



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Mme MARIA ANTONIETA ANAYA CASTRO

le mercredi 21 février 2018

Titre :

Optimisation de la pH-sensibilité de protéines végétales en vue d'améliorer leurs capacités d'encapsulation de principes actifs destinés à la voie orale

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

MME SOPHIE FULLANA-GIROD

MME VANESSA DURRIEU

Rapporteurs :

M. JUAN MANUEL IRACHE GARRETA, UNIVERSIDAD DE NAVARRA PAMPLONA

Mme ANNE AUBERT-POUESSEL, UNIVERSITE DE MONTPELLIER

Membre(s) du jury :

Mme FLORENCE MATHIEU, INP TOULOUSE, Président

Mme SOPHIE FULLANA-GIROD, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

Table des Matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des abréviations.....	11
Introduction générale.....	15
Chapitre I. Étude bibliographique.....	19
I.1 Voie orale et formes à libération différée.....	21
I.1.1 Généralités sur la voie orale, avantages et inconvénients de cette voie.....	21
I.1.2 Cas des molécules faiblement solubles dans l'eau : classification et voies d'amélioration de leur biodisponibilité.....	23
I.1.2.1 Classification biopharmaceutique des principes actifs.....	23
I.1.2.2 Moyens d'amélioration de la biodisponibilité des PA.....	25
I.1.3 Formes à libération retardée ou différée pour la voie orale.....	26
I.1.3.1 Définition des différents types de libération du PA à partir des formes pharmaceutiques.....	26
I.1.3.2 Les formes à libération retardée pour la voie orale.....	27
I.2 La Microencapsulation.....	34
I.2.1 Définition et historique.....	34
I.2.2 Classification des microparticules.....	35
I.2.3 Les procédés de microencapsulation.....	36
I.2.4 La microencapsulation dans le domaine pharmaceutique.....	37
I.2.4.1 Introduction.....	37
I.2.4.2 Les procédés d'encapsulation utilisés en pharmacie pour la voie orale.....	40
I.2.4.3 Les polymères naturels pour l'encapsulation du Principe Actif.....	47
I.3 Les protéines végétales.....	52
I.3.1 Introduction.....	52
I.3.2 Application des protéines végétales en microencapsulation.....	54
I.3.2.1 Intérêt des protéines végétales en microencapsulation.....	54
I.3.2.2 Les protéines de légumineuses (soja, pois, lentille et pois chiche).....	55
I.3.2.3 Les protéines céréales.....	60
I.3.2.4 Autres protéines végétales.....	62
I.3.3 Modifications et fonctionnalisations des protéines.....	64

I.3.3.1 Introduction	64
I.3.3.2 Modification des protéines par traitement physico-chimique.....	64
I.3.3.3 Hydrolyse enzymatique.....	66
I.3.3.4 Désamidation.....	67
I.3.3.5 Réticulation	68
I.3.3.6 Cationisation	70
I.3.3.7 Réaction d'acylation.....	72
I.4 Conclusions	76
Chapitre II. Modification chimique de l'extrait protéique de soja et effet sur la microencapsulation.....	79
II.1 Introduction.....	81
II.2 Modifications chimiques de l'extrait protéique.....	81
II.2.1 Composition de l'extrait protéique	81
II.2.2 Acylation par le chlorure de dodécanoyl	82
II.2.3 Acylation par l'anhydride succinique	84
II.2.4 Influence des modifications sur la solubilité des protéines	86
II.3 Effet des modifications sur la microencapsulation.....	87
II.3.1 L'ibuprofène: principe actif modèle	87
II.3.2 Influence des modifications chimiques.....	88
II.3.3 Influence du ratio protéine/ibuprofène	89
II.4 Soy Protein Microparticles for Enhanced Oral Ibuprofen Delivery: Preparation, Characterization, and <i>In Vitro</i> Release Evaluation.....	91
II.5 Spray-dried succinylated soy protein microparticles for oral ibuprofen delivery	106
Chapitre III. Evaluation des protéines végétales, modifiées ou non, en tant qu'excipients pour la formulation de comprimés gastrorésistants	121
III.1 Objectifs	123
III.1.1 Effet des modifications chimiques sur la libération d'un actif modèle, l'ibuprofène, à partir des microparticules de protéine de soja	123
III.1.2 Exploration de l'intérêt potentiel des protéines de soja en tant qu'excipient pour la mise en forme de comprimés gastrorésistants.....	127
III.2 Evaluation pharmacotechnique des propriétés de la poudre de protéine de soja non atomisée.....	129

III.3 Screening de formulations de comprimés sans principe actif, contenant des quantités croissantes de protéine de soja	130
III.3.1 Critères de choix des éléments de la formulation des comprimés.....	130
III.3.2 Evaluation pharmacotechnique des mélanges de poudres contenant des proportions variables de protéine de soja.....	133
III.3.3 Evaluation pharmacotechnique des comprimés sans IBU contenant des proportions variables de protéine de soja.....	135
III.4 Evaluation des comprimés (formulation sélectionnée) contenant les microparticules chargées en principe actif	140
III.4.1 Evaluation pharmacotechnique des mélanges de poudre contenant les microparticules à base de protéine de soja, chargées en principe actif (IBU)	140
III.4.2 Evaluation pharmacotechnique des comprimés contenant des microparticules à base de protéine de soja, chargées en principe actif (IBU)	141
III.4.3 Essais de dissolution de l'IBU à partir des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU	143
III.5 Conclusion préliminaire	149
Chapitre IV. Matériels et Méthodes	153
IV.1 Matériels et Méthodes	155
IV.1.1 Matériels.....	155
IV.1.1.1 Matière enrobante.....	155
IV.1.1.2 Principe actif	155
IV.1.1.3 Solvants et réactifs	155
IV.1.2 Méthodes	156
IV.1.2.1 Caractérisation et analyse de l'extrait protéique de soja	156
IV.1.2.2 Modifications chimiques de l'extrait protéique de soja	158
IV.1.2.3 Procédé de microencapsulation.....	160
IV.1.2.4 Détermination de l'efficacité de microencapsulation.....	161
IV.1.2.5 Caractérisation physico-chimiques des extraits protéiques, des solutions et des microparticules	162
IV.1.2.6 Cinétiques de libération de l'ibuprofène selon la Pharmacopée Européenne	163
IV.1.2.7 Préparation des comprimés	164
IV.1.2.8 Contrôles pharmaco-techniques sur les mélanges de poudre	166
IV.1.2.9 Contrôles pharmaco-techniques sur les comprimés	168

Conclusion Générale et Perspectives.....	173
Références bibliographiques	181
Annexes	203
Annexe I. Dosage des protéines par la méthode Kjeldahl.....	205
Annexe II. Dosage des fonctions amines par la méthode OPA.....	207
Annexe III. Méthode de dosage de l'Ibuprofène par HPLC	209
Annexe IV. Principe et schéma des cellules à flux continu (SotaxCE6).....	211
Annexe V. Écoulement des poudres.....	213
Annexe VI. Masse volumique vrac et masse volumique après tassement	215
Annexe VIII. Friabilité des comprimés non enrobés.....	219
Annexe IX. Désagrégation des comprimés et des capsules	220
Annexe XI. Analyse statistique	226
Annexe XII. Article publié dans AAPS PharmSciTech.....	227
Annexe XIII. Publications et communications scientifiques	236

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique du devenir d'un principe actif dans l'organisme après administration orale (Pereira Camelo, 2015).....	21
Figure 2. L'anatomie du tractus gastro-intestinal et ses particularités (variations de pH et nature des enzymes présentes le long du TGI) (Pereira Camelo, 2015).	23
Figure 3. Profil des concentrations plasmatiques obtenues dans le cas d'une forme à libération immédiate (I et II), ralentie (III et IV) et différée (VI) (Leblanc, 1997).....	27
Figure 4. Comprimés MUPS (Multiple Unit Pellet System) de Nexium® (Ozarde et al., 2012)	29
Figure 5. Exemples de gélules contenant des pellets enrobés	29
Figure 6. Schéma d'une turbine classique (Fahier, 2016)	32
Figure 7. Schéma d'une turbine perforée Lödige (Fahier, 2016).....	32
Figure 8. Les différents lits d'air fluidisé : A : Top-spray, B : Bottom-spray avec une colonne Wurster, C : Tangential-spray (Glatt GmbH, http://www.glatt.com).....	33
Figure 9. Types des microparticules (Nesterenko, 2012)	35
Figure 10. Intérêts de l'encapsulation dans le domaine de la santé (Tomaro-Duchesneau et al., 2012).....	38
Figure 11. Présentation schématique du procédé d'atomisation (Murugesan and Orsat, 2012).	41
Figure 12. Schéma de principe d'un appareillage d'atomisation : a) à co-courant b) à contre-courant (Buchi Corporation).....	42
Figure 13. Représentations schématiques des appareils à buse vibrante. 1. Système de pompage (seringue) contenant l'API et la solution polymère; 2. Unité vibrante; 3. Buse; 4. Bague d'électrode; 5. Bain de durcissement (De Kruif et al., 2014).	43
Figure 14. Principe du procédé de microencapsulation par évaporation du solvant : (a) matière active dispersée dans la solution organique de polymère, (b) mise en émulsion de la phase organique dans la phase aqueuse, (c) évaporation du solvant organique de la phase dispersée, (d) formation d'enrobage de polymère et (e) séchage des microparticules (Nesterenko, 2012).	45
Figure 15. Représentation schématique du principe d'encapsulation par coacervation (a) dispersion du principe actif dans la solution de polymère; (b) précipitation du coacervat; (c)	

encapsulation du principe actif par des microgouttelettes de coacervat ; (d) coalescence du coacervat en une phase continue autour du principe actif (Jyothi et al., 2012).	46
Figure 16. Les structures protéiques (Darryl, 2010).	53
Figure 17. Représentation schématique de la dénaturation de β -lactoglobuline (Kuwata et al., 2001).	65
Figure 18. Désamidation des résidus d'asparaginyne et de glutaminyne (Catak et al., 2006). .	68
Figure 19. Réticulation de protéines par des réactions de transamidation catalysées par la transglutaminase (Heck et al., 2013).	69
Figure 20. Réaction de succinylation	73
Figure 21. Composition en acides aminés de la protéine de soja	82
Figure 22. Réaction d'acylation de Schotten-Baumann	83
Figure 23. Effet du pH sur la solubilité de SPI, SPA et SPS à 37°C	86
Figure 24. Représentation de la molécule d'Ibuprofène	87
Figure 25. Acylation via Schotten-Baumann reaction	94
Figure 26. Amino acid composition of soy protein isolate	98
Figure 27. Solubility profiles of SPI and SPA at 3% w/w and 37°C	99
Figure 28. Scanning electron micrographs of microparticles. a SPI microparticles. b SPI/IBU 80/20. c SPI/IBU 60/40. d SPA. e SPA/IBU 80/20. f SPA/IBU 60/40. Magnification of \times 5000, scale bars 2 μ m	101
Figure 29. Ibuprofen release kinetics with SPI and SPA (at 90/10 ratio) in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2 with pepsin and simulated intestinal fluid at pH 6.8 (SIF)	102
Figure 30. DR-X patterns of ibuprofène, SPI, microparticles, and physical mixture of SPI/IBU 60/40	103
Figure 31. TGA curves of IBU, SPI, physical mixture, and microparticles of SPI/IBU 60/40	104
Figure 32. Succinylation reaction of proteins	109
Figure 33. Solubility profile of SPI and SPS as a function of medium pH	113
Figure 34. Scanning electron micrographs of microparticles: a) SPI microparticles, b) SPI 80/20, c) SPI 60/40, d) SPS, e) SPS 80/20, f) SPS 60/40. X5000 scale bar 2 μ m.	115
Figure 35. DR-X patterns of Ibuprofène, SPS, and SPS/IBU 90/10 physical mixture and microparticles.	116
Figure 36. TGA curves of IBU, SPS, and SPS/IBU 60/40 physical mixture and microparticles.	117

Figure 37. Ibuprofène release kinetics with SPI and SPS (at 90/10 ratio) in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2 with pepsin and simulated intestinal fluid at pH 6.8 (SIF).	119
Figure 38. Cinétique de libération d'IBU à partir des microparticules SPI, SPA et SPS, au taux protéine/IBU de 90/10, à pH 1,2 en présence de pepsine	123
Figure 39. Cinétique de libération d'IBU à partir des microparticules SPI, SPA et SPS, au taux protéine/IBU de 90/10, à pH 6,8.....	124
Figure 40. Illustration du mécanisme de libération de l'IBU à partir des microparticules SPI, SPA et SPS, en fonction du milieu de libération (FGS et FIS).	127
Figure 41. Photographies des comprimés sans PA contenant différentes proportions de protéine de soja et d'excipients pour compression direct.	138
Figure 42. Formulation des comprimés contenant des microparticules avec un taux protéine/IBU de 90/10	140
Figure 43. Photographies des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU.....	142
Figure 44. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe, partie effectuée à pH 1,5	144
Figure 45. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe, partie effectuée à pH 4,5	144
Figure 46. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe, partie effectuée à pH 7,2	145
Figure 47. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe en fonction de la variation séquentielle de pH	145
Figure 48. La réaction OPA. L'OPA réagit avec les groupes amino primaires et un composé SH (dithiothréitol, DTT) pour former un composé qui absorbera la lumière à 340nm (Nielsen et al., 2001).	207
Figure 49. Droite d'étalonnage de L-Leucine	208
Figure 50. Droite d'étalonnage de l'Ibuprofène dans d'acétate de sodium 0,1M (pH 7) et d'acétonitrile 60:40 (w/w) à 222nm.	209
Figure 51. Droite d'étalonnage de l'Ibuprofène dans FGS avec 0,32% de pepsine (w/v) à pH 1,2 à 222nm.	210
Figure 52. Droite d'étalonnage de l'Ibuprofène dans FIS à pH 6,8 à 222nm.	210
Figure 53. DISSOTEST CE6 SOTAX	211
Figure 54. Schéma d'une cellule à flux continue en circuit fermé utilisé dans les essais de dissolution (Pereira Camelo, 2015).	212

Figure 55. Dimensions en millimètres	213
Figure 56. Dimensions en millimètres	214
Figure 57. Dispositif de tassement d'un échantillon de poudre (Ph. Eur. 9.5)	217
Figure 58. Appareil de détermination de la friabilité des comprimés	219
Figure 59. Appareil de désagrégation A. Dimensions en millimètres	222
Figure 60. Appareil 2, à palette. Dimensions en millimètres (Les dimensions A et B ne varient pas de plus de 0,5 mm lorsque la palette tourne sur son axe central. Sauf indication contraire, les tolérances sont de $\pm 1,0$ mm).	224

Liste des tableaux

Tableau 1. Système de Classification Biopharmaceutique BCS (Amidon et al., 1995).	24
Tableau 2. Principaux polymères utilisés pour le pelliculage gastro-résistant (Wehrlé, 2012) 31	31
Tableau 3. Procédés de microencapsulation.	36
Tableau 4 Matériaux et procédés de microencapsulation les plus couramment utilisés dans le domaine de la santé (Wehrlé, 2012).	39
Tableau 5. Polymères naturels utilisés en microencapsulation (Renard and Reddy, 2007)...	48
Tableau 6. Principales protéines animales utilisées pour des applications pharmaceutiques et leurs caractéristiques (Tarhini et al., 2017).	50
Tableau 7. Exemples d'applications pharmaceutiques récentes impliquant des protéines animales.	51
Tableau 8. Microencapsulation utilisant la protéine de soja comme matériau enrobant.	57
Tableau 9. Microencapsulation utilisant la protéine de pois comme matériau enrobant.	59
Tableau 10. Microencapsulation utilisant la zéine de maïs comme matériau enrobant.	60
Tableau 11. Microencapsulation utilisant les protéines de blé et d'orge comme matériau enrobant.	62
Tableau 12. Taux d'acylation de la protéine de soja à différents ratios molaires NH_2 de protéine / chlorure de dodécanoyl ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{OCl}$)	84
Tableau 13. Taux de succinylation de la protéine de soja à différents ratios molaires NH_2 de protéine / anhydride succinique	85
Tableau 14. Propriétés des microparticules des différents ratios Protéine / Ibuprofène	88
Table 15. Properties of loaded spray-dried microparticles	100
Table 16. Properties of loaded spray-dried microparticles	114
Tableau 17. Principaux diluants pour compression directe (Jivraj et al., 2000)	131
Tableau 18. Principales caractéristiques des excipients utilisés pour le screening de formulation.	132
Tableau 19. Principaux lubrifiants et leur utilisation (Davies, 2004)	133
Tableau 20. Détermination des propriétés d'écoulement et de tassement des formulations contenant des proportions variables de protéine de soja, sans principe actif.....	135
Tableau 21. Caractérisation des comprimés contenant des proportions variables de protéine de soja, sans principe actif.....	136

Tableau 22. Caractérisation des comprimés contenant des proportions variables de protéine de soja, sans principe actif (suite).....	137
Tableau 23. Détermination des propriétés d'écoulement et de tassement des mélanges de poudres avec microsphères chargées en principe actif et Avicel pH 302NF	141
Tableau 24. Caractérisation des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU.....	142
Tableau 25. Caractérisation des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU (suite)	143
Tableau 26. Quantité des microparticules employées pour les cinétiques de libération	164
Tableau 27. Formulation des comprimés contenant de la protéine de soja en proportions variables.....	165
Tableau 28. Formulation des comprimés avec les microparticules protéine/IBU (90/10)....	165
Tableau 29. Echelle d'aptitude à l'écoulement (Ph. Eur. 9.5).....	217
Tableau 30. Séquences d'accroissement du pH possibles pour les tampons utilisés lors des essais dissolution de formes destinées à la voie orale	224

Liste des abréviations

AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ATG	Analyse thermogravimétrique
BSA	Albumine de sérum bovin
BSC	Système de classification biopharmaceutique
CA	Acétate de cellulose
CFC	Cellule à flux continu
CMM	Cellulose Microcristalline
CS	Concentration saturante
C₁₂	Chlorure de dodécanoylé
DTT	1,4-Dithiothréitol
EME	Efficacité de microencapsulation
FDA	Food and Drug Administration
FGIS	Fluides gastro-intestinaux simulés
FGS	Fluide gastrique simulé
FIS	Fluide intestinal simulé
HPLC	La chromatographie en phase liquide à haute performance
IBU	Ibuprofène
LAC	Lactose
MEB	Microscopie électronique à balayage
MUPS	Multiple Unit Pellet System
OPA	Ortho-phthalaldéhyde
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PA	Principe actif
RA	Rendement d'atomisation
RRN	Résistance à la rupture normalisée
SPI	Isolat de protéine de soja
SPA	Protéine de soja acylé
SPS	Protéine de soja succinylé
TA	Taux d'acylation
TGI	Tractus gastro-intestinal
TME	Taux de microencapsulation
UV	Ultraviolet
VO	Voie orale
Vsp	Volumes spécifiques

Introduction générale

La voie orale est la voie d'administration de principes actifs la plus répandue et une des mieux acceptée par les patients, notamment lorsqu'un traitement prolongé est nécessaire. Cependant, ce mode d'administration pose problème pour de nombreux composés actifs, notamment ceux présentant une faible solubilité, une faible perméabilité et/ou une instabilité dans l'environnement gastro-intestinal. Leur microencapsulation dans des matrices polymériques peut permettre d'envisager la voie orale pour de tels actifs, à condition que les microparticules générées résistent aux environnements rencontrés dans le tractus gastro-intestinal et/ou jouent alors un rôle protecteur, tant pour le principe actif que pour les muqueuses rencontrées.

