélisation moléculaire du complexe d'inclusion Trans-Anéthol/( $\beta$ -CD).
30. Santos, E. H., Kamimura, J. A., Hill, L. E., & Gomes, C. L. (2015). Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology*, *60*(1), 583-592.
31. González-Peña, M. A., Ortega-Regules, A. E., Anaya de Parrodi, C., & Lozada-Ramírez, J. D. (2023). Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids—A review. *Plants*, *12*(2), 313.
32. Khoshtinat, K., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Hamidi, Z. (2017). Encapsulation of Iranian Garlic Oil with  $\beta$ -cyclodextrin: Optimization and its Characterization.
33. Morin-Crini, N., & Crini, G. (2013). Environmental applications of water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Progress in Polymer Science*, *38*(2), 344-368.
34. Silva, P. T. D., Fries, L. L. M., Menezes, C. R. D., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., ... & Silva, C. D. B. D. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, *44*, 1304-1311.

35. Schmid, G. (1989). Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology*, 7(9), 244-248.
36. Bouhalit, N. (2023). Réactivité et interactions intermoléculaires dans le complexe d'inclusion eugénol@  $\beta$ -Cyclodextrine, Mémoire de Projet de Fin d'Etudes 2ème Année Master Page 9
37. Frömming, K. H., & Szejtli, J. (1993). *Cyclodextrins in pharmacy* (Vol. 5). Springer Science & Business Media.
38. Armspach, D., & Matt, D. (2001). Metal-capped  $\alpha$ -cyclodextrins: squaring the circle. *Inorganic Chemistry*, 40(14), 3505-3509.
39. Gidwani, B., & Vyas, A. (2014). Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin- $\beta$ -cyclodextrin polymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 130-137.
40. Harada, A., Takashima, Y., & Yamaguchi, H. (2009). Cyclodextrin-based supramolecular polymers. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 875-882.
41. Schmidt, B. V., Hetzer, M., Ritter, H., & Barner-Kowollik, C. (2014). Complex macromolecular architecture design via cyclodextrin host/guest complexes. *Progress in polymer science*, 39(1), 235-249.
42. Blach, P., Fourmentin, S., Landy, D., Cazier, F., & Surpateanu, G. (2008). Cyclodextrins: a new efficient absorbent to treat waste gas streams. *Chemosphere*, 70(3), 374-380.
43. Irie, T., & Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 86(2), 147-162.
44. Hovgaard, L., & Brøndsted, H. (1995). Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 36(1-2), 159-166.
45. NAKANISHI, K., NADAI, T., MASADA, M., & MIYAJIMA, K. (1992). Effect of cyclodextrins on biological membrane. II. Mechanism of enhancement on the intestinal absorption of non-absorbable drug by cyclodextrins. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(5), 1252-1256.
46. Leroy-Lechat, F., Wouessidjewe, D., Andreux, J. P., Puisieux, F., & Duchêne, D. (1994). Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *International journal of pharmaceuticals*, 101(1-2), 97-103.
47. Bar, R., & Ulitzur, S. (1994). Bacterial toxicity of cyclodextrins: Luminous *Escherichia coli* as a model. *Applied microbiology and biotechnology*, 41, 574-577.
48. Frank, D. W., Gray, J. E., & Weaver, R. N. (1976). Cyclodextrin nephrosis in the rat. *The American journal of pathology*, 83(2), 367.