Dans le domaine pharmaceutique, la recherche d'excipients verts est en plein essor, et la fonctionnalisation de ces excipients, permettant l'adaptation de leurs propriétés aux usages qui leur sont destinés, est essentielle à leur développement. Les protéines, grâce à leurs propriétés fonctionnelles uniques représentent des candidats privilégiés. Ceci est souvent associé à leurs propriétés amphiphiles, leur poids moléculaire élevé et à la flexibilité de leurs chaînes moléculaires. Elles possèdent une bonne solubilité, une viscosité relativement basse, et des propriétés émulsifiantes et filmogènes. Elles sont de plus tout à fait pertinentes pour la microencapsulation de principes actifs hydrophobes. Leur caractère amphiphile leur permet également de se solubiliser facilement (du moins partiellement) dans des environnements aqueux.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt des protéines végétales en tant que matériau enrobant de principes actifs pharmaceutiques destinés à la voie orale. De plus, la pH sensibilité des protéines végétales peut être modulée en les modifiant chimiquement, ce qui permet d'envisager la formulation de formes gastrorésistantes. Ceci serait particulièrement adapté pour des principes actifs dont le site d'absorption préférentiel est situé au niveau intestinal et présentant une potentielle toxicité au niveau œsophagien ou gastrique. C'est par exemple le cas des anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS, comme l'ibuprofène, dont l'effet indésirable le plus fréquent est l'apparition de troubles digestifs pouvant aller jusqu'à la formation d'ulcères.

Les modifications chimiques choisies, tout comme les étapes de microencapsulation, seront réalisées grâce à des procédés propres, afin de former des microparticules destinées à la voie orale, et susceptibles de posséder des propriétés de libération d'actifs contrôlées et modifiées.

Enfin, une étude de faisabilité de l'utilisation de ces microparticules à base de protéines végétales, modifiées chimiquement ou non, en tant qu'excipients pour une forme comprimé à libération retardée sera menée.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres :

Le **premier chapitre** est consacré à une étude bibliographique présentant des généralités sur l'administration de principes actifs par voie orale, les aspects généraux de la microencapsulation, les différents procédés de microencapsulation et les polymères naturels utilisés dans le domaine pharmaceutique, et une troisième partie, consacrée aux protéines végétales, à leurs applications en microencapsulation et aux modifications chimiques dont elles peuvent faire l'objet.

Les résultats obtenus au cours de ce travail dans les deux chapitres suivants. Le **deuxième chapitre** traite de la fonctionnalisation de la protéine de soja et de l'utilisation de l'isolat protéique et des protéines modifiées pour l'encapsulation de l'ibuprofène par le procédé d'atomisation. Après une présentation des modifications chimiques effectuées, sont présentées les deux publications issues de ces travaux. Le **troisième chapitre**, plus exploratoire, rassemble les essais de formulation de comprimés à partir des microparticules réalisées et d'excipients pharmaceutiques d'origine naturelle, ainsi que leur caractérisation pharmacotechnique.

Les matériels utilisés et les protocoles expérimentaux sont présentés dans le **quatrième chapitre**.

Chapitre I. Étude bibliographique

I.1 Voie orale et formes à libération différée

I.1.1 Généralités sur la voie orale, avantages et inconvénients de cette voie

La voie orale (VO) constitue la voie d'administration de choix pour l'administration de la plupart des principes actifs (PA) médicamenteux, indépendamment de leur structure ou poids moléculaire (Touitou, 2013). De nombreux avantages sont liés à l'administration de médicaments par cette voie : c'est une voie aisée, bien acceptée par le patient car il s'agit d'un mouvement et d'un geste habituel (Chen and Langer, 1998) ; et de fortes doses de substances actives peuvent être administrées dans un volume restreint, en une seule fois.

Après ingestion, le devenir du médicament dans l'organisme comporte trois phases distinctes : les phases biopharmaceutique, pharmacocinétique et pharmacodynamique présentées sur la Figure 1. On le représente généralement par le système LADMER, condensé de Libération, Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Réponse.

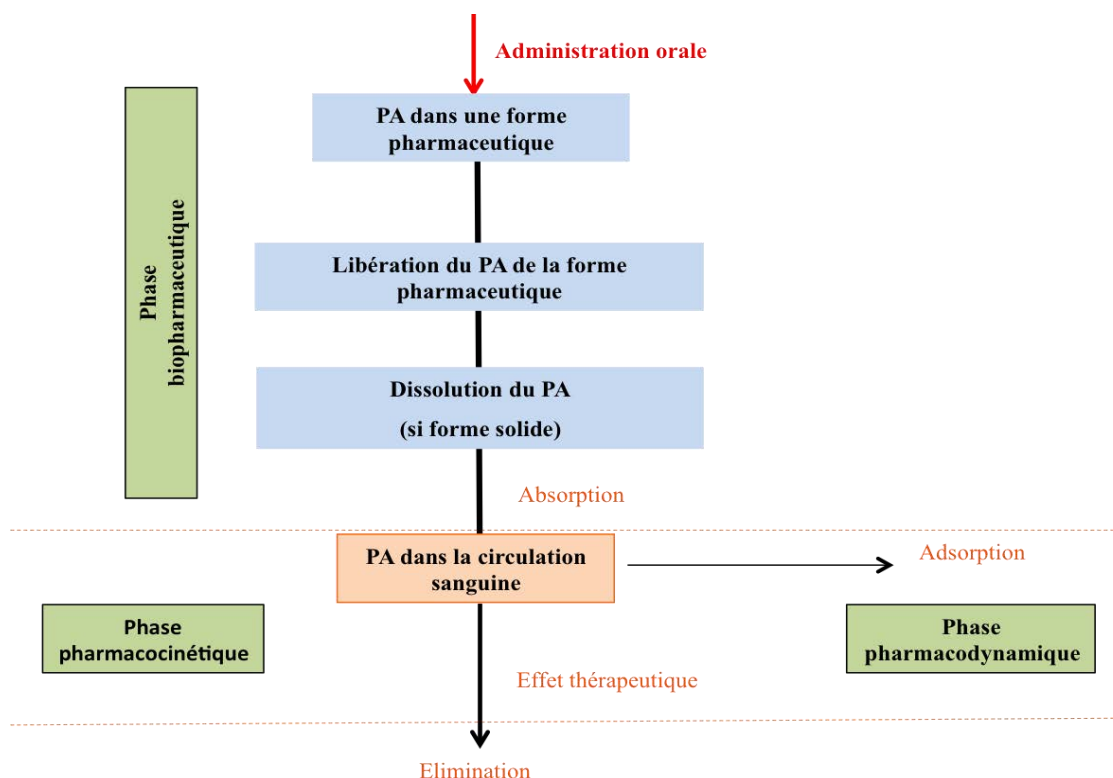


Figure 1. Représentation schématique du devenir d'un principe actif dans l'organisme après administration orale (Pereira Camelo, 2015).

Lors d'une administration par VO, le PA contenu dans le médicament est libéré au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI) et va se dissoudre dans les liquides de l'organisme. Il pourra alors être absorbé et traverser ainsi les membranes biologiques afin d'atteindre la circulation générale (Phase biopharmaceutique LDA).

Le PA atteint alors la circulation sanguine générale de façon à pouvoir atteindre sa cible (le site d'action et les récepteurs auxquels il est destiné) : c'est la phase pharmacocinétique qui se réalise selon quatre étapes successives, l'absorption, la distribution dans l'organisme, le métabolisme et l'élimination de l'organisme (ADME). L'action du PA sur l'organisme (R : action thérapeutique/toxicité) correspond à la phase pharmacodynamique.

L'administration par VO présente un certain nombre de limitations ou d'inconvénients ; ce sont notamment :

- La possibilité d'altération des PA par contact avec les sécrétions du tube digestif, de pH divers et contenant aussi des enzymes (Figure 2) ;
- La possibilité d'irritation du TGI par certaines substances (salicylates, anti-inflammatoires non stéroïdiens, antituberculeux...), ce qui impose la préparation de formes galéniques particulières (formes gastrorésistantes) ;
- Le problème de la saveur de certains médicaments (goût et odeur) qui peut nécessiter une correction ou une modification (enrobage/aromatisation) ;
- Le problème de l'absorption des PA qui peut varier en fonction :
 - o Des caractéristiques intrinsèques du PA : certains ne peuvent être absorbés par VO (comme les sulfamides ou sels métalliques) et vont exercer un effet local ;
 - o De la forme pharmaceutique administrée qui peut retarder l'effet thérapeutique (cas des formes gastrorésistantes et à libération retardée) ;
 - o De l'heure de prise médicamenteuse (rôle de la chronobiologie) ;
 - o De la présence ou non de substances alimentaires dans le TGI (l'administration peut être préconisée à jeun, avant, pendant ou après les repas) et de leur composition (en lipides, glucides, protéines) (Bala *et al.*, 2013, Choonara *et al.*, 2014, Iglesias *et al.*, 2017, Klausner *et al.*, 2003).

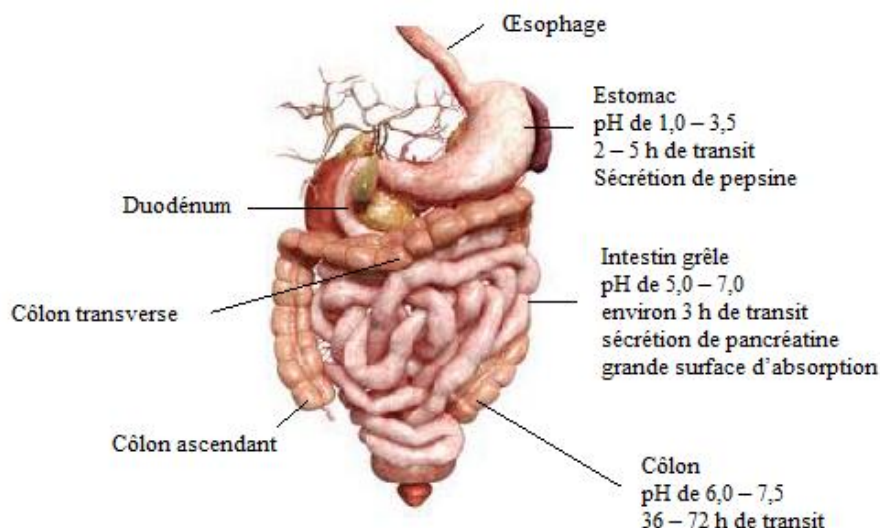


Figure 2. L'anatomie du tractus gastro-intestinal et ses particularités (variations de pH et nature des enzymes présentes le long du TGI) (Pereira Camelo, 2015).

De ce fait les facteurs physiologiques du tractus gastro-intestinal: pH, mobilité et durée du transit, l'état physiologique du patient (âge, sexe, maladie...) et la présence de nourriture sont des facteurs importants à prendre en compte (Touitou, 2013).

Le PA, quant à lui, doit donc présenter des propriétés physico-chimiques particulières lui permettant de rester stable en milieu gastro-intestinal, présenter un profil de dissolution reproductible et une balance hydrophile/lipophile adéquate pour passer l'épithélium intestinal (Zhang *et al.*, 2013).

I.1.2 Cas des molécules faiblement solubles dans l'eau : classification et voies d'amélioration de leur biodisponibilité

I.1.2.1 Classification biopharmaceutique des principes actifs

Les PA en développement ou commercialisés sont en grande partie peu ou pas solubles dans l'eau, et donc peu ou pas solubles dans les liquides physiologiques. On estime qu'ils correspondent à 70% des molécules développées (Bosselmann and Williams III, 2012). Cet inconvénient majeur a pour conséquence de rendre difficile voire impossible l'obtention d'une concentration suffisante dans la circulation systémique pour assurer l'action thérapeutique. En

effet, l'insolubilité d'un principe actif rend difficile son passage au travers des membranes physiologiques (perméabilité). Perméabilité et solubilité sont liées et elles permettent d'évaluer *in vivo* la biodisponibilité d'un principe actif selon une classification qui a été établie avec 4 types de profils de molécules (Tableau 1).

Tableau 1. *Système de Classification Biopharmaceutique BCS (Amidon et al., 1995).*

	Solubilité élevée	Faible solubilité
Perméabilité élevée	Classe I	Classe II
Faible perméabilité	Classe III	Classe IV

Cette classification biopharmaceutique de substances actives dite BCS (*Biopharmaceutical Classification System*) a été proposée en 1995 par G. Amidon afin de prédire l'aptitude à l'absorption d'une molécule à partir de ces deux facteurs :

- *Classe I* : le PA étant facilement absorbé, deux facteurs peuvent limiter la vitesse d'absorption : (i) la vitesse de dissolution, (ii) le temps de transit gastro-intestinal qui devient le facteur limitant si la dissolution est très rapide.
- *Classe II* : la vitesse d'absorption est limitée par la vitesse de dissolution du PA.
- *Classe III* : la perméabilité intestinale est le facteur limitant la vitesse d'absorption.
- *Classe IV* : l'administration orale nécessite de contourner les problèmes de solubilisation ainsi que d'absorption de ce type de PA. Dans le cas où la galénique n'arrive pas à lever ces verrous, ces molécules peuvent être administrées par voie parentérale.

Par définition un principe actif est considéré comme ayant une haute solubilité lorsque la quantité correspondant à une prise maximale est soluble dans 250mL d'un milieu aqueux avec un pH allant de 1 à 7,5 à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ et sa vitesse de dissolution est considérée comme rapide quand 85% de cette quantité est solubilisée en moins de 30 minutes. De plus, quand plus de 90% de la dose de principe actif initialement administrée est absorbée à travers la barrière intestinale, elle présente une haute perméabilité (Yu *et al.*, 2002).

Seule une faible proportion des molécules commercialisées ou en cours de développement sont de classe I ; 90% d'entre elles sont apolaires et appartiennent aux classes II et IV, dont

environ 70% à la classe II (Yu *et al.*, 2002). Il apparait donc primordial de développer différentes options de formulations dans le but d'améliorer la biodisponibilité des substances actives, surtout de classe II. On trouve entre autres dans cette classe l'ibuprofène, le kétoprofène, le piroxicam, le naproxène et le kétoconazole (Pouton, 2006, Polli *et al.*, 2004, Lawrence *et al.*, 2002).

I.1.2.2 Moyens d'amélioration de la biodisponibilité des PA

La biodisponibilité décrit comment un principe actif devient disponible dans l'organisme pour produire son action thérapeutique. Elle est caractérisée par des données de pharmacocinétique c'est-à-dire par la quantité de principe actif disponible (qui atteint le sang) et la vitesse de ce processus (ANSM, 2017). La biodisponibilité est donc une propriété du médicament qui rend compte à la fois du taux de PA qui atteint la circulation générale et de la vitesse à laquelle il y parvient.

Lors d'une administration par voie orale, deux étapes majeures peuvent limiter le passage systémique des PA. Dans un premier temps, le composé doit se dissoudre dans les liquides du TGI. Une fois dissous, le PA doit ensuite traverser la muqueuse intestinale afin de rejoindre la circulation sanguine. Si le PA est peu soluble mais facilement absorbable, il sera absorbé dès sa dissolution, disparaîtra du milieu, permettant ainsi la dissolution d'une nouvelle fraction facilement absorbable. Néanmoins, la vitesse de dissolution sera un des facteurs essentiels de son absorption.

Différentes approches pour accroître la vitesse de dissolution des substances actives de classe II BCS peuvent être développées, comprenant des modifications chimiques, physiques et des stratégies galéniques (Leblanc, 1997).

Parmi les stratégies galéniques susceptibles d'être employées, nous ne citerons que celles utilisées au cours de ce travail de thèse :

- **les procédés de mise en forme multi-particulaires** : ils permettent d'augmenter la surface de contact (A) comparativement à des formes monolithiques (comme par exemple les comprimés) et ainsi d'augmenter la vitesse de dissolution du PA. La microencapsulation est une des stratégies actuellement utilisées pour pallier à la réduction drastique de biodisponibilité des PA administrés par VO (Caillard *et al.*,

2009, Daeihamed *et al.*, 2017). Les procédés permettant d'aboutir à ce type de formes seront développés dans la partie suivante ;

- **l'amorphisation** : de façon générale, la solubilité des substances actives amorphes est plus grande que celle des formes cristallines correspondantes. La formulation de systèmes amorphes stables peut être obtenue par des techniques de dispersions solides. Le terme dispersion solide se réfère à la dispersion d'un ou de plusieurs ingrédients actifs dans un polymère solide inerte souvent préparés par fusion, évaporation de solvant ou la combinaison des deux. Ces techniques comprennent la précipitation rapide par lyophilisation, l'utilisation de fluides supercritiques, l'extrusion et le séchage par pulvérisation en présence de polymères hydrophiles amorphes. L'atomisation ou spray-drying participe de cette dernière catégorie.

I.1.3 Formes à libération retardée ou différée pour la voie orale

I.1.3.1 Définition des différents types de libération du PA à partir des formes pharmaceutiques

La Pharmacopée Européenne (9.5) distingue deux grands types de libération : les formes à libération conventionnelle et les formes à libération modifiée (Figure 3). On parle de libération conventionnelle ou immédiate lorsque la libération du PA n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. Le profil de libération du PA dépend alors essentiellement de ses propriétés intrinsèques.

Au contraire, le terme de libération modifiée est employé lorsqu'on souhaite moduler la vitesse de libération du PA grâce à l'utilisation d'une technologie particulière de préparation, en employant soit des excipients spéciaux, soit tout autre artifice permettant l'augmentation ou la diminution de la vitesse de dissolution de la substance active dans les liquides de l'organisme. On obtient alors une forme dans laquelle la vitesse de libération du PA et/ou son lieu de libération font l'objet d'une modification délibérée résultant d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial, et sont différents de ceux qu'assureraient la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. Les formes à libération modifiée comprennent : les formes à libération accélérée, les formes à

libération prolongée (ou ralentie), les formes à libération retardée et les formes à libération séquentielle.

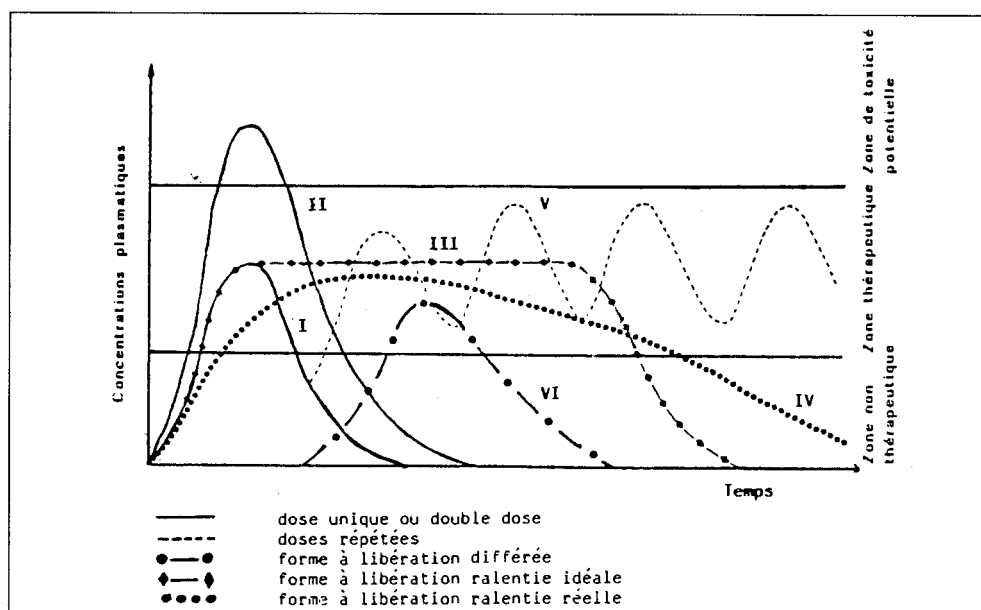


Figure 3. Profil des concentrations plasmatiques obtenues dans le cas d'une forme à libération immédiate (I et II), ralentie (III et IV) et différée (VI) (Leblanc, 1997).

I.1.3.2 Les formes à libération retardée pour la voie orale

Les formes à libération retardée constituent donc un cas particulier de forme à libération modifiée se traduisant par une libération différée du ou des PA. Ces formes comprennent les préparations gastrorésistantes, qui sont des formes pharmaceutiques solides particulières, administrées par VO. Ces préparations sont destinées à résister au suc gastrique et à libérer le ou les PA dans le suc intestinal. Ces propriétés sont obtenues en recouvrant la forme d'un enrobage gastrorésistant (forme entérique) ou par tout autre moyen approprié.

L'intérêt des formes gastrorésistantes est double : il peut permettre :

- la protection du principe actif contre une dégradation par les acides de l'estomac. C'est le cas par exemple des inhibiteurs de pompe à protons (comme l'ésooméprazole dans la spécialité Nexium®).

- la protection de la muqueuse gastrique contre une irritation par le principe actif. C'est le cas par exemple de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (comme l'acide acétylsalicylique dans la spécialité AspirineProtect®).

Ces formes peuvent aussi être employées en cas d'interférence du PA avec le métabolisme gastrique, ou en cas de spécificité de site d'action ou d'absorption du PA (fenêtre d'absorption).

I.1.3.2.1 Les différentes stratégies d'obtention de formes à libération retardée pour la voie orale

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour obtenir des formes gastrorésistantes. La Pharmacopée Européenne en recense trois types principaux : les granulés, les comprimés et les gélules gastrorésistants.

Les granulés gastrorésistants sont principalement obtenus après enrobage, on les dit alors «entériques». Ils sont rarement administrés directement, mais servent plutôt d'étape à l'obtention de gélules ou comprimés gastrorésistants. On trouve toutefois 2 spécialités granulés gastrorésistants sur le marché français, présentées sous forme de sachets ou de flacon (pancréas d'origine porcine, spécialité Eurobiol® et acide para-aminosalicylique, spécialité Granupas®).

Les comprimés gastrorésistants sont généralement préparés en recouvrant les comprimés d'une enveloppe gastrorésistante, ce qui est le cas le plus fréquent (comprimés entériques), ou plus rarement à partir de granulés ou de particules (microgranules, microsphères, microbilles) déjà recouverts d'un enrobage gastrorésistant.

Les capsules gastrorésistantes sont des capsules à enveloppe dure (gélules) ou molle, dont l'enveloppe ou le contenu sont gastrorésistants. Leur contenu peut être le ou les PA accompagnés ou non d'excipients, mais aussi des formes à libération retardée comme des microgranules, microsphères, petits comprimés ou petites capsules.

Ainsi, une libération différée du PA dans l'intestin peut être obtenue soit en enrobant la forme d'un film gastrorésistant, soit par des technologies pharmaceutiques plus sophistiquées, telles que les MUPS et les capsules contenant des granules gastrorésistants.

Les comprimés MUPS (Multiple Unit Pellet System) de Nexium® (Figure 4) contiennent de nombreux pellets (synonymes : microgranules, microsphères, microbilles) de 0.5 mm de diamètre recouverts d'une couche protectrice acido-résistante. Les pellets sont rapidement libérés dans l'estomac et transportés jusqu'à l'intestin où le principe actif est absorbé.

Comme dit précédemment, ces pellets à enrobage gastrorésistant peuvent aussi être présentés contenus dans une gélule. Celle-ci se désagrège dans l'estomac, libérant les pellets qui sont transportés dans l'intestin, lieu d'absorption du principe actif. Ces capsules peuvent être ouvertes, mais les pellets ne doivent pas être écrasés. Les pellets peuvent éventuellement être dispersés dans un peu de liquide pour une administration par sonde. C'est le cas par exemple de la pancréatine dans la spécialité Créon®, de la didanosine dans la spécialité Videx®, et de l'oméprazole dans la spécialité Mopral®.

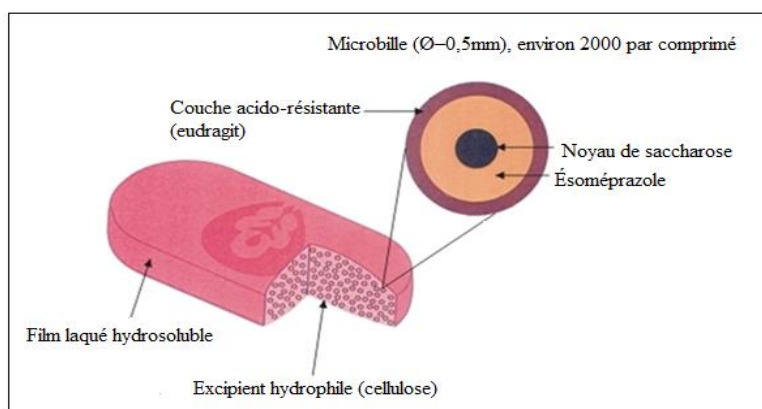


Figure 4. Comprimés MUPS (Multiple Unit Pellet System) de Nexium® (Ozarde et al., 2012)



Figure 5. Exemples de gélules contenant des pellets enrobés

Il ressort de ces différents exemples qu'il existe différents moyens d'obtenir des formes permettant une libération différée du principe actif après administration par VO, et que les plus innovantes et les plus modulables d'entre elles (en termes de posologie et de potentielles cinétiques de libération du PA) sont obtenues à partir d'une mise en forme initiale du PA sous

forme particulière, qu'il s'agisse de granulés, minigranules, mini ou microsphères/capsules. Néanmoins, ces formes sont technologiquement plus complexes à obtenir et, quelle que soit leur constitution, nécessitent traditionnellement une étape d'enrobage permettant de leur conférer leur gastrorésistance.

I.1.3.2.2 Le mode d'obtention conventionnel de formes gastrorésistantes : l'enrobage

Le pelliculage par film, introduit de manière industrielle par les laboratoires Abott en 1954, est actuellement considéré comme la principale technique de macro-enrobage pratiquée dans l'industrie pharmaceutique. Il peut être défini comme un procédé permettant de déposer sur un support solide (cristaux, grains, minigranules, comprimés...) une mince pellicule de film à base de polymère. Pour l'obtention de formes gastrorésistantes on utilisera des polymères dit entérosolubles ou gastrorésistants, dont les films sont insolubles en milieu très acide (estomac), mais solubles en milieu légèrement acide, neutre ou alcalin (intestin, pH 5 à 7,5).

I.1.3.2.2.1 La composition des films d'enrobage gastrorésistants (entérosolubles)

La plupart des polymères utilisés sont synthétiques ou semi-synthétiques (Porter *et al.*, 2017). Les polymères entériques peuvent être divisés en 3 catégories : (i) les dérivés cellulosiques modifiés (cellulose acétatephthalate, hypromellose phthalate, hypromellose acétate succinate); (ii) les copolymères de méthyle acrylate-acide methacrylique et (iii) les dérivés vinyliques et autres polymères (polyvinylacetatephthalate...) (

Tableau 2). Dans le cas des capsules la gastrorésistance peut être obtenue soit par mélange de ces polymères dans la masse gélatineuse, soit par pelliculage.

Malgré leur efficacité, ces polymères présentent de nombreuses limitations. Tout d'abord ces polymères nécessitent l'utilisation de composés chimiques dangereux, toxiques et mauvais pour l'environnement, comme par exemple du chloroéthane, du chlorométhane, du l'oxyde de propylène et des résidus phthalates durant leur production. De plus, leurs enrobages ne sont pas biodégradables et sont encadrés par les limites strictes en termes de dose autorisée par jour (Czarnocka and Alhnan, 2015).

En termes de solvant, les solvants organiques autorisés sont de plus en plus restreints. L'éthanol, l'isopropanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle sont encore acceptés, mais il existe de nombreux problèmes inhérents à leur mise en œuvre, tels que les installations antidéflagrantes très onéreuses, le recyclage obligatoire des solvants, la nécessité de protéger le personnel, la pression de la réglementation en terme de classes et de taux limites en solvants résiduels. Dans ce contexte, les dispersions aqueuses polymériques sont aujourd'hui préférées pour leurs avantages, à savoir le respect de l'environnement, la sécurité d'emploi, mais cela peut augmenter la durée de l'enrobage (Carlin *et al.*, 2008). En outre, il faut maîtriser le séchage au cours du procédé afin d'éviter une imprégnation excessive du support par l'eau, pouvant entraîner des dégradations physiques ou chimiques de la forme galénique (Wehrlé, 2012).

Tableau 2. Principaux polymères utilisés pour le pelliculage gastrorésistant (Wehrlé, 2012)

Dérivés Cellulosiques	Dérivés Acryliques	Dérivés Vinyliques
Acétylphtalate de cellulose: AQUACOAT CPD 30	Copolymère anionique d'acide méthacrylique et méthacrylate de méthyle:	Polyacétylphtalate de vinyle: OPADRY A, SURETIC
Phtalate d'hydroxypropylméthyl cellulose: HP 50 et 50F, HP 55 et 55F	EUDRAGIT L, L30D, L100-55 EUDRAGIT S, FS30D KOLLICOAT MAE 30DP KOLLICOAT MAE 100P	
Acétate/succinate d'hydroxypropylméthyl cellulose: HPMC-AS LF, MF, HF		

I.1.3.2.2.2 Les équipements permettant l'enrobage

Les appareils utilisés pour l'enrobage sont regroupés en trois grandes catégories : les turbines classiques, les turbines perforées et les lits d'air fluidisé.

En premier lieu, les turbines classiques (Figure 6) datent d'environ 140 ans, elles étaient et restent beaucoup employées. Cependant, leurs applications sont limitées à la dragéification et à l'enrobage à base de solvant organique du fait de leur faible capacité de séchage. Ces appareils sont composés d'un grand bol sphérique en acier inoxydable et ouvert tournant autour d'un axe incliné à 45°. Les sphéroïdes roulent en cascade en même temps que la

pulvérisation de la solution se produit. Le mélange en cascade peut causer des attritions des noyaux mais également des abrasions de l'enrobage.

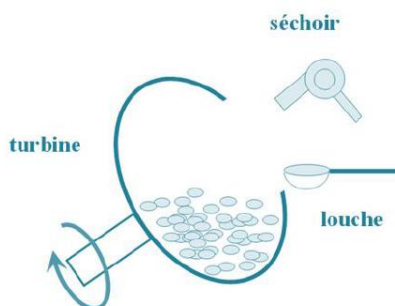


Figure 6. Schéma d'une turbine classique (Fahier, 2016)

En deuxième lieu, s'est développée la turbine perforée (Figure 7) pour subvenir aux problèmes de séchage. Le courant d'air dont la température et le débit sont réglés, est envoyé à travers le lit de noyaux en mouvement. La surface d'échange entre l'air et les sphéroïdes est augmentée, d'où un séchage plus rapide et plus efficace. De plus, l'entrée d'air est modulable, différentes positions existent (Mehta, 2008).

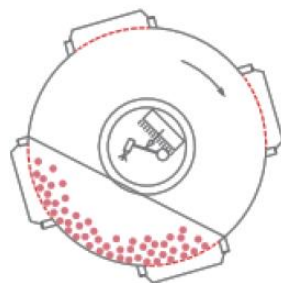


Figure 7. Schéma d'une turbine perforée Lödige (Fahier, 2016)

En dernier lieu se trouve le lit d'air fluidisé : très apprécié par sa performance de séchage, il est utilisé pour la granulation et le séchage depuis plusieurs années. Il est surtout choisi pour les systèmes d'enrobage aqueux en raison de son efficacité de séchage, de son design amélioré et de ses paramètres contrôlés.

En outre, il offre une variété de techniques d'application en proposant différentes positions de pulvérisation (Figure 8) :

- Par le haut (« *top-spray* ») : granulation, mode conventionnel
- Par le bas (« *bottom-spray* ») : Wurster
- Tangentiellement (« *tangential-spray* ») : granulateur rotatif

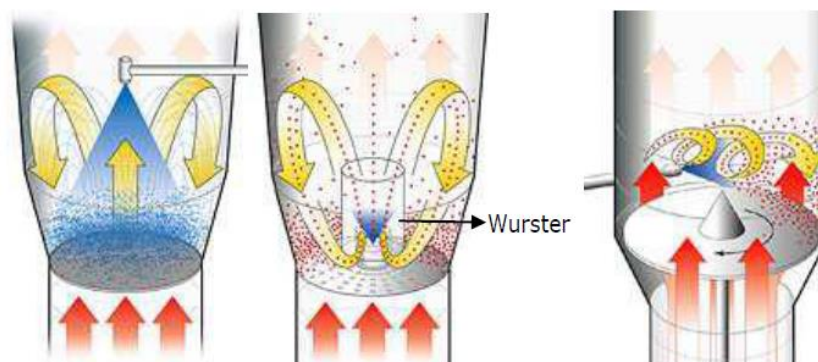


Figure 8. Les différents lits d'air fluidisé : A : Top-spray, B : Bottom-spray avec une colonne Wurster, C : Tangential-spray (Glatt GmbH, <http://www.glatt.com>)

Le « *top spray* » concerne seulement l'enrobage des petites particules. Les films formés ne sont généralement pas uniformes, c'est pourquoi on utilise cette technique pour le masquage de goût par exemple.

Le « *bottom spray* » est composé d'un système Wurster datant de 25 ans et qui connaît un grand succès. Le flux d'air est formé grâce à un système divisé et à la présence d'une pièce perforée. La majorité de l'air passe à travers les orifices mettant en mouvement les sphéroïdes vers le haut. Lorsque qu'ils entrent dans la zone extérieure du flux, la vitesse de l'air diminue et ils retombent jusqu'à être réentraînés à nouveau par le flux. Ce mouvement s'effectue sous forme de cycle. Ainsi, une forte proportion de pellets est présente dans la zone de pulvérisation. Le système Wurster est conçu pour garder les particules à l'endroit où le flux d'air est maximal. C'est pourquoi une forte capacité de séchage est possible. La taille des gouttelettes pulvérisées peut être adaptée à la taille du matériel à enrober.

Le « *tangential spray* » est composé d'un disque rotatif qui ajoute une force centrifuge à celles déjà présentes, i.e. les forces de fluidisation et la gravité. Ainsi, le mélange est rapide et efficace. Ce système peut être utilisé pour des tailles variables de particules, et le taux de liquide distribué est contrôlé. On retrouve également une efficacité de séchage et une formation de film uniforme (Mehta, 2008).

Turbine et lit d'air fluidisé peuvent être des moyens d'obtention de sphères qui pourront dans un second temps être recouvertes d'un enrobage gastrorésistant.

I.2 La Microencapsulation

I.2.1 Définition et historique

La microencapsulation regroupe un ensemble de technologies grâce auxquelles une substance active et/ou sensible, et pouvant être sous forme solide, liquide ou gazeuse, est protégée par un matériau enrobant, via la formation de particules solides. Ce procédé, outre la protection des matières actives, permet également de protéger les utilisateurs dans le cas d'actifs irritants ou toxiques, ou encore de mieux contrôler la libération des molécules actives. Les objectifs de la microencapsulation sont donc divers, mais les principales motivations sont les suivantes :

- l'augmentation de la stabilité d'actifs sensibles (à l'oxydation, à la température, à l'humidité...) ;
- la conversion de formes liquides en formes solides, en poudres fluides ;
- le masquage d'odeur et/ou de goût des molécules encapsulées ;
- la réduction de l'évaporation de matières actives volatiles ;
- la formulation de principes actifs utilisés en quantités minimales ;
- la libération modifiée et/ou contrôlée de principes actifs...

Les premières technologies de microencapsulation mécanique ont été développées dans les années 1800, alors que les premiers essais de microencapsulation par coacervation datent de 1931, lorsque deux chercheurs, Bungenburg de Jong et Kaas ont découvert ce phénomène physique qui permet de réaliser des systèmes colloïdaux (Boh, 2007). Cette technique est ensuite adaptée et modernisée, jusqu'aux années 1950 où elle est brevetée par Green et Schleider, et donne lieu à la première application industrielle de microencapsulation pour la production de papier « carbone ». Des pigments sont encapsulés dans des polymères naturels par coacervation complexe et incorporés dans les feuilles de papier. Ils sont ensuite libérés sous l'effet d'une faible pression, permettant ainsi la duplication d'un texte ou d'une figure.

Aujourd'hui, la microencapsulation permet l'immobilisation, la protection ainsi que la libération prolongée voire contrôlée de nombreux principes actifs, mais aussi l'amélioration ou la modification des propriétés fonctionnelles de ces molécules. Elle est ainsi devenue une technologie incontournable dans des applications très variées, allant de la pharmacie à l'agriculture durable, du traitement médical à l'industrie textile, en passant par la cosmétique, l'électronique et de nombreux autres domaines d'applications (Paulo and Santos, 2017).

I.2.2 Classification des microparticules

La microencapsulation regroupe conventionnellement les techniques permettant de produire des particules de taille comprise entre 500nm et 500µm. Pour des tailles inférieures, on parlera de nanoparticules, et au-delà de minigranules ou miniparticules. Les microparticules sont généralement sphériques, mais elles peuvent aussi avoir des formes plus irrégulières, notamment dans le cas d'encapsulation de PA solides.

D'un point de vue morphologique, les microparticules sont classées en deux catégories principales : les microcapsules et les microsphères (Figure 9). La microcapsule est habituellement décrite comme une particule réservoir au cœur de laquelle le PA est protégé et entouré par une paroi, enveloppe solide de matériau enrobant, alors que la microsphère est une microparticule dans laquelle le PA est dissous de façon homogène ou finement dispersé dans réseau macromoléculaire tridimensionnel (Benita, 2006, Packhauser *et al.*, 2005).