49. Bouhalit, N. (2023). Réactivité et interactions intermoléculaires dans le complexe d'inclusion eugénol@  $\beta$ -Cyclodextrine. Mémoire de Projet de Fin d'Etudes 2ème Année Master Page 15
50. Hădărugă, N. G., Bandur, G. N., David, I., & Hădărugă, D. I. (2019). A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Environmental Chemistry Letters*, *17*, 349-373.
51. Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, *39*(9), 1033-1046.
52. Briskin, D. P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology*, *124*(2), 507-514.
53. Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., ... & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*, *43*(6), 668-689.
54. Al-Trad, B., Alkhateeb, H., Alsmadi, W., & Al-Zoubi, M. (2019). Eugenol ameliorates insulin resistance, oxidative stress and inflammation in high fat-diet/streptozotocin-induced diabetic rat. *Life sciences*, *216*, 183-188.
55. Navikaite-Snipaitiene, V., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Rüegg, N., Rutkaite, R., Wolfram, E., & Yildirim, S. (2018). Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. *Meat science*, *145*, 9-15.
56. Hritcu, D., Humelnicu, D., Dodi, G., & Popa, M. I. (2012). Magnetic chitosan composite particles: evaluation of thorium and uranyl ion adsorption from aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 1185-1191.
57. Saifuddin M, N., & Kumaran, P. (2005). Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. *Electronic journal of Biotechnology*, *8*(1), 43-53.
58. Carvalho, I. C., Medeiros Borsagli, F. G., Mansur, A. A., Caldeira, C. L., Haas, D. J., Lage, A. P., ... & Mansur, H. S. (2021). 3D sponges of chemically functionalized chitosan for potential environmental pollution remediation: biosorbents for anionic dye adsorption and 'antibiotic-free' antibacterial activity. *Environmental technology*, *42*(13), 2046-2066.
59. Qamar, S. A., Ashiq, M., Jahangeer, M., Riasat, A., & Bilal, M. (2020). Chitosan-based hybrid materials as adsorbents for textile dyes—A review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, *2*, 100021.

60. De Campos, M., Müller, F. A., Bressiani, A. H. A., Bressiani, J. C., & Greil, P. (2007). Sonochemical synthesis of calcium phosphate powders. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 669-675.
61. Markovic, M., Fowler, B. O., & Tung, M. S. (2004). Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, 109(6), 553.
62. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Grossin, D., Bertrand, G., & Soulié, J. (2017). 1.11 Bioactive calcium phosphate compounds: physical chemistry. *Compr. Biomater. II*, 1, 187-221.
63. Gómez-Morales, J., Torrent-Burgues, J., Boix, T., Fraile, J., & Rodríguez-Clemente, R. (2001). Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method. *Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography*, 36(1), 15-26.
64. Torrent-Burgues, J., & Rodríguez-Clemente, R. (2001). Hydroxyapatite precipitation in a semibatch process. *Crystal Research and Technology: Journal of Experimental and Industrial Crystallography*, 36(8-10), 1075-1082.
65. Hydroxyapatite' Wikipedia, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Hydroxyapatite>
66. Boisson, J., Ruttens, A., Mench, M., & Vangronsveld, J. (1999). Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils. Part 1. Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation. *Environmental pollution*, 104(2), 225-233.
67. Chaturvedi, P. K., Seth, C. S., & Misra, V. (2006). Sorption kinetics and leachability of heavy metal from the contaminated soil amended with immobilizing agent (humus soil and hydroxyapatite). *Chemosphere*, 64(7), 1109-1114.
68. CHOUDAR. Nahd, AINI. Nadia, « Elaboration par sol-gel et caractérisation de l'hydroxyapatite dopée », Mémoire fin d'étude DEUA, Université de Bejaia, 2007.
69. Autefage, H. (2009). Rôle ostéoinducteur d'un revêtement d'apatite carbonatée nanocristalline sur des céramiques de phosphate de calcium biphasique (Doctoral dissertation, Toulouse 3).
70. Bloebaum, R. D., Zou, L., Bachus, K. N., Shea, K. G., Hofmann, A. A., & Dunn, H. K. (1997). Analysis of particles in acetabular components from patients with osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 338, 109-118.