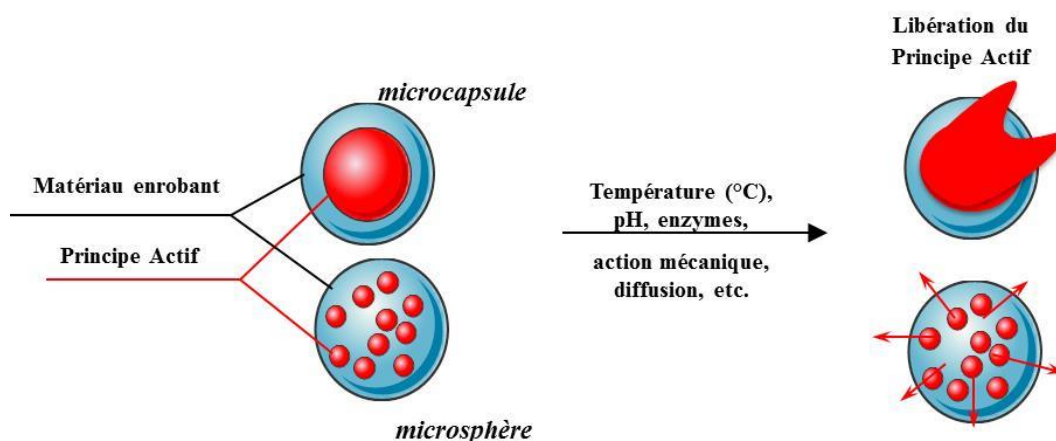


Figure 9. Types des microparticules (Nesterenko, 2012)

Il existe également des morphologies plus complexes (microparticules à double enveloppe, microsphère à double cœur...) suivant les procédés d'encapsulation et les applications.

Le taux d'encapsulation, i.e. la teneur en principe actif, est variable et fortement dépendant de la morphologie des microparticules. Il peut atteindre des valeurs très élevées (jusqu'à 90%) dans le cas des microcapsules, alors qu'il est généralement beaucoup plus faible, entre 20% et 50% dans le cas des microsphères.

La libération du principe actif dépend des caractéristiques des particules. Elle peut se produire de différentes manières : par rupture mécanique (application d'une pression ou d'un

cisaillement), attaque enzymatique, action de la lumière, élévation de la température, solubilisation dans l'eau ou tout autre solvant approprié, augmentation de la pression interne par dégagement gazeux, réaction chimique, hydrolyse, désintégration/érosion lente du matériau, diffusion progressive à travers la membrane ou le matériau support de la particule.

I.2.3 Les procédés de microencapsulation

Les techniques de microencapsulation sont variées. Il existe plusieurs classifications de ces techniques, selon ou non l'utilisation de solvants organiques, leur coût énergétique, ou encore selon leur domaine d'application. Cependant, la classification la plus courante est celle distinguant trois types de procédés : les procédés chimiques, les procédés physico-chimiques et les procédés mécaniques, comme présenté dans le Tableau 3 (Ré, 2006).

Tableau 3. Procédés de microencapsulation.

Procédés chimiques	Procédés physico-chimiques	Procédés mécaniques
<ul style="list-style-type: none"> • Polymérisation interfaciale • Polymérisation en milieu dispersé • Polymérisation radicalaire ou anionique • Inclusion moléculaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Évaporation-extraction de solvant (séparation des phases organiques) • Gélification thermique • Coacervation simple ou complexe (séparation de phase aqueuse) 	<ul style="list-style-type: none"> • Atomisation • Enrobage en lit fluidisé • Gélification de gouttes • Extrusion • Procédés basé sur la technologie des fluides supercritiques

L'encapsulation par voie chimique (hormis dans le cas de l'inclusion moléculaire) consiste en la polymérisation d'un ou plusieurs monomère(s) autour de la matière active (pure ou en solution) conduisant à la formation in situ d'une membrane de protection. Plusieurs types de polymérisation peuvent être envisagés, polycondensation, polymérisation radicalaire ou anionique.

Les procédés physico-chimiques sont eux basés sur les différences de solubilité et les conditions de précipitation des matériaux enrobants. Il s'agit dans le cas de la coacervation, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution par ajout d'un non solvant ou d'un polymère incompatible. Les autres techniques sont basées sur la variation de la température

du milieu (évaporation de solvant) ou sur le changement d'état (solidification) des matériaux enrobants.

Enfin les procédés mécaniques sont basés sur des technologies déjà existantes, comme l'atomisation ou le lit fluidisé, qui sont des procédés de séchage, ou l'utilisation des fluides supercritiques et l'extrusion qui sont déjà utilisés en tant que procédés d'extraction, et qui sont détournés pour une application en microencapsulation.

I.2.4 La microencapsulation dans le domaine pharmaceutique

I.2.4.1 Introduction

Les premières études de microencapsulation dans le domaine pharmaceutique datent de 1931, lorsque des microbilles de gélatine encapsulant un actif ont été préparées par coacervation. La première formulation à libération prolongée commerciale, obtenue à partir de la technologie Spansules™ (développée par Smith Kline et French), date de 1952 et consiste en des gélules remplies de microgranules chargés en dextroamphétamine sulfate (Dexedrine®) (Maderuelo *et al.*, 2011). À partir du milieu des années 70, la microencapsulation a connu un essor considérable en médecine et pharmacie (encapsulation de vitamines, de principes actifs, de bactéries et autres cellules vivantes...).

Au fil des décennies, l'industrie pharmaceutique s'est appuyée sur le développement de différentes stratégies et technologies permettant d'obtenir la libération contrôlée de PA, dont la microencapsulation (Gupta and Dey, 2013, Boh, 2007).

Les principaux intérêts de la microencapsulation dans le domaine de la santé sont :

- de modifier les propriétés qui limitent leur adéquation à la voie d'administration envisagée (comme leur insolubilité, réactivité, etc...);
- de les protéger des différents facteurs qui peuvent être responsables de leur dégradation, comme par exemple les enzymes et les variations de pH de la voie digestive ;

- de contrôler leur cinétique de libération en vue d'un ciblage, de maîtriser leur vitesse de libération ou leur temps de demi-vie (Figure 10) (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2012).

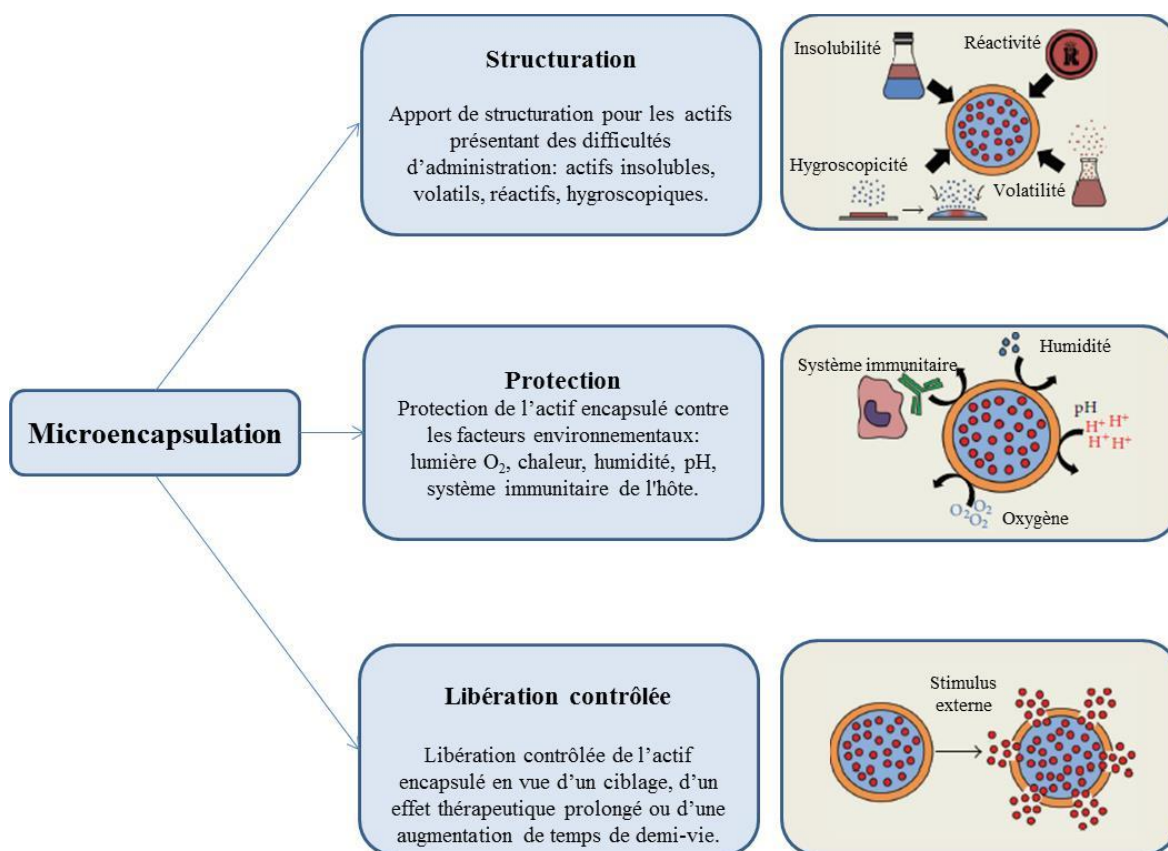


Figure 10. Intérêts de l'encapsulation dans le domaine de la santé (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2012)

Aujourd'hui, les recherches dans ce domaine sont majoritairement axées vers la libération prolongée de PA. Mais d'autres systèmes sont aussi développés, visant à l'amélioration de la biodisponibilité du principe actif, la libération du principe actif sur des sites spécifiques, la réduction des effets indésirables et/ou des effets secondaires, l'adaptation de la forme galénique au mode d'administration visé, ou encore l'amélioration du confort du patient (Paulo and Santos, 2017).

Il existe peu de médicaments issus de la microencapsulation disponibles sur le marché (Tableau 4) (Stevenson, 2009). Cela s'explique par la difficulté d'obtenir une bonne reproductibilité en termes de contrôle de taille et de distribution de tailles des microparticules, dans le cas de procédés de production à grande échelle. Le maintien de la bioactivité de l'actif thérapeutique au cours des différentes étapes du procédé constitue aussi bien souvent un challenge.

Tableau 4 Matériaux et procédés de microencapsulation les plus couramment utilisés dans le domaine de la santé (Wehrlé, 2012).

Matériaux enrobants	Procédés	Applications Principales	Produits commercialisés en France
Homopolymères et copolymères des acides lactique et glycolique (PLA, PLGA)	Évaporation-extraction de solvant. Milieu supercritique Atomisation Coacervation simple Extrusion-broyage-sphéronisation	Libération prolongée de petites molécules ou de peptides par voie parentérale	Enantone LP Sandostatine LP Décapeptyl LP Somatuline LP Risperdal Consta
Copolymères acryliques	Évaporation-extraction de solvant Atomisation, Spray-coating	Libération prolongée, gastrique, entérique et masquage de goût par voie orale	
Éthylcellulose Hydroxypropyméthylcellulose Esters de cellulose	Coacervation simple Atomisation, Spray coating Évaporation-extraction de solvant	Masquage de goût et libération prolongée par voie orale	Pentasa Diffu-K
Gélatine / Polysaccharides	Coacervation complexe	Pharmacie – Parfums – Arômes	Parapsyllium
Chitosane	Coacervation complexe Gélification ionique Atomisation, Spray-coating (enrobage)	Libération gastrique et masquage de goût pour la voie orale	
Alginate de sodium	Coacervation complexe Gélification ionique	Encapsulation de cellules et levures Parfums – Arômes Cosmétiques – Agro-alimentaire	
Cires	Milieu supercritique Spray-coating	Masquage de goût Chimie-Cosmétique	
Corps gras solides (esters, alcools, acides gras)	Milieu supercritique Congélation de gouttes	Masquage de goût Chimie-Cosmétique	
Glycérides	Gélification thermique (Hot melt)	Masquage de goût Chimie-Cosmétique	
Amidon	Atomisation	Ferments – Épices – Huiles – Vitamines	Biacton (vétérinaire)
Polyurée (diamine + diisocyanate)	Polycondensation interfaciale	Phytosanitaire	Penncap M. Sectrol

I.2.4.2 Les procédés d'encapsulation utilisés en pharmacie pour la voie orale

Les systèmes à libération contrôlée de principes actifs doivent maintenir une efficacité thérapeutique maximale du principe actif encapsulé, permettre la délivrance de la quantité de PA appropriée, et ce sur la durée adaptée. En ce sens, le choix de la méthode d'encapsulation en fonction des propriétés physico-chimiques de chaque PA est essentiel pour atteindre les objectifs souhaités (Paulo and Santos, 2017).

Dans le cas de l'administration par voie orale, les microparticules contenant le PA doivent également satisfaire aux critères suivants (Agnihotri *et al.*, 2012) :

- des concentrations en PA raisonnablement élevées ;
- une stabilité et une durée de conservation cliniquement acceptable ;
- une taille de particules maîtrisée ;
- une libération du PA contrôlée ;
- une biocompatibilité et une biodégradabilité contrôlable.

Pour ce faire, les techniques de microencapsulation les plus utilisées sont l'atomisation, le prilling, l'évaporation de solvant et la coacervation.

I.2.4.2.1 L'atomisation

L'atomisation (ou spray-drying) est un procédé mécanique continu de séchage, qui permet la transformation d'une phase liquide en une poudre sèche. Cette technique est peu coûteuse, simple, rapide et largement utilisée industriellement dans des applications de séchage mais également de microencapsulation (Abbas *et al.*, 2012, Bruschi *et al.*, 2003).

La préparation de la phase liquide en amont de l'atomisation est essentielle. Dans le cas de la microencapsulation, elle consiste à formuler principe actif et matériau enrobant dans un solvant (le plus souvent aqueux). Dans le cas où PA et matériau enrobant sont tous deux solubles dans le solvant, une solution sera obtenue. Mais le PA peut également être émulsionné, ou même dispersé dans la phase solvant dans laquelle le matériau enrobant aura été préalablement dispersé ou solubilisé. Les préparations liquides atomisées peuvent donc être des solutions, des émulsions, ou encore des dispersions (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Une

étape d'homogénéisation est très souvent envisagée afin de stabiliser ces préparations liquides.

L'atomisation en elle-même consiste en la pulvérisation de cette phase liquide et à son séchage grâce à la circulation d'un courant d'air chaud au sein d'un appareil appelé atomiseur (Figure 11). La phase liquide est pulvérisée dans une haute tour appelée chambre d'atomisation via une buse d'atomisation. Le flux d'air chaud circulant à travers la chambre d'atomisation sèche les gouttelettes de solution et le solvant s'évapore. Le séchage est considéré comme effectif lorsque la température de la particule formée est égale à celle de l'air en sortie de la chambre d'atomisation. Le flux d'air chaud entraîne l'air chargé en molécules de solvant et les microparticules en direction du cyclone, pièce dont la géométrie permet la séparation et la récupération des microparticules dans un récipient appelé collecteur. L'air est évacué vers la sortie après passage à travers un filtre.

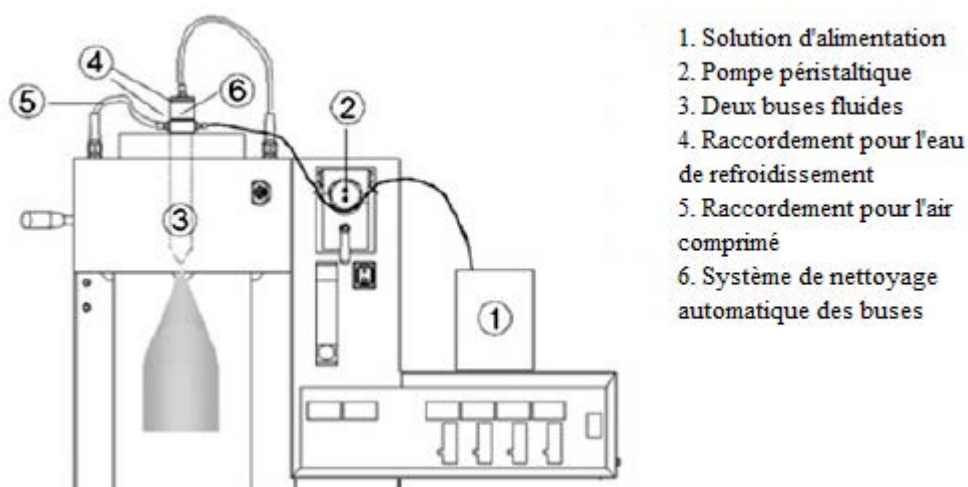
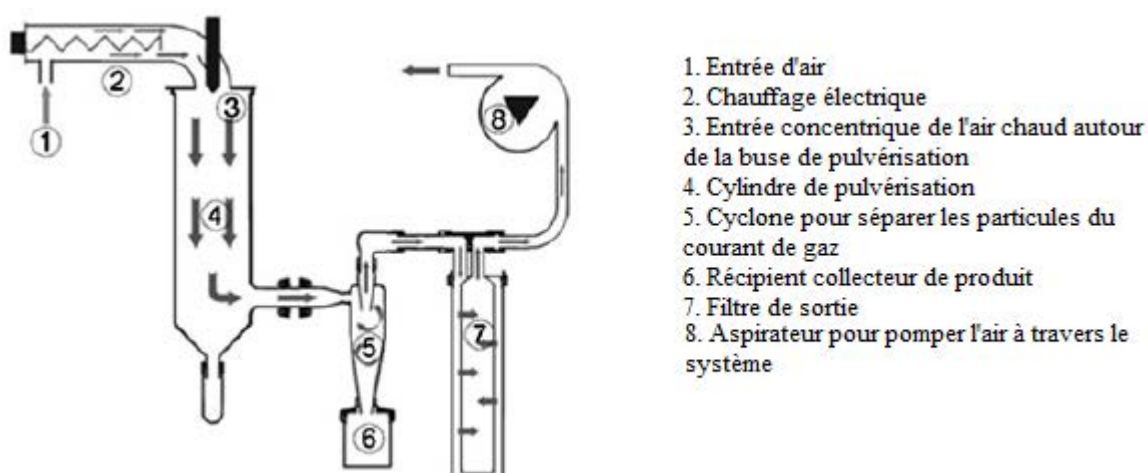


Figure 11. Présentation schématique du procédé d'atomisation (Murugesan and Orsat, 2012).

La circulation de l'air chaud à travers l'atomiseur peut s'effectuer suivant deux configurations différentes (Figure 12) :

- à co-courant : la phase liquide est pulvérisée dans le même sens que le flux d'air chaud ;
- à contre-courant : le flux d'air chaud est opposé au sens de pulvérisation de la préparation liquide.

La configuration choisie peut avoir une influence sur les propriétés finales des microparticules, particulièrement en termes de taille moyenne. En effet, la taille moyenne des microparticules obtenues par atomisation varie de $1\mu\text{m}$ à $100\mu\text{m}$ pour un séchage à co-courant contre $50\mu\text{m}$ à $200\mu\text{m}$ pour un régime à contre-courant, en raison d'une plus fréquente agrégation des petites particules avec les plus grandes. Dans les deux cas, les microparticules obtenues sont de type matriciel, de forme relativement sphérique.

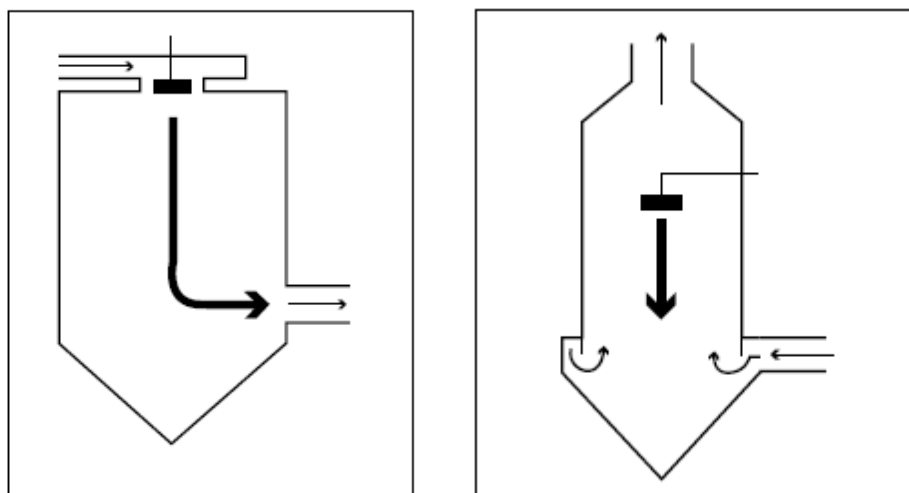


Figure 12. Schéma de principe d'un appareillage d'atomisation : a) à co-courant b) à contre-courant (Buchi Corporation)

L'atomisation est largement utilisée dans l'agro-alimentaire, notamment pour le séchage industriel du lait depuis les années 30. Elle est utilisée dans l'industrie pharmaceutique depuis les années 40. Cette technique a notamment permis l'encapsulation de matières biologiques (enzymes, protéines comme la triptoréline dans le cas du Decapeptyl®) sensibles à la chaleur avec une perte minimale de leur activité (Wright and Hoffman, 2012). Mais cette technique est également utilisée pour le séchage d'excipients pharmaceutiques, tels que le lactose, à qui elle confère une meilleure compressibilité et des propriétés d'écoulement améliorées, pour la production de comprimés (Ré, 2006).

I.2.4.2.2 Le prilling

Le prilling est une technique qui consiste en la production de gouttelettes par extrusion d'une solution de polymère à travers une buse en vibration (Poncelet and Dreffier, 2007). L'encapsulation par prilling consiste à dissoudre ou mettre en suspension le principe actif dans une phase liquide contenant le matériau enrobant (soit fondu soit en solution), puis à extruder cette solution (Figure 13). Les gouttelettes formées sont ensuite récupérées dans un bain de durcissement, dans lequel le polymère est réticulé ou gélifié (De Kruif *et al.*, 2014).

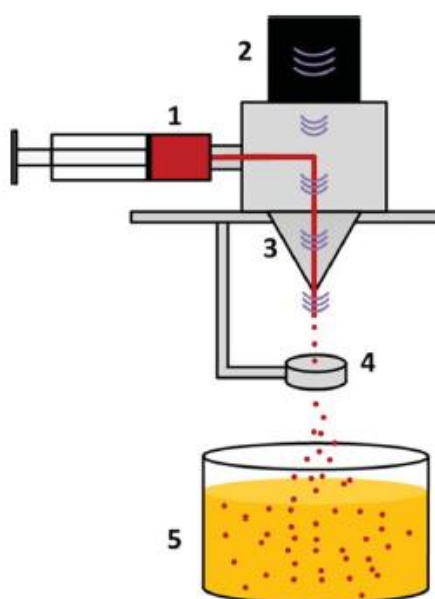


Figure 13. Représentations schématiques des appareils à buse vibrante. 1. Système de pompage (seringue) contenant l'API et la solution polymère; 2. Unité vibrante; 3. Buse; 4. Bague d'électrode; 5. Bain de durcissement (De Kruif *et al.*, 2014).

L'intérêt principal de cette technique est de former des gouttes avec une distribution de taille étroite, l'écart type étant inférieur à 10% de la taille moyenne (Poncelet and Dreffier, 2007). Elle offre de plus un rendement d'encapsulation élevé, notamment en comparaison de l'atomisation pour laquelle il est plus difficile d'obtenir de haut taux d'encapsulation.

Ces atouts en font une technique particulièrement prisée par le domaine pharmaceutique, que ce soit pour l'immobilisation de micro-organismes ou l'encapsulation et la libération contrôlée et ciblée de principes actifs (Heinzen *et al.*, 2002). Cependant, la taille moyenne des microparticules obtenues est sensiblement plus élevée que celle des particules obtenues par d'autres procédés (supérieure à 200 μ m).

Différents systèmes de matériaux enrobants peuvent être envisagés :

- les billes lipidiques, qui ont pour finalité de piéger un PA dans une matrice lipidique (bille pleine) pour un relargage immédiat ou contrôlé après une administration par voie orale. La préparation de ces billes consiste en la fusion d'excipients lipidiques dans lesquels le PA est solubilisé ou dispersé. Ce mélange est ensuite extrudé au travers d'une buse vibrée, à la sortie de laquelle la dispersion obtenue est refroidie lors de sa chute dans la tour de prilling, produisant ainsi des billes solides, sphériques et monodisperses en taille. Les excipients lipidiques (acides gras tels que l'acide stéarique) peuvent également être conjugués avec des excipients plus hydrophiles, tel le polyéthylène glycol, afin de moduler la vitesse de libération du PA (Vervaeck *et al.*, 2013, Vervaeck *et al.*, 2014).
- les billes d'alginate, qui permettent d'obtenir des capsules de PA enveloppé par un film d'alginate réticulé. L'alginate est un polysaccharide composé d'acides mannuroniques et guluroniques qui peut réticuler en présence de cations bivalents comme Ca^{2+} . Le PA est solubilisé, émulsionné ou dispersé dans une solution d'alginate. La phase liquide ainsi préparée est ensuite extrudée à travers la buse, et les gouttelettes alors formées tombent dans un bain d'agent gélifiant (solution chargée en cations bivalents) afin de faire réticuler/gélifier l'alginate (Del Gaudio *et al.*, 2005, Auriemma *et al.*, 2011).
- d'autres polymères sont également utilisés pour encapsuler des actifs pharmaceutiques par prilling, tels que le chitosane (De Kruif *et al.*, 2014) ou le poly (lactide-co-glycolide) (Zvonar *et al.*, 2009), sur le même principe qu'avec l'alginate.

Les paramètres « procédé » qui permettent d'optimiser les rendements d'encapsulation particulièrement élevés (pouvant dépasser les 90%) et les profils de libération des PA sont la viscosité de la phase liquide, la sélection de l'agent de réticulation, le pH de la solution de gélification et le temps de réticulation (Auriemma *et al.*, 2013).

I.2.4.2.3 L'évaporation de solvant

La microencapsulation par évaporation de solvant consiste en la solubilisation d'un polymère, qui formera la matrice de la microparticule, dans un solvant organique, dans lequel le PA peut ensuite être dissous, dispersé ou émulsifié. Cette première solution est ensuite émulsionnée dans une phase aqueuse ou huileuse contenant un émulsifiant. Une fois l'évaporation du solvant intervenue, les microsphères sont récupérées par filtration et séchage (Figure 14).

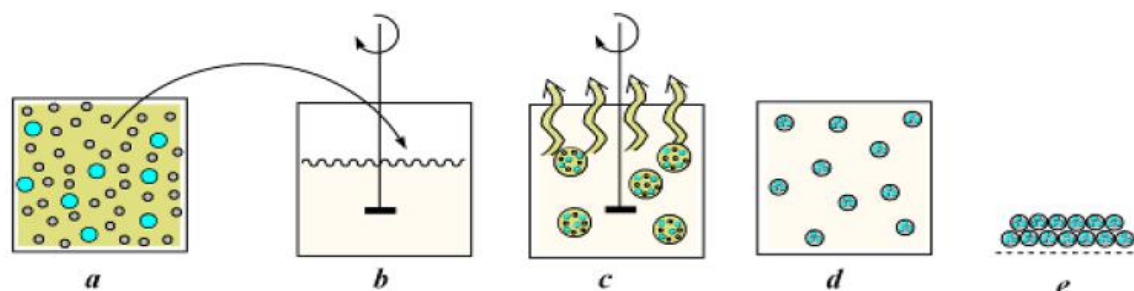


Figure 14. Principe du procédé de microencapsulation par évaporation du solvant : (a) matière active dispersée dans la solution organique de polymère, (b) mise en émulsion de la phase organique dans la phase aqueuse, (c) évaporation du solvant organique de la phase dispersée, (d) formation d'enrobage de polymère et (e) séchage des microparticules (Nesterenko, 2012).

C'est une technique couramment utilisée dans le domaine de la pharmacie pour encapsuler des médicaments faiblement hydrosolubles, voire hydrophobes comme le cisplatine, la lidocaïne, la naltrexone, la progestérone (Li et al., 2008b, Truong-Le et al., 2015).

Les microparticules obtenues sont généralement de type matriciel, et de taille variant entre 0.5 et 200 μm . Les taux d'encapsulation sont de l'ordre de 30 à 40% pour de très bons rendements, pouvant atteindre les 100%. Toutefois, ce procédé possède quelques limites, notamment du fait de traces résiduelles de solvant organique dans les microparticules, et de la difficulté du recyclage du solvant à l'échelle industrielle.

Les polymères les plus utilisés pour cette technique sont le PLA (poly-L-lactide) et le PLGA (poly(D-L-lactide-co-glycolide)) (Gaignaux *et al.*, 2012). Depuis 1989, Lupron Depot[®] (Takeda ; commercialisé sous le nom d'Enantone LP en France) est disponible sur le marché. Il s'agit de microparticules à base de PLGA contenant de l'acétate de leuproréline pour le traitement du cancer de la prostate (Okada, 1997).

Cependant, de plus en plus de travaux mentionnent l'intérêt de l'incorporation de polyéthylène glycol (PEG) via des copolymères PLA-PEG-PLA. L'ajout de PEG a permis une augmentation de l'efficacité d'encapsulation (Park and Kim, 2004), mais aussi de la biocompatibilité des microsphères, le PEG se plaçant majoritairement à leur surface de par ses propriétés hydrophiles (Ruan and Feng, 2003). Une augmentation sensible de la taille des particules obtenues a également été observée suite à l'ajout de PEG au sein du matériau enrobant (Park and Kim, 2004).

Certains travaux mentionnent également l'utilisation de la polycaprolactone (PCL) (Chen *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2008a), polymère synthétique biocompatible.

I.2.4.2.4 La coacervation simple ou complexe

La coacervation consiste en la séparation d'un système colloïdal en deux phases liquides. La première phase est la phase coacervée (la plus concentrée) et la deuxième phase est le surnageant ou solution d'équilibre (Renard and Reddy, 2007, de Kruif *et al.*, 2004). Deux méthodes de coacervation sont possibles : simple ou complexe.

La coacervation simple consiste en une répulsion liée à leur différence de polarité entre deux solutés, dont l'un est un polymère. Après variation du pH, de la température, ou encore par addition d'un non solvant ou d'un électrolyte, la désolvatation du polymère qui formera le coacervat (Dong and Bodmeier, 2006).

La coacervation complexe consiste, elle, en la désolvatation simultanée de deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées, provoquée par une modification du pH du milieu, l'attraction électrostatique des deux polyélectrolytes provoquant alors l'apparition d'un coacervat mixte (Xiao *et al.*, 2014).

La microencapsulation par coacervation (simple ou complexe) consiste à provoquer la précipitation des polymères enrobants par séparation de phase autour du principe actif préalablement dispersé ou émulsionné dans la solution de polymère(s). Les gouttelettes de polymère(s) coacervé(s) viennent s'adsorber à la surface du principe actif et former un enrobage continu (Figure 15).

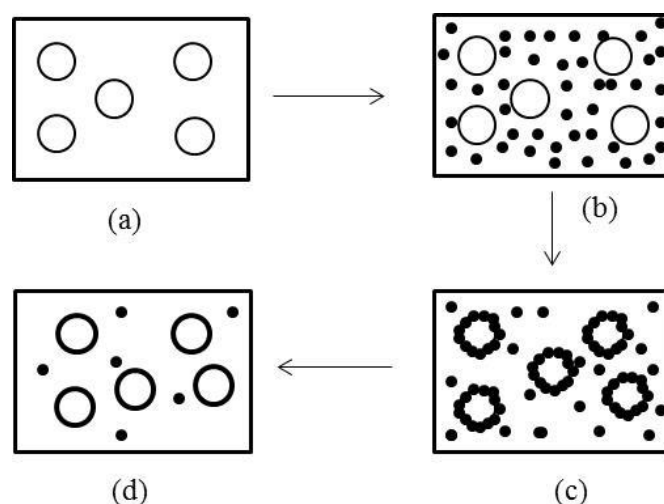


Figure 15. Représentation schématique du principe d'encapsulation par coacervation (a) dispersion du principe actif dans la solution de polymère; (b) précipitation du coacervat; (c) encapsulation du principe actif par des microgouttelettes de coacervat ; (d) coalescence du coacervat en une phase continue autour du principe actif (Jyothi *et al.*, 2012).

Les particules obtenues par coacervation, simple ou complexe, ont des tailles variant de quelques μm à quelques centaines de μm , et leur taux d'encapsulation peut atteindre jusqu'à 90%.

La microencapsulation de principes actifs pharmaceutiques par coacervation est apparue dans les années 1960, avec les travaux de Phares et Sperandio (Phares and Sperandio, 1964a, Phares and Sperandio, 1964b), dans lesquels des actifs solides étaient encapsulés par coacervation simple par addition de sulfate de sodium dans une solution aqueuse de gélatine.

L'utilisation de la gélatine est largement répandue, du fait de ses propriétés gélifiantes, aussi bien en coacervation simple qu'en coacervation complexe, puisqu'elle peut jouer le rôle de polycation (Truong-Le *et al.*, 2015).

La coacervation complexe est également utilisée pour encapsuler certains principes actifs pharmaceutiques, grâce à des couples de polymères polyélectrolytes, très souvent d'origine naturelle, tels que gélatine/gomme arabique (Palmieri *et al.*, 1996), gélatine/gomme de guar (Thimma and Tammishetti, 2003) ou encore protéine de soja/pectine (Nori *et al.*, 2011).

En vue d'une application industrielle, les microparticules ainsi formées doivent être séchées. Les procédés de séchage couramment utilisés sont l'atomisation ou la lyophilisation. Le mode de séchage utilisé peut avoir une influence sur le taux d'encapsulation ainsi que sur les profils de libération (Palmieri *et al.*, 1996).

I.2.4.3 Les polymères naturels pour l'encapsulation du Principe Actif

Le choix d'un matériau enrobant approprié constitue une étape clé dans le processus d'encapsulation. Sa sélection dépendra des caractéristiques désirées des microparticules (taille, charge, porosité, dégradabilité, résistance mécanique), du principe actif à encapsuler (solubilité, polarité, stabilité) et du mode de libération du PA souhaité (pH, force ionique, température) (Davidov-Pardo *et al.*, 2015, Gharsallaoui *et al.*, 2007). En ce sens, les propriétés intrinsèques du polymère, notamment sa non-toxicité, sa biodégradabilité, ses propriétés mécaniques, filmogènes, sa stabilité, mais aussi son coût jouent un rôle décisif (Gharsallaoui *et al.*, 2007, Sharif *et al.*, 2017). La libération de l'actif sur son site d'action, à la concentration requise et pour la durée souhaitée repose sur lui (Ma and Coombes, 2014).

À l'heure actuelle, il existe une variété de matériaux enrobants disponibles pour la microencapsulation de principes actifs pharmaceutiques. En raison de leur excellente biocompatibilité, de nombreux travaux ont porté sur les polyesters biodégradables de type PLA, PLGA ou encore PCL. Pour des applications destinées à la voie orale dans les domaines agro-alimentaire, médical, pharmaceutique et vétérinaire, seuls les matériaux approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) sont utilisés.

De par l'intérêt croissant de s'affranchir des polymères issus de la pétrochimie, ainsi que grâce à leur très faible toxicité et à leur biodisponibilité, les polymères d'origine naturelle sont des candidats de choix pour la microencapsulation d'actifs. Les polymères naturels les plus utilisés en tant que matériau enrobant en microencapsulation sont les polysaccharides, certains lipides et les protéines (Song *et al.*, 2011).

Le Tableau 5 rassemble les principaux polymères naturels utilisés en microencapsulation en fonction de leur origine.

Tableau 5. Polymères naturels utilisés en microencapsulation (Renard and Reddy, 2007).

Origine	Polysaccharide	Protéine	Lipide
Végétale	Amidon	Gluten (blé)	Huile de palme, hydrogénée
	Cyclodextrine	Isolats (pois, soja, pois chiche, lentilles, riz, tournesol, féverole)	Huile de ricin hydrogénée
	Cellulose		Lécithine (soja)
	Pectine		Cires
	Gomme arabique		
	Gomme caroube		
	Gomme guar		
Marine	Carraghénane		
	Alginate		
	Agarose		
Microbienne ou animale	Xanthane	Protéines du lait	Lécithine (œuf)
	Dextrane	Caséines	
	Chitosane	Protéines du lactosérum	
	Gellane	Collagène, gélatine, albumines	
Génétique		Protéines recombinantes	

Les polysaccharides ont largement fait leur preuve dans le domaine de la microencapsulation et sont d'usage courant dans de nombreux secteurs d'activité (cosmétique, textile, pharmacie, agro-alimentaire). La microencapsulation à base de protéines se développe depuis quelques années comme nouvelle voie de recherche, avec comme objectif d'associer leur propriétés

physicochimiques spécifiques à leurs atouts nutritionnels, les applications potentielles en nutraceutique y contribuant fortement (Renard and Reddy, 2007, Vandamme *et al.*, 2007). Un autre argument motivant ce développement est que les coûts de production des protéines, en particulier végétales et laitières, ont fortement diminué au cours des 30 dernières années. Leur caractère amphiphile et leurs excellentes propriétés fonctionnelles en font des polymères de choix pour des applications dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou encore cosmétique.

Les protéines peuvent provenir d'une source animale ou végétale, et ont une variété de propriétés physico-chimiques (poids moléculaire, polarité, solubilité, point isoélectrique...) qui leur confèrent des caractéristiques leur permettant d'être utilisées avec les différentes techniques d'encapsulation, soit seules, soit combinées à d'autres polymères.

Les protéines animales ont déjà fait leur preuve, notamment dans l'industrie alimentaire. Les protéines couramment utilisées sont l'albumine de sérum bovin (BSA), les protéines d'œufs, le collagène, la gélatine, la caséine ou encore les protéines de lactosérum (Davidov-Pardo *et al.*, 2015).