71. Vaes, G. (1988). Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption: A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 231, 239-271.
72. AMINA BEGHOURA, A. B. Z. Etude physico-chimique comparative entre l'hydroxyapatite élaboré à partir des précurseurs naturel et synthétique.
73. Bukata, S., & Marinsky, J. A. (1964). Job's Method of Continuous Variations with Ion Exchange for the Study of Complexes in Solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 68(2), 258-260.
74. Job, P. (1928). Job's method of continuous variation. *Ann. chim*, 9(11).
75. Saha, S., Roy, A., Roy, K., & Roy, M. N. (2016). Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
76. Benesi, H. A., & Hildebrand, J. H. (1949). A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 71(8), 2703-2707.
77. Roy, M. N., Saha, S., Kundu, M., Saha, B. C., & Barman, S. (2016). Exploration of inclusion complexes of neurotransmitters with  $\beta$ -cyclodextrin by physicochemical techniques. *Chemical Physics Letters*, 655, 43-50.
78. Aksamija, A., Polidori, A., Plasson, R., Dangles, O., & Tomao, V. (2016). The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 208, 258-263.
79. Zhao, R., Sandström, C., Zhang, H., & Tan, T. (2016). NMR Study on the Inclusion Complexes of  $\beta$ -Cyclodextrin with Isoflavones. *Molecules*, 21(4), 372.
80. Sherje, A. P., & Jadhav, M. (2018).  $\beta$ -Cyclodextrin-based inclusion complexes and nanocomposites of rivaroxaban for solubility enhancement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29, 1-8.
81. Saha, S., Roy, A., Roy, K., & Roy, M. N. (2016). Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
82. Kfoury, M., Landy, D., & Fourmentin, S. (2018). Characterization of cyclodextrin/volatile inclusion complexes: a review. *Molecules*, 23(5), 1204.
83. Safar Sajadi, S. M., & Khoei, S. (2021). The simultaneous role of porphyrins' H-and J-aggregates and host-guest chemistry on the fabrication of reversible Dextran-PMMA polymersome. *Scientific Reports*, 11(1), 2832.

84. Rajbanshi, B., Saha, S., Das, K., Barman, B. K., Sengupta, S., Bhattacharjee, A., & Roy, M. N. (2018). Study to probe subsistence of host-guest inclusion complexes of  $\alpha$  and  $\beta$ -cyclodextrins with biologically potent drugs for safety regulatory discharge. *Scientific reports*, 8(1), 13031.
85. Prema, D., Thamaraiselvi, S., & Yamuna, R. (2020). Encapsulation of N-phenyl p-phenylenediamine into  $\beta$ -CD: spectral, molecular modelling studies and sensor application for detecting Fe<sup>2+</sup> ion. *Journal of Molecular Liquids*, 319, 113990.
86. Bergh, V. J. V., & Tønnesen, H. H. (2017). Interactions and solubilization of 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin with poloxamer 407 and  $\beta$ -cyclodextrin-derivatives in binary and ternary systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 37, 51-60.
87. Qiu, W. G., Li, Z. F., Bai, G. M., Meng, S. N., Dai, H. X., & He, H. (2007). Study on the inclusion behavior between meso-tetrakis [4-(3-pyridiniumpropoxy) phenyl] porphyrin tetrakisbromide and  $\beta$ -cyclodextrin derivatives in aqueous solution. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(4-5), 1189-1193.
88. Guo, Y. J., Zhang, P., Chao, J. B., Shuang, S. M., & Dong, C. (2008). Study on the supramolecular system of 5-(p-hydroxyphenyl)-10, 15, 20-tris-(4-chlorophenyl) porphyrin with cyclodextrins and its analytical characteristics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(3), 946-950.
89. Job, P. (1928). Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann. chim*, 9(10), 113-134.
90. Catena, G. C., & Bright, F. V. (1989). Thermodynamic study on the effects of. beta.-cyclodextrin inclusion with anilinonaphthalenesulfonates. *Analytical Chemistry*, 61(8), 905-909.
91. Periasamy, R., Kothainayaki, S., & Sivakumar, K. (2016). Encapsulation of dicinnamalacetone in  $\beta$ -cyclodextrin: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach on 1: 2 inclusion complex. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 53(9), 546-556.
92. Belica-Pacha, S., Małecka, M., Daško, M., Miłowska, K., Bryszewska, M., Budryn, G., ... & Pałecz, B. (2021). The interaction of heptakis (2, 6-di-o-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin with mianserin hydrochloride and its influence on the drug toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9419.
93. Chen, S. L., Li, Z. W., Chi, S. M., Yang, H. W., Zhang, Y. Y., Wang, Y. F., ... & Zhao, Y. (2020). Preparation, characterization and solubilization evaluation of two novel host-guest