De ce fait ces protéines sont aussi largement utilisées dans le domaine pharmaceutique en tant qu'excipients pour la voie orale. La gélatine est la plus utilisée d'entre elles, puisqu'elle permet l'obtention de gélules et capsules molles, formes largement employées pour l'administration par VO. En ce qui concerne la microencapsulation, gélatine, collagène, albumine, fibroïne de soie, caséine sont largement décrites dans la bibliographie pour l'encapsulation d'actifs pharmaceutiques du fait de leur excellente biocompatibilité et de leurs capacités d'interaction avec des PA hydrophiles ou hydrophobes (Tableau 6). Les protéines animales, comme la caséine, ont beaucoup été étudiées, et ont montré leur faisabilité, notamment en raison de leur meilleure solubilité, sur une plus grande gamme de pH, en comparaison avec les protéines végétales, et de leur caractère plus flexible, leur permettant de diffuser plus rapidement à l'interface avec la matière active et ainsi de la stabiliser plus efficacement (Can Karaca *et al.*, 2015).

Tableau 6. Principales protéines animales utilisées pour des applications pharmaceutiques et leurs caractéristiques (Tarhini et al., 2017).

Protéine	Masse moléculaire	pH isoélectrique	Caractéristiques
Gélatine	15-250kDa	7-9 (type A) 4-5 (type B)	<ul style="list-style-type: none"> - Faible toxicité, biodégradabilité des produits finaux et biocompatibilité - Efficacité supérieure d'encapsulation pour les médicaments hydrophiles - Forme dénaturée de collagène utilisée comme ingrédient dans les formulations médicamenteuses - Possède de nombreux groupes fonctionnels carboxyles pour la réticulation
Collagène	300kDa	4,7- 4,8	<ul style="list-style-type: none"> - Faible toxicité, biodégradabilité et immunogénicité - Protéine structurale avec haute teneur en glycine, hydroxyproline et hydroxylysine - Contient des groupes carboxyles et des groupes amino secondaires offrant des possibilités de réticulation
Albumine	66.5kDa	4,7	<ul style="list-style-type: none"> - Molécule bioconjuguée hydrophile - Interagit avec des PA hautement hydrophobes - Extrêmement robuste à diverses conditions - Se lie à de nombreux médicaments tels que les composés indole, la pénicilline et les benzodiazépines - Non-toxicité, biodégradabilité et immunogénicité - Protéine plasmatique la plus abondante
Soie	Fibroïne de soie 60-150kDa	3-5	<ul style="list-style-type: none"> - Produit par certains insectes et araignées - Sert de trame pour l'immobilisation d'enzymes - Traitement facile pour obtenir différentes morphologies
Caséine	α s1: 23kDa α s2: 25kDa β : 24kDa κ : 19kDa	4,6	<ul style="list-style-type: none"> - Interagit facilement avec des PA hydrophobes - Très tolérant aux conditions opératoires - Produit final dégradable non toxique - Pas de pont disulfure

Plus récemment, la bêta-lactoglobuline et les protéines du lactosérum ont montré des propriétés particulièrement intéressantes pour des applications par voie orale (Tableau 7) (Caillard and Subirade, 2012); (Hsein et al., 2017b); (Hsein et al., 2017a).

Tableau 7. Exemples d'applications pharmaceutiques récentes impliquant des protéines animales.

Protéine	Forme	Principe actif	Reference
β -lactoglobuline*	Comprimés	Riboflavine	(Caillard and Subirade, 2012)
Isolats de protéines de lactosérum*	Comprimés	NA	(Caillard <i>et al.</i> , 2012)
β -lactoglobuline*	Comprimés	Bifidobacterium longum HA-135	(Poulin <i>et al.</i> , 2011)
Caséine	Nanoparticules	Flutamide	(Elzoghby <i>et al.</i> , 2013)
β -lactoglobuline / pectine*	Gouttelettes	Piroxicam	(Shamsara <i>et al.</i> , 2017)
Protéine de lactosérum dénaturée*	Comprimés mucoadhésifs	Théophylline	(Hsein <i>et al.</i> , 2017b)
Protéine de lactosérum dénaturée*	Comprimés mucoadhésifs	Théophylline	(Hsein <i>et al.</i> , 2017a)
α -Amylase*	Microsphères	Maltose	(Avivi and Gedanken, 2007)
Gélatine	Nanoparticules	Paracétamol	(TaHERi Qazvini and Zinatloo, 2011)
Gélatine	Nanoparticules	Didanosine	(Jain <i>et al.</i> , 2008)
Collagène	Nanoparticules	Estradiol-hémihydrate	(Nicklas <i>et al.</i> , 2009)
Collagène	Microparticules	Tétracaine	(Rössler <i>et al.</i> , 1995)
Albumine	Nanoparticules	Noscapine	(Sebak <i>et al.</i> , 2010)
Gélatine	Nanoparticules	Chlorhydrate de tizanidine, gatifloxacine et fluconazole	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
Gélatine	Nanoparticules	Indométhacine	(Kumar <i>et al.</i> , 2011)
Sérum albumine humaine	Nanoparticules	Docétaxel	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
Soie	Particules	Rhodamine B	(Lammel <i>et al.</i> , 2010)
Caséine*	Nanoparticules	Acide folique	(Penalva <i>et al.</i> , 2015)
Concentré de protéines de lactosérum	Hydrogels	Caféine	(Gunasekaran <i>et al.</i> , 2006)
Protéine de lactosérum	Hydrogels	Caféine	(Gunasekaran <i>et al.</i> , 2007)
Protéine de lactosérum/pectine	Nanoparticules	Lactoferrine	(Raei <i>et al.</i> , 2017)
Kératine	Microparticules	N-aminophényl acétamide	(Rajabinejad <i>et al.</i> , 2018)
Fibroïne de soie / albumine	Nanoparticules	Méthotrexate	(Subia and Kundu, 2012)

* Formulations décrites spécifiquement pour une administration par voie orale

A l'heure actuelle les protéines animales sont les protéines les plus utilisées dans le domaine pharmaceutique. Cependant, les protéines animales présentent certains inconvénients, comme :

- leur coût plus élevé que celui des protéines végétales ;
- un risque de contamination : risque de maladies comme l'encéphalopathie spongiforme bovine ;
- des restrictions d'utilisation alimentaires (régimes végétariens) et culturelles, de sorte que l'intérêt pour les protéines végétales comme matériau enrobant en microencapsulation a considérablement augmenté (Davidov-Pardo *et al.*, 2015).

Bien que les protéines d'origine animale aient de meilleures qualités nutritionnelles, les protéines végétales peuvent se substituer à ces dernières, car elles présentent l'avantage d'être peu coûteuses, de ne pas présenter de risque sanitaire et d'être accessibles en grande quantité. Les protéines végétales, ayant un caractère hydrophobe marqué, présentent une compatibilité plus élevée pour l'encapsulation de principes actifs lipophiles (Renard and Reddy, 2007, Vandamme *et al.*, 2007).

I.3 Les protéines végétales

I.3.1 Introduction

Les protéines sont des polymères naturels azotés dont la taille varie entre plusieurs milliers et plusieurs millions de daltons. Elles sont constituées d'une ou plusieurs chaînes peptidiques. L'unité de base d'un peptide est l'acide aminé. Les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons amides. Il existe 20 acides aminés. Tous les acides aminés partagent une structure commune, constituée d'une fonction acide carboxylique, d'une amine primaire et d'une chaîne latérale. Cette dernière présente une très grande variété de structures chimiques conférant aux protéines leurs propriétés particulières. L'enchaînement d'acides aminés possède une organisation tridimensionnelle (ou repliement) qui lui est propre. De la séquence au repliement, puis à l'association, il existe quatre niveaux d'organisation structurale de la protéine (Figure 16). La structure primaire est la séquence linéaire d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques (Figure 16-a). La structure secondaire est engendrée par la

rotation des atomes de la chaîne peptidique les uns par rapport aux autres. La structure secondaire la plus fréquente est l'hélice α qui fait tourner la chaîne carbonée par rapport à elle-même d'un tour tous les 4 acides aminés environ. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes. Plusieurs portions de chaînes peuvent aussi se joindre en sens opposé (antiparallèles) pour former un feuillet β où les carbonyles de chaque acide aminé d'une portion de chaîne se lient par liaison hydrogène avec les amines de l'autre portion (Figure 16-b). La structure tertiaire correspond à l'arrangement tridimensionnel d'une chaîne peptidique linéaire. Différentes interactions physico-chimiques peuvent se produire entre des résidus d'acides aminés très éloignés dans la séquence linéaire, par exemple des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques, de Van der Waals ou des interactions hydrophobes (Figure 16-c). Enfin, la structure quaternaire est la disposition spatiale des protéines qui sont formées par plus d'une chaîne peptidique (Figure 16-d) (Belitz *et al.*, 2009, Damodaran, 2000, Rodrigues *et al.*, 2012). Les protéines peuvent être classées en fonction de leur origine (végétale, animale ou microbienne), de leur fonction (protéine de structure, de réserve, de transport ou ayant une activité catalytique pour les enzymes), ou encore de leur type (globulaire, fibrillaire, membranaire).

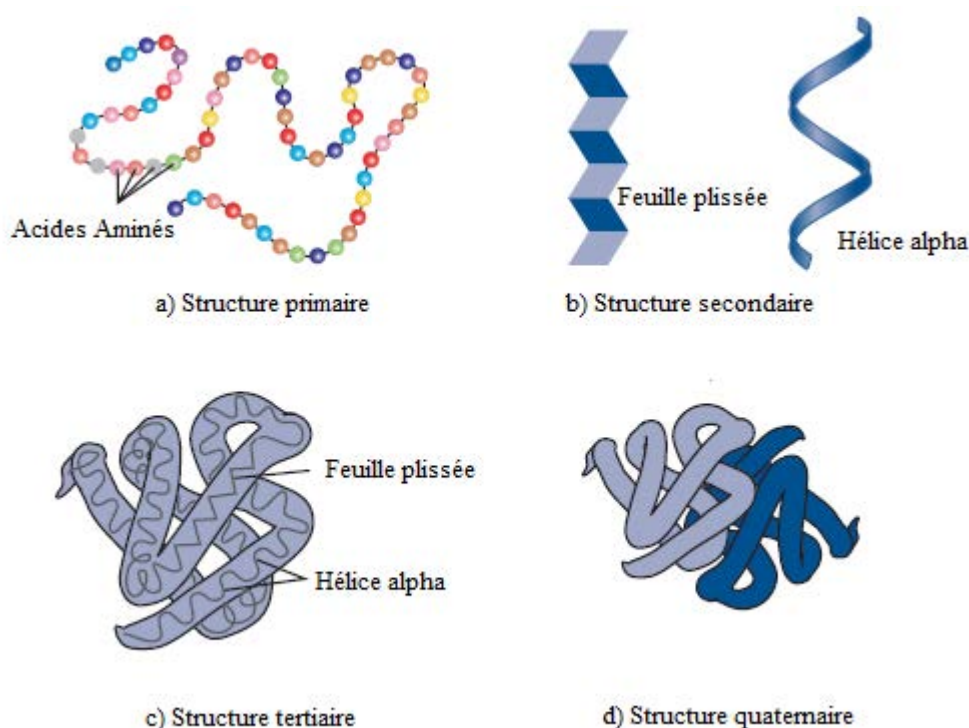


Figure 16. Les structures protéiques (Darryl, 2010).

Les protéines sont essentiellement utilisées en alimentation humaine et animale. Bien que les protéines d'origine animale aient de meilleures qualités nutritionnelles, les protéines végétales peuvent se substituer à ces dernières, car elles présentent l'avantage d'être peu coûteuses, de ne pas présenter de risque sanitaire et d'être accessibles en grande quantité. Grâce à leur caractère renouvelable et biodégradable, les protéines végétales peuvent aussi être utilisées en tant que polymère naturel pour des applications non alimentaires. Les utilisations potentielles concernent les domaines de la cosmétique, pharmaceutique, ainsi que l'industrie des colles et des agromatériaux. L'une des applications non alimentaires pour la valorisation des protéines végétales comprend leur utilisation comme matériau enrobant dans le domaine de la microencapsulation (Nesterenko *et al.*, 2013a).

I.3.2 Application des protéines végétales en microencapsulation

I.3.2.1 Intérêt des protéines végétales en microencapsulation

Les protéines possèdent des propriétés fonctionnelles particulièrement adaptées à la microencapsulation. Leur solubilité relativement élevée, leur faible viscosité en solution, leurs propriétés émulsifiantes et filmogènes, mais surtout leur caractère amphiphile en font des matériaux de choix (notamment par rapport aux polysaccharides), leur permettant d'encapsuler des actifs aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes (Gharsallaoui *et al.*, 2007, Can Karaca *et al.*, 2015).

Comparativement, les protéines animales, comme la caséine, ont beaucoup été étudiées, et ont montré leur faisabilité, notamment en raison de leur meilleure solubilité, sur une plus grande gamme de pH, en comparaison avec les protéines végétales, et de leur caractère plus flexible, leur permettant de diffuser plus rapidement à l'interface avec la matière active et ainsi de la stabiliser plus efficacement (Can Karaca *et al.*, 2015). Cependant, en raison des risques de maladies telles que l'encéphalopathie spongiforme bovine, de la demande croissante en produits végétariens, et de leur coût sensiblement inférieur, les protéines végétales apparaissent aujourd'hui comme des candidats de choix dans le panel des matériaux enrobantes.

Les protéines végétales sont présentées sous la forme de concentrats (concentration en protéines variant de 50 à 80 %) ou d'isolats protéiques (concentration supérieure à 80%),

obtenus par extraction/solubilisation des protéines dans des solutions aqueuses salines, avec un pH souvent alcalin. Diverses techniques de séparation, concentration et précipitation sont également utilisées, avant une étape de séchage permettant d'obtenir des produits secs. Le protocole d'extraction, et des paramètres tels que le pH, la présence ou l'absence de sels, la force ionique du milieu, influent sur les rendements d'extraction mais aussi sur les propriétés fonctionnelles des protéines (Rodrigues *et al.*, 2012). Des échantillons d'une même protéine mais obtenus par des voies d'extraction différentes pourront donc avoir des propriétés (notamment en terme de solubilité) sensiblement différentes.

De nombreuses protéines végétales sont disponibles pour des applications en microencapsulation, notamment les protéines de légumineuses et de céréales.

I.3.2.2 Les protéines de légumineuses (soja, pois, lentille et pois chiche)

I.3.2.2.1 Protéines de soja

Les protéines de soja sont actuellement parmi les protéines végétales les plus étudiées, de par le fait qu'elles sont isolées à partir d'une ressource largement disponible, peu coûteuse et renouvelable, et contenant une fraction importante de protéines (35 à 45%). Les isolats protéiques de soja (SPI) sont généralement issus des tourteaux par extraction alcaline suivie d'une précipitation en milieu acide. Ils contiennent environ 90% de protéines ainsi qu'une petite fraction de polysaccharides, composés minéraux et lipides (Pastor-Cavada *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2012).

Ces protéines sont majoritairement composées de glycidine et conglycine (50 à 90% des protéines totales), de masse molaire d'environ 350kDa et 140 à 180kDa respectivement. Ces protéines, une fois isolées et purifiées, présentent une relative hydrophilie, et des propriétés gélifiantes, émulsifiantes et tensioactives tout à fait adaptées à la microencapsulation, comme le montrent les nombreux travaux publiés sur le sujet et la grande variété de matières actives encapsulées par des isolats protéiques de soja (Nesterenko *et al.*, 2013a, Sharif *et al.*, 2017). Elles représentent actuellement dans ce domaine une des meilleures alternatives aux protéines laitières (Tang and Li, 2013a).

De par leur caractère amphiphile qui leur confère de bonnes propriétés tensioactives, les SPI sont majoritairement utilisés pour l'encapsulation de matières actives hydrophobes telles

qu'huiles, phospholipides, tocophérol, propolis (Nesterenko *et al.*, 2014b, Liu *et al.*, 2014, Nori *et al.*, 2011) mais ils sont aussi tout à fait pertinents pour des actifs hydrophiles tels que les hydrolysats de caséine ou l'acide ascorbique (Nesterenko *et al.*, 2014a, Mendanha *et al.*, 2009).

Les isolats protéiques de soja peuvent être utilisés comme matériau enrobant unique, mais de nombreux travaux portent également sur leur combinaison avec d'autres composés, principalement des polysaccharides, qui peuvent conférer aux microparticules formées une meilleure stabilité, notamment contre l'oxydation des matières actives (Augustin and Hemar, 2009), une porosité réduite et par conséquent une meilleure encapsulation des molécules actives (Favaro-Trindade *et al.*, 2010).

Le Tableau 8 rassemble l'essentiel des travaux publiés sur l'utilisation des SPI en microencapsulation ces dernières années, seuls ou en combinaison avec d'autres composés.

Grâce à leur hydrosolubilité le SPI permet de produire de microparticules par atomisation et coacervation comme le montrent les travaux rassemblés dans le Tableau 8, même si d'autres procédés, tels que la gélification froide (Chen and Subirade, 2009, Pereira Souza *et al.*, 2017) sont aussi étudiés.

Suivant la technique utilisée, la structure (microcapsules ou microsphères) et la taille des microparticules (diamètre moyen des particules obtenues par coacervation généralement plus élevé) peuvent varier, mais l'optimisation des conditions expérimentales permet d'arriver à de très bonnes efficacités d'encapsulation (de l'ordre de 80-90%), y compris avec des taux de matières actives élevés (Chen and Subirade, 2009, Mendanha *et al.*, 2009, Nesterenko *et al.*, 2012).

Tableau 8. Microencapsulation utilisant la protéine de soja comme matériau enrobant.

Matière enrobante	Matière active	Procédé	Référence
SPC (Concentrat de Protéines de Soja)	Probiotiques	Coacervation - Atomisation	(González <i>et al.</i> , 2018)
	α -Tocophérol et Acide ascorbique	Atomisation	(Nesterenko <i>et al.</i> , 2014a)
	α -Tocophérol	Atomisation	(Nesterenko <i>et al.</i> , 2014b)
	Huile de soja	Atomisation	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
	β -Carotène	HHP - Evaporation	(Yi <i>et al.</i> , 2014)
SPI	Huile de soja	Atomisation	(Tang and Li, 2013a)
	α -Tocophérol	Atomisation	(Nesterenko <i>et al.</i> , 2012)
	Curcumine	Désolvatation-Réticulation	(Teng <i>et al.</i> , 2012)
	Propolis	Coacervation complexe	(Nori <i>et al.</i> , 2011)
	Hydrolysats de caséine	Atomisation	(Molina Ortiz <i>et al.</i> , 2009)
SPI - Chitosane	Huile d'algues	Coacervation complexe	(Yuan <i>et al.</i> , 2017)
	Anthocyanines	Gélification froide	(Pereira Souza <i>et al.</i> , 2017)
SPI - Maltodextrine	Huile de soja	Atomisation	(Rosenberg <i>et al.</i> , 2016)
SPI - Amidon	β -Carotène	Atomisation	(Deng <i>et al.</i> , 2014)
	Huile de soja	Atomisation	(Li and Tang, 2013)
SPI - Lactose	Huile de soja	Atomisation	(Tang and Li, 2013b)
	Ester éthylique d'huile de poisson	Coacervation complexe	(de Conto <i>et al.</i> , 2013)
SPI - Gomme arabique	Oléorésine de paprika	Atomisation	(Rascón <i>et al.</i> , 2011)
	Huile d'orange douce	Coacervation complexe	(Jun-xia <i>et al.</i> , 2011)
SPI - Gélatine	Hydrolysats de caséine	Atomisation	(Favaro-Trindade <i>et al.</i> , 2010)
	Riboflavine	Gélification froide	(Chen <i>et al.</i> , 2010)
SPI-Zéine	Riboflavine	Gélification froide	(Chen and Subirade, 2009)
SPI - pectine	Hydrolysats de caséine	Coacervation complexe	(Mendanha <i>et al.</i> , 2009)

I.3.2.2.2 Protéines de pois

Les protéines de pois, elles aussi extraites des graines dont elles représentent 20 à 30%, sont principalement constituées de globulines (65 à 80%) et de deux fractions minoritaires, albumines et glutélines. Les globulines sont constituées de légumines, de masse molaire comprise entre 350 et 400kDa, et de vicilines et convicilines, de masse molaire plus faible, de l'ordre de 150kDa (Elmer *et al.*, 2011).

Les extraits protéiques de pois sont reconnus pour leurs propriétés gélifiantes et interfaciales (Akintayo *et al.*, 1999, Raymundo *et al.*, 2005) et pour leur faible caractère allergène, comparés aux autres sources de protéines végétales (Ducel *et al.*, 2004). Cependant, dans le domaine de la microencapsulation, les protéines de pois ont tout d'abord été utilisées préférentiellement en combinaison avec différents polysaccharides (maltodextrine, amidon, pectine). Ce n'est que plus récemment qu'elles sont envisagées comme unique matériau enrobant. Le procédé d'encapsulation utilisé avec ces protéines est quasi exclusivement l'atomisation, comme le montrent les travaux rassemblés dans le Tableau 9.

L'ajout de polysaccharides aux extraits protéiques présente de nombreux avantages. La solubilité élevée des sucres permet d'augmenter la solubilité totale de la matière enrobante, ce qui se traduit généralement par des taux d'encapsulation plus élevés (Pereira *et al.*, 2009, Elmer *et al.*, 2011). Il a également été démontré que l'incorporation de polysaccharides améliore les propriétés émulsifiantes du mélange, ce qui permet une meilleure stabilité des émulsions dans le cas d'actifs huileux, et par conséquent une meilleure distribution des tailles de particules et une efficacité d'encapsulation améliorée (Gharsallaoui *et al.*, 2010).

Les résultats de ces différents travaux démontrent que les protéines de pois, seules ou combinées à des polysaccharides, sont des matériaux enrobants efficaces, notamment par atomisation, tant pour des matériaux hydrosolubles tels que l'acide ascorbique (Pierucci *et al.*, 2006) que lipophiles, tels que l' α -Tocophérol (Pierucci *et al.*, 2007) ou le miglyol (Gharsallaoui *et al.*, 2012), permettant d'atteindre des efficacités d'encapsulation de 90% (Bajaj *et al.*, 2015, Tamm *et al.*, 2016), pour des particules de taille autour de la dizaine de μm .

Tableau 9. Microencapsulation utilisant la protéine de pois comme matériau enrobant.

Matière enrobante	Matière active	Procédé	Référence
Isolat de protéines de pois	Huile de colza	Atomisation	(Tamm <i>et al.</i> , 2016)
	Huile de lin	Atomisation	(Bajaj <i>et al.</i> , 2015)
	Acide linoléique conjugué	Atomisation	(Costa <i>et al.</i> , 2015)
	Miglyol 811	Atomisation	(Gharsallaoui <i>et al.</i> , 2010)
	Acide Ascorbique	Atomisation	(Pierucci <i>et al.</i> , 2006)
Concentrat de protéines de pois	Acide linoléique conjugué	Atomisation	(Costa <i>et al.</i> , 2015)
	Fer	Atomisation	(de Azevedo Bittencourt <i>et al.</i> , 2013)
Protéines de pois - Maltodextrine	Acide Ascorbique	Atomisation	(Pereira <i>et al.</i> , 2009)
	α -Tocophérol	Atomisation	(Pierucci <i>et al.</i> , 2007)
	Acide Ascorbique	Atomisation	(Pierucci <i>et al.</i> , 2006)
Pois - Pectine	Acides gras polyinsaturés	Atomisation	(Aberkane <i>et al.</i> , 2014)
	Miglyol 811	Atomisation	(Gharsallaoui <i>et al.</i> , 2010)
Pois - Hydrolysats d'amidon	Miglyol 812	Atomisation	(Gharsallaoui <i>et al.</i> , 2012)
Pois - Gomme arabique	Miglyol 812N	Coacervation complexe	(Ducel <i>et al.</i> , 2004)

I.3.2.2.3 Protéines de lentille et pois chiche

Ces protéines ont une composition très proche de celles de pois. Elles sont majoritairement composées de globulines, et plus précisément de légumines et vicilines, et en quantité moindre de convicilines (Avramenko *et al.*, 2016).

Les isolats de protéines de lentille et de pois chiche ont démontré leur faisabilité comme matériau enrobant en encapsulation, notamment grâce à leurs propriétés tensioactives et émulsifiantes (Can Karaca *et al.*, 2011, Joshi *et al.*, 2012).

Avramenko et Karaca (Karaca *et al.*, 2013, Avramenko *et al.*, 2016) ont tous deux encapsulés de l'huile de lin par des protéines de lentille et de pois chiche, associées à des maltodextrines, l'un par gélification froide (Avramenko *et al.*, 2016) et l'autre par atomisation (Karaca *et al.*, 2013). Les efficacités d'encapsulation obtenues sont plus que satisfaisantes, de l'ordre de 60% par gélification froide, et supérieures à 80% par atomisation. Quel que soit le procédé utilisé, l'encapsulation par les isolats protéiques a conféré à l'huile une protection contre l'oxydation pendant le stockage à température ambiante, et a permis un relargage optimal dans des conditions de simulation de fluides intestinaux.

I.3.2.3 Les protéines céréales

I.3.2.3.1 Protéines de maïs

Le taux de protéines contenues dans les grains de maïs varie, suivant les espèces entre 6 et 12%. Les deux fractions majoritaires sont la zéine et la glutéline. La zéine, protéine de réserve, appartient à la classe des prolamines, spécifique aux céréales. Elle est largement utilisée dans l'industrie alimentaire notamment pour ses propriétés antimicrobiennes et gélifiantes (Shukla and Cheryan, 2001).

Plusieurs études ont montré l'intérêt et la faisabilité de la zéine comme matériau enrobant (Tableau 10) principalement dans des applications à visée alimentaire.

Tableau 10. *Microencapsulation utilisant la zéine de maïs comme matériau enrobant.*

Matière enrobante	Matière active	Procédé	Référence
Zéine	Iota-carraghénane	Précipitation anti-solvant	(Cheng and Jones, 2017)
	Amidon de maïs	Atomisation	(Xu and Zhang, 2014)
	Lycophène	Atomisation	(Xue <i>et al.</i> , 2013a)
	Quercétine	Précipitation anti-solvant	(Patel <i>et al.</i> , 2012)
	Nisine	Atomisation	(Xiao <i>et al.</i> , 2011)
	Huile de lin	Atomisation	(Quispe-Condori <i>et al.</i> , 2011)
	Riboflavine	Gélification froide	(Chen and Subirade, 2009)
	Thymol/Lysozyme	CO ₂ supercritique	(Zhong and Jin, 2009)

Les procédés d'encapsulation sont l'atomisation mais aussi la précipitation anti-solvant ou la gélification froide. Les efficacités d'encapsulation obtenues sont toujours nettement supérieures par atomisation, de l'ordre de 90% (Xue *et al.*, 2013b), alors que celles obtenues par les autres procédés sont plus de l'ordre de 50-60% (Zhong and Jin, 2009, Patel *et al.*, 2012). Quel que soit le procédé, les particules obtenues ont des diamètres de quelques dizaines de μm .

Les matières actives encapsulées sont principalement des matières lipidiques (Quispe-Condori *et al.*, 2011) nécessitant une protection contre l'oxydation, ou des actifs antimicrobiens (Nisine, Thymol, Lysozyme). L'encapsulation de ces derniers permet une libération contrôlée de l'actif et une optimisation de son action dans les matrices alimentaires (Zhong and Jin, 2009, Xiao *et al.*, 2011).

I.3.2.3.2 Protéines de blé et d'orge

Orge et blé contiennent tous deux du gluten, mélange protéique obtenu à partir de la farine après extraction de l'amidon. Le gluten de blé est un mélange complexe contenant une faible fraction de polysaccharides (jusqu'à 20%) et deux protéines majoritaires, la gliadine et la gluténine de masse molaire comprise entre 25 et 100kDa, et supérieure à 100kDa respectivement (Bietz, 1970), alors que les deux fractions protéiques majoritaires du gluten d'orge sont glutéline et hordéine (Wang *et al.*, 2011). Ces deux glutens ont d'excellentes propriétés gélifiantes, émulsifiantes et filmogènes (Sun *et al.*, 2009), qui en font des matériaux de choix pour la microencapsulation (Tableau 11).

La gliadine et plus généralement le gluten de blé ont été étudiés dans le domaine de la microencapsulation depuis plusieurs années, tout d'abord en combinaison avec des polysaccharides (Ducel *et al.*, 2004, Ducel *et al.*, 2005) et plus récemment en matériau enrobant unique (Liao *et al.*, 2012), tout comme le gluten d'orge (Wang *et al.*, 2011).

Tableau 11. Microencapsulation utilisant les protéines de blé et d'orge comme matériau enrobant.

Matière enrobante	Matière active	Procédé	Référence
Gluten de blé	Huile de poisson	Double émulsification et polymérisation thermique	(Liao <i>et al.</i> , 2012)
Gluten d'orge	Huile de poisson	Atomisation	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
Gluten de blé/Poly(oxyde d'éthylène)	Chlorite de diltiazem	Evaporation de solvant	(Andreani <i>et al.</i> , 2009)
Gliadine de blé/Gomme arabique	Huile de vaseline	Coacervation complexe	(Ducel <i>et al.</i> , 2004, Ducel <i>et al.</i> , 2005)
Gliadine	Hexadécane	Coarcevation simple	(Mauguet <i>et al.</i> , 2002)

Comme on peut le voir dans le Tableau 11, l'atomisation n'est pas dans ce cas, l'unique procédé d'encapsulation. La coacervation, simple ou complexe, l'évaporation ou encore la double émulsification sont des procédés qui ont aussi été étudiés. L'atomisation permet cependant d'avoir de très bonnes efficacités d'encapsulation, supérieures à 90% pour des taux d'encapsulation pouvant atteindre les 50% (Wang *et al.*, 2011). Les tailles des microsphères obtenues sont de l'ordre de quelques μm , alors que particules obtenues par évaporation de solvant ou coacervation sont plutôt de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de μm (Ducel *et al.*, 2004, Mauguet *et al.*, 2002).

I.3.2.4 Autres protéines végétales

I.3.2.4.1 Protéines de tournesol

Les isolats protéiques de tournesol sont extraits des tourteaux, dans lesquels ils représentent 35 à 45%. Les protéines de tournesol proviennent essentiellement des protéines de réserve contenues dans l'amande de la graine. Ils sont constitués de 4 familles de protéines : les globulines, représentant la fraction majoritaire (55 à 60%), les albumines (17 à 23%) les glutélines (11 à 17%) et les prolamines (1 à 4%) (Orliac, 2002).

Les propriétés physico-chimiques de ces protéines ont été largement étudiées, mettant en valeur leurs excellentes capacités émulsifiantes et moussantes, équivalentes voire supérieures à celles des protéines de soja (González-Pérez and Vereijken, 2007).

Ces protéines sont aussi réputées pour leurs propriétés filmogènes, et sont étudiées pour des applications de films alimentaires, dans lesquels peuvent être incorporés des agents antimicrobiens, tels que certaines huiles essentielles (Salgado *et al.*, 2013).

Dans le domaine de la microencapsulation, Nesterenko *et al.* (Nesterenko *et al.*, 2013b, Nesterenko *et al.*, 2014b) ont démontré les performances de ces isolats protéiques, notamment pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes par atomisation. Des taux d'encapsulation élevés ont pu être atteints (jusqu'à 80%) avec des efficacités meilleures que celles obtenues avec les protéines de soja (au-delà de 90% pour les protéines de tournesol contre des valeurs de l'ordre de 80% pour les protéines de soja). Les microparticules obtenues ont des diamètres moyens compris entre 5 et 80 μ m suivant le taux d'actif (α -tocophérol).

Cependant, en raison de la difficulté à trouver des isolats protéiques commerciaux, contrairement aux isolats protéiques de soja, ces protéines ne sont pas encore valorisées dans ce domaine au niveau de leur potentiel.

I.3.2.4.2 Protéines de colza

Le tourteau de colza, après l'extraction des huiles végétales, est un sous-produit de déchet agro-industriel constitué d'environ 30-45% de protéines. La fraction protéique est principalement constituée de deux familles de protéines : globulines et albumines (Chabanon *et al.*, 2007)

Ces protéines ont démontré de bonnes propriétés fonctionnelles, notamment émulsifiantes, gélifiantes et filmogènes (Dong *et al.*, 2011, Rodrigues *et al.*, 2012).

Plus récemment, Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2015a) ont démontré la faisabilité de ces isolats protéiques comme matériau enrobant, pour la fabrication de microparticules de peptides par atomisation. Les rendements d'atomisation obtenus étaient tout à fait satisfaisants (de l'ordre de 70%) pour des efficacités d'encapsulation variant de 87 à 95% pour un ratio protéine/peptide égal à 2/1. Les microparticules obtenues avaient des diamètres inférieurs à la dizaine de μ m. Les protéines de colza représentent ainsi un nouveau matériau enrobant, efficace et peu coûteux, pour des applications en microencapsulation, particulièrement dans le domaine alimentaire.

I.3.3 Modifications et fonctionnalisations des protéines

I.3.3.1 Introduction

Bien que les protéines végétales aient des propriétés physico-chimiques intéressantes, telles qu'une bonne solubilité, des capacités émulsifiante et moussante ainsi que des propriétés filmogènes, utiles pour de nombreuses applications, il peut être judicieux de modifier ou d'améliorer certaines caractéristiques. Pour cela des modifications de structure peuvent être envisagées :

- des modifications de conformation par traitements physico-chimiques tels que l'augmentation de la température ou de la pression et des modifications de pH ;
- l'hydrolyse enzymatique qui en diminuant les longueurs de chaînes peptidiques entraînent également des changements de conformation ;
- une réticulation des protéines qui permet d'augmenter leur masse molaire et leur viscosité en solution ;
- une fonctionnalisation des protéines par voie chimique, les protéines présentant de nombreux groupements fonctionnels (fonction carboxyle, amine, alcool, thiol) susceptibles d'être modifiés chimiquement ;

Toutes ces modifications permettent l'amélioration de certaines propriétés telles que la solubilité à différents pH, l'hydrophobicité, l'hydrophilie, les propriétés gélifiantes, émulsifiantes, moussantes ainsi que les propriétés tensioactives.

Ces modifications sont également applicables aux protéines animales. Historiquement beaucoup plus étudiées jusqu'à ces dernières années. Ces pourquoi des travaux les concernant pourront être cités pour illustrer certaines modifications, en absence de références sur les protéines végétales.

I.3.3.2 Modification des protéines par traitement physico-chimique

Les traitements physico-chimiques tels que les variations de la température, de pression ou du pH entraînent le plus souvent la dénaturation des protéines. Les propriétés des protéines étant

liées en partie à leur structure tridimensionnelle, la dénaturation va entraîner une modification des propriétés. Le modèle de dénaturation des protéines est présenté sur la Figure 17. Sous l'effet d'un facteur physico-chimique, la protéine native est convertie en un intermédiaire dont la structure tertiaire est modifiée mais la structure secondaire conservée. Cette étape qui correspond à la mobilité des chaînes est réversible. Si les modifications de conditions appliquées (température, pH, pression) sont plus importantes, la structure secondaire n'est plus conservée, les chaînes protéiques sont déployées, la protéine est totalement dénaturée et ce processus est irréversible (Somero, 1995). La masse molaire et la structure primaire des protéines ne sont pas affectées par la dénaturation. Par contre, cette dernière modifie certaines fonctionnalités des protéines, telles que la solubilité, la viscosité en solution, les capacités moussante et émulsifiante ainsi que leur affinité pour les phases hydrophobes (Ibanoglu and Erçelebi, 2007, Ju et al., 2001).

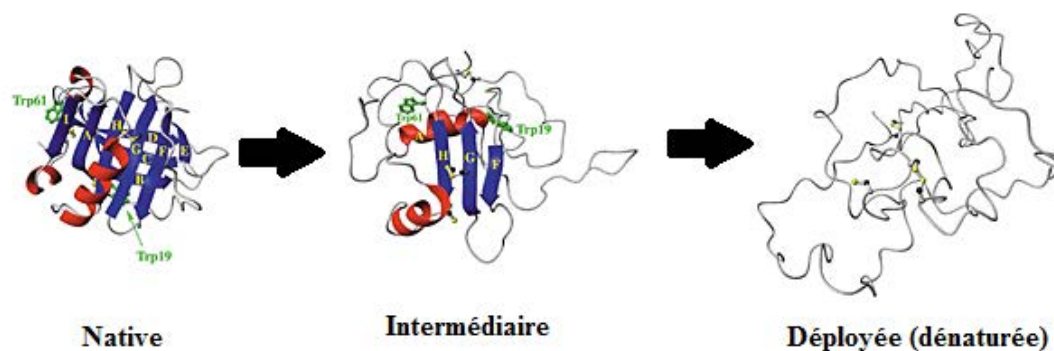


Figure 17. Représentation schématique de la dénaturation de β -lactoglobuline (Kuwata et al., 2001).

Lors d'un traitement à haute pression, les liaisons intermoléculaires non covalentes, responsables de la structure tertiaire de la protéine, sont rompues sous l'action d'une force mécanique (Kunugi and Tanaka, 2002). Les chaînes protéiques se libèrent entraînant un changement de conformation et une modification des propriétés. Yin *et al.* ont montré une augmentation de la solubilité de la protéine de haricot rouge après un traitement à haute pression (200 à 600MPa) ils observent également une diminution du nombre de groupes sulfhydriles, ainsi qu'une augmentation concomitante du nombre de ponts disulfures. Ils concluent que le traitement à haute pression en créant de nouveaux ponts disulfures entraîne la formation de nouveaux agrégats solubles. Jusqu'à 400Mpa le traitement a aussi amélioré les propriétés émulsifiantes de cette protéine (Yin *et al.*, 2008).

Concernant les protéines de soja, Wang *et al.* ont étudié l'application de fortes pressions (200-600MPa) sur des solutions de protéine à 1, 3 et 5%. Ils ont montré des variations de l'hydrophobie de surface des protéines, du taux de sulfhydryle et du pouvoir émulsifiant de la protéine en fonction de la pression appliquée mais aussi de la concentration en protéine. Ces auteurs concluent que des traitements à haute pression peuvent être utilisés pour modifier les propriétés des protéines de soja après une sélection du niveau de pression appliquée et de la concentration en protéines en fonction du résultat souhaité (Wang *et al.*, 2008b).

I.3.3.3 Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des protéines conduit à des peptides de longueurs variables suivant les protocoles et les enzymes utilisés, elle a beaucoup été étudiée et appliquée à de nombreuses protéines végétales. Parmi elles, des protéines extraites des tourteaux de tournesol, soja ou colza mais aussi d'autres sources comme des protéines de blé, d'avoine, de pois et de riz ont été étudiées. L'hydrolyse enzymatique est réalisée à l'aide d'endo- et d'exopeptidase. Les endopeptidases rompent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes protéiques, alors que les exopeptidases détachent les acides aminés de la partie terminale de la chaîne peptidique. Par conséquent, pour obtenir des peptides de nombre d'unités acide aminé plus faible que la chaîne initiale, il est plus intéressant d'utiliser des endopeptidases. Alcalase et flavourzyme sont des mélanges enzymatiques couramment utilisés pour l'hydrolyse des protéines végétales. Flavourzyme est un mélange d'endo- et d'exopeptidases, utilisé pour préparer des courtes chaînes de peptides et des acides aminés libres (Marambe *et al.*, 2008). L'alcalase est un mélange d'endopeptidases qui permet d'obtenir des peptides de plus longues chaînes (Nieto-Nieto *et al.*, 2014).

Les hydrolysats protéiques issus de la matière végétale trouvent des applications comme additifs ou principes actifs dans les domaines de la cosmétique, de la médecine et de l'alimentation (Singh *et al.*, 2014).

La fonctionnalité des hydrolysats protéiques dépend de la masse molaire, de la structure et de la séquence des acides aminés. Le paramètre pour caractériser le niveau d'hydrolyse est le degré d'hydrolyse (DH) représentant le pourcentage des liaisons peptidiques rompues.

Nieto-Nieto *et al.*, (Nieto-Nieto *et al.*, 2014) ont montré que des hydrolysats de protéine d'avoine (DH de 5 à 7%) ont des propriétés gélifiantes augmentées leur permettant de se

substituer aux protéines de blanc d'œuf pour des applications agro-alimentaires. Des études similaires conduites sur des protéines de cacahuète et de lentille ont montré que les propriétés émulsifiantes des protéines natives étaient meilleures que celle des hydrolysats même lorsque le DH est faible (Avramenko *et al.*, 2013, Zhao *et al.*, 2011).

Concernant les protéines de soja, Lamsal *et al.* ont montré que les propriétés rhéologiques des protéines de soja en solution sont modifiées après une hydrolyse avec des DH de 2 et 4%. Un faible DH augmente la solubilité des protéines à tous les pH et diminue la viscosité apparente des solutions (Lamsal *et al.*, 2007). Une hydrolyse limitée avec un DH de 1 ou 2% a permis d'augmenter sensiblement la capacité émulsifiante d'un isolat de protéine de soja (Zhao and Hou, 2009).

Nesterenko *et al.*, ont utilisé des hydrolysats de protéine de soja pour une encapsulation par atomisation du tocophérol. Cette hydrolyse modérée, réalisée avec l'alcalase, a conduit à un DH de 4%. Ces auteurs ont montré que l'hydrolyse enzymatique même faible a entraîné une diminution de l'efficacité d'encapsulation de 50 % par rapport au résultat obtenu avec des protéines natives. Cette baisse d'efficacité est probablement due à une longueur de chaîne insuffisante des protéines hydrolysées pour produire une matrice structurale suffisamment forte pour une encapsulation efficace du tocophérol (Nesterenko *et al.*, 2012).

I.3.3.4 Désamidation

La désamidation est une réaction qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique (Hamada and Swanson, 1994), elle consiste en l'élimination d'un amide pour conduire à un acide carboxylique. Dans le cas des protéines, cette réaction se traduit par la disparition des groupements amides de l'asparagine et de la glutamine et leur transformation en acide aspartique et acide glutamique respectivement (Figure 18). Cette modification entraîne une augmentation de la solubilité des protéines et accroît la capacité des protéines à stabiliser les mousses et les émulsions (Gaspar and de Góes-Favoni, 2015). Les amides ne sont pas des groupements ionisables alors que les acides carboxyliques le sont ($pK_a : 3,5$). A pH supérieur au pK_a de l'acide, les charges négatives en nombre plus important sur les protéines entraînent une augmentation de la répulsion électrostatique entre les chaînes et donc un déploiement partiel des chaînes protéiques expliquant l'augmentation de la solubilité (Dunlap and Côté, 2005, Suppavorasatit *et al.*, 2011). La modification du nombre de charges à la surface des

protéines provoque également le déplacement de leur point isoélectrique qui est abaissé (Finley, 1975, Zhang *et al.*, 1993). Un faible taux de désamidation entraîne une augmentation de la solubilité et de la capacité émulsifiante dans le cas des protéines d'orge, de soja, de riz et de maïs (Wan *et al.*, 1991, Liao *et al.*, 2010, Mirmoghtadaie *et al.*, 2009), par contre une désamidation excessive peut provoquer la détérioration des capacités émulsifiantes et moussantes, car elle entraîne une augmentation importante des charges sur les protéines et donc la réduction des interactions protéine-protéine (Mirmoghtadaie *et al.*, 2009). Une désamidation enzymatique des protéines de soja par la glutaminase avec un taux de 52%, a permis d'augmenter la solubilité de 25% à 65%, leur capacité émulsifiante de 17% à 41% et leur capacité moussante de 26% à 53% (Liu *et al.*, 2011a).

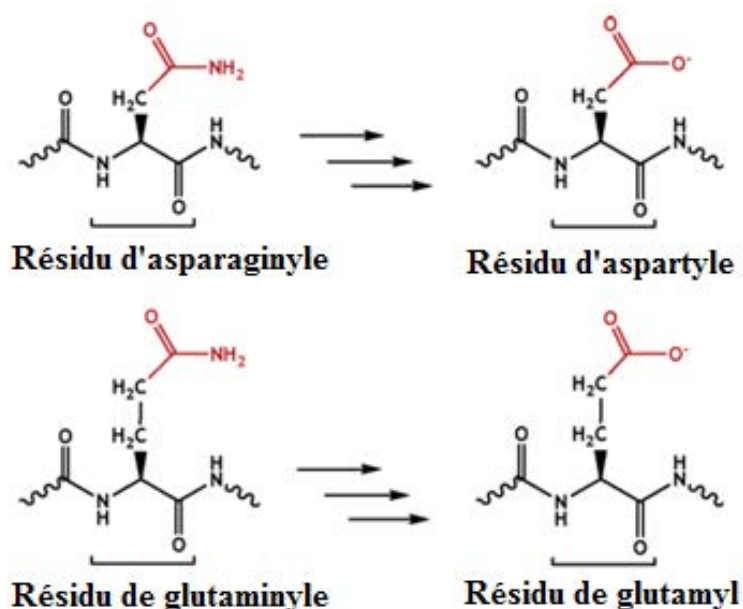


Figure 18. Désamidation des résidus d'asparaginyle et de glutaminyle (Catak *et al.*, 2006).

I.3.3.5 Réticulation

La réticulation consiste en la formation de liaisons covalentes entre les chaînes peptidiques grâce à un agent de réticulation qui peut être chimique ou enzymatique. Lorsque la réticulation se produit entre une chaîne protéique et un polysaccharide ou un sucre simple, sous l'effet de la température, il s'agit de la réaction de Maillard.

I.3.3.5.1 Réticulation chimique ou enzymatique

Les agents chimiques utilisés pour réticuler des réseaux protéiques sont le glutaraldéhyde, le glyceraldéhyde ou le génipine (agent réticulant naturel extrait du Gardénia) (Martinez *et al.*, 2005, Gerrard and Brown, 2002). Ces produits présentent une toxicité élevée ce qui limite le champ de leurs applications et exclut une utilisation dans le domaine alimentaire. Les agents réticulants enzymatiques non toxiques sont plus intéressants pour la réticulation des protéines. Ils permettent d'effectuer la modification dans des conditions douces de température et de pH et d'obtenir de large gamme de taux de réticulation. La transglutaminase est l'enzyme de réticulation la plus décrite dans la littérature (Heck *et al.*, 2013, Kuraishi *et al.*, 2001, Qiu *et al.*, 2017). Elle catalyse la formation d'une liaison amide entre un amide d'un résidu glutamique et une amine primaire d'un résidu lysine ou d'une extrémité de chaîne. Il y a libération d'une molécule d'ammoniac au cours de la réaction (Figure 19).

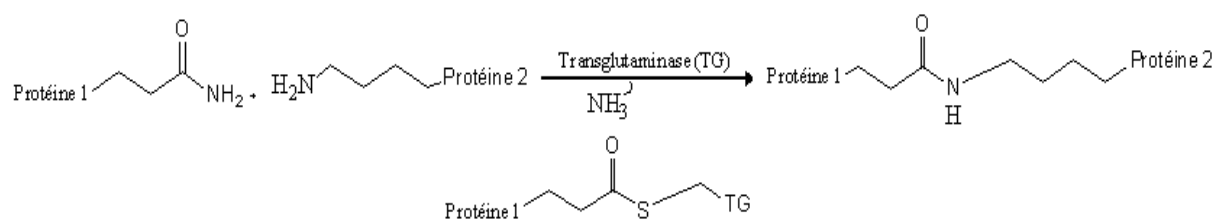


Figure 19. Réticulation de protéines par des réactions de transamidation catalysées par la transglutaminase (Heck *et al.*, 2013).

La réticulation des protéines, en créant des agrégats moléculaires peu solubles, a une influence sur la rhéologie et les propriétés gélifiantes des protéines en solution. Cette modification est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour augmenter la texture et la viscosité des préparations dans lesquelles les protéines sont utilisées (Kuraishi *et al.*, 2001, Heck *et al.*, 2013).

Qiu *et al* ont étudié l'effet de la transglutaminase sur les deux fractions protéiques des protéines de cacahuète, l'arachine et la conarachine. Ils ont montré qu'un taux de réticulation élevé entraîne une baisse des propriétés émulsifiantes des deux protéines (Qiu *et al.*, 2017). Des oxydoréductases, telles que la peroxydase de raifort et la glucose oxydase ont également été utilisées pour réticuler des protéines de soja (Jiang *et al.*, 2017).

I.3.3.5.2 Réaction de Maillard

La réaction de Maillard est une réaction de brunissement, sous l'action de la température, résultant de la condensation d'un groupe aminé et d'une fonction carbonyle. La chimie de cette réaction est complexe, l'énamine formée par la condensation de l'amine sur une fonction carbonyle conduit ensuite à de nombreux produits selon les conditions expérimentales mises en œuvre (température, humidité, pH, présence d'oxygène, temps de réaction ainsi que concentration et nature des réactifs). Au sein de l'industrie agro-alimentaire, il est essentiel de contrôler cette réaction car elle conduit à des produits de caractéristiques sensorielles agréables et aux propriétés anti oxydantes, mais elle peut également produire des effets indésirables, tels que la perte de la valeur nutritive ou la production de composés toxiques (Ames, 1992, Laroque *et al.*, 2008, Martins *et al.*, 2000).

Quelques auteurs ont étudié la microencapsulation en utilisant un mélange de protéines et de polysaccharides qui se conjuguent par la réaction de Maillard après un chauffage à haute température. La plupart de ces études ont porté sur des protéines animales : protéines de lait conjuguées avec du glucose ou des maltodextrines (Liu *et al.*, 2011b, Choi *et al.*, 2010, Drusch *et al.*, 2009, Augustin *et al.*, 2006) et gélatine de porc conjuguée avec du dextrose (Iféduba and Akoh, 2016). Dans tous les cas, la réaction de Maillard a été utilisée pour augmenter la stabilité des matières actives encapsulées contre l'oxydation.

Xue *et al.*, ont étudié les propriétés physicochimiques d'un isolat de protéine de soja conjugué à une maltodextrine ou à de la gomme d'acacia par la réaction de Maillard. Ces auteurs ont montré que les produits obtenus sont beaucoup plus solubles que la protéine native notamment au niveau du PI de la protéine où la solubilité passe de 10 à 50%. Le fait de lier des molécules hydrophiles telles que des polysaccharides sur les protéines augmente l'affinité de ces dernières pour l'eau et donc leur solubilité. Les propriétés émulsifiantes et la stabilité des émulsions des produits conjugués sont aussi très augmentées (Xue *et al.*, 2013b).

I.3.3.6 Cationisation

La réaction de cationisation, en greffant des ammoniums quaternaires, permet d'apporter des charges positives sur les molécules. Cette fonctionnalisation permet de modifier le point

isoélectrique des protéines et donc leur solubilité en fonction du pH ainsi que leur hydrophilie. La cationisation chimique a été largement utilisée pour générer des petits peptides cationiques en vue d'application dans le domaine médical car les molécules ainsi modifiées présentent des activités antimicrobiennes (Bamdad *et al.*, 2015, Futami *et al.*, 2001, Vicennati *et al.*, 2008). Les réactifs utilisés par ces auteurs sont l'éthylènediamine et le polyéthylèneimine, ces deux produits réagissent sur les fonctions carboxyles des résidus acide aspartique et glutamique des protéines. L'inconvénient de ce type de réaction est qu'elle nécessite l'activation de la fonction carboxyle par un carbodiimide. Une cationisation de la lactoglobuline utilisant ces mêmes réactifs a été réalisée par Teng *et al.*, dans le but d'obtenir des nanoparticules pouvant véhiculer des principes actifs (Teng *et al.*, 2014).

La gélatine a été cationisée par (Küick-fischer and Tirrell, 1998, Zohuriaan-Mehr *et al.*, 2009), dans ces deux cas le réactif utilisé est le glycidyltriméthylammonium. Ce produit présente une fonction époxyde susceptible de réagir sur les fonctions amines de la protéine mais aussi dans une moindre mesure sur les fonctions carboxyles. L'incorporation des groupements positivement chargés permet d'augmenter les répulsions électrostatiques entre les sites cationiques ajoutés. Après l'introduction des groupements hydrophiles, la capacité de gonflement des chaînes protéiques dans l'eau devient plus élevée et le gel obtenu retient une quantité d'eau plus importante (Gujral and Rosell, 2004, Wang *et al.*, 2007).

Nesterenko *et al.* ont étudié la cationisation des protéines de soja par le glycidyltriméthylammonium, un taux de substitution des fonctions amines de 92% a été obtenu. La protéine modifiée voit son PI déplacé de 4.5 à 6 et sa solubilité très augmentée aux pH allant de 1 à 10. Ces auteurs ont utilisé la protéine modifiée pour des études de microencapsulation par atomisation du tocophérol (produit hydrophobe) et de l'acide ascorbique (produit hydrophile). L'efficacité de la microencapsulation a été divisée par deux dans le cas du tocophérol. Cette influence négative de la modification est liée à la perte d'affinité entre les extraits protéiques cationisés et la matière active hydrophobe. Par contre, le taux de microencapsulation de l'acide ascorbique par la protéine de soja (déjà élevé : 92%), n'est pas affecté par la réaction de cationisation (Nesterenko *et al.*, 2014a, Nesterenko *et al.*, 2014b).

I.3.3.7 Réaction d'acylation

Une acylation est la substitution d'un hydrogène d'une molécule par un groupe acyle de formule générale R-CO-. Les protéines présentent trois groupements fonctionnels susceptibles de créer une liaison covalente avec un reste acyle : les groupements thiols de cystéine qui conduisent à une liaison thioester, les groupements hydroxyles de sérine qui conduisent à une liaison ester et les fonctions amines de lysine et d'extrémité de chaînes peptidiques qui forment des liaisons amides. Dans les protéines végétales, les fonctions les plus nombreuses et aussi les plus réactives sont les fonctions amines, la réaction d'acylation conduit donc essentiellement à de nouvelles liaisons amides et à une diminution du nombre de fonction amine (Wright, 1991). La variation du nombre de fonction amine, groupement fonctionnel ionisable, sur la protéine entraîne un déplacement du point isoélectrique de la protéine modifiée et une modification de sa courbe de solubilité en fonction du pH (Yin *et al.*, 2009).

Dans la littérature, pour donner de nouvelles propriétés aux protéines modifiées, le radical R du groupe acyle introduit est essentiellement une chaîne grasse, introduite à l'aide d'un chlorure d'acide ou un acide carboxylique, introduit à l'aide d'un anhydride.

I.3.3.7.1 Acylation par des chaînes grasses

La fixation de chaînes grasses sur des protéines confère à ces dernières des propriétés tensioactives, notamment moussantes et émulsifiantes qui peuvent être mises à profit pour synthétiser des tensioactifs à partir d'hydrolysats de protéines (Sánchez-Vioque *et al.*, 2004, Rondel *et al.*, 2011).

Concernant l'acylation des protéines végétales natives, il existe peu d'études, et elles concernent essentiellement les protéines de soja. Ainsi, Matemu *et al.*, ont étudié l'acylation des protéines de soja avec des chaînes grasses allant de 8 à 16 atomes de carbone. Ces auteurs ont montré que la capacité émulsifiante est plus élevée pour les protéines acylées par rapport aux protéines natives. Le greffage des chaînes grasses entraîne un changement de conformation des protéines et le déploiement des chaînes peptidiques, ce qui permet aux groupements hydrophobes de se placer à l'interface huile/eau. L'affinité des chaînes peptidiques acylées pour la phase huile est augmentée. Ces propriétés confèrent aux protéines

acylées d'excellentes propriétés émulsifiantes. La stabilité des émulsions est aussi augmentée (Matemu *et al.*, 2011).

Nesterenko *et al.* ont réalisé l'acylation des protéines de soja par des chlorures d'acide de 8, 12, et 16 atomes de carbone selon la réaction de Schotten-Baumann (catalysée par l'hydroxyde de sodium en milieu aqueux). Ces auteurs ont montré que quel que soit la longueur de la chaîne grasse et le nombre d'équivalent de chlorure d'acide utilisé (0.5 ou 1) le degré d'acylation obtenu est à peu près de 30%, seules les fonctions amines en surface de la protéine sont accessibles au réactif. Les protéines de soja ainsi acylées ont été utilisées pour la microencapsulation de tocophérol par atomisation. Les auteurs ont montré une efficacité d'encapsulation de 95% pour la protéine acylée par le chlorure de dodécanoyle (80% pour la protéine native). Ces résultats montrent que l'affinité de la protéine de soja pour un produit hydrophobe tel que le tocophérol a été augmentée par le greffage d'une chaîne grasse (Nesterenko *et al.*, 2012). Une étude similaire a été réalisée par ces mêmes auteurs sur la protéine de tournesol acylée dans