- complexes based on two different functional groups of modified  $\beta$ -cyclodextrins and 20 (S)-protopanaxatriol. *Journal of Molecular Structure*, 1204, 127494.
94. Gao, S., Liu, Y., Jiang, J., Ji, Q., Fu, Y., Zhao, L., ... & Ye, F. (2019). Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 111513.
95. Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113, 226-238.
96. Aggelidou, C., Theodossiou, T. A., & Yannakopoulou, K. (2013). Protoporphyrin IX- $\beta$ -Cyclodextrin Bimodal Conjugate: Nanosized Drug Transporter and Potent Phototoxin. *Photochemistry and photobiology*, 89(5), 1011-1019.
97. Ayala-Zavala, J. F., Soto-Valdez, H., González-León, A., Alvarez-Parrilla, E., Martín-Belloso, O., & González-Aguilar, G. A. (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 60, 359-368.
98. Wang, J., Cao, Y., Sun, B., & Wang, C. (2011). Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 124(3), 1069-1075.
99. Freitas, C. A. B. D., Costa, C. H. S., da Costa, K. S., da Paz, S. P. A., Silva, J. R. A., Alves, C. N., & Lameira, J. (2023). Assessment of host-guest molecular encapsulation of eugenol using  $\beta$ -cyclodextrin. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1061624.
100. Wang, T., Li, B., Si, H., Lin, L., & Chen, L. (2011). Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 71, 207-213.
101. Muñoz-Shugulí, C., Rodríguez, F. J., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2021). Beta-Cyclodextrin: Eugenol Inclusion Complexes: Characterization and Antifungal Capacity. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of STEAM*, 463-477.
102. Celebioglu, A., Yildiz, Z. I., & Uyar, T. (2018). Fabrication of electrospun eugenol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs for enhanced antioxidant property, water solubility, and high temperature stability. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(2), 457-466.
103. Scremin, F. R., Veiga, R. S., Silva-Buzanello, R. A., Becker-Algeri, T. A., Corso, M. P., Torquato, A. S., ... & Canan, C. (2018). Synthesis and characterization of protein

- microcapsules for eugenol storage. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 131, 653-660.
104. Chakraborty, S., Ghosh, P., Basu, B., & Mandal, A. (2019). Inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with tetrabutylammonium bromide: Synthesis, characterization and interaction with calf thymus DNA. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 111525.
105. Borghetti, G. S., Lula, I. S., Sinisterra, R. D., & Bassani, V. L. (2009). Quercetin/ $\beta$ -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *Aaps Pharmscitech*, 10, 235-242.
106. Park, K. H., Kim, S. J., Hwang, M. J., Song, H. J., & Park, Y. J. (2017). Biomimetic fabrication of calcium phosphate/chitosan nanohybrid composite in modified simulated body fluids. *Express Polymer Letters*, 11(1), 14.
107. Arsad, M. S., Lee, P. M., & Hung, L. K. (2011, April). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and  $\beta$ -TCP particles. In 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science, IPCBEE (Vol. 7, pp. 184-8).
108. Paz, A., Guadarrama, D., López, M., E González, J., Brizuela, N., & Aragón, J. (2012). A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. *Química Nova*, 35, 1724-1727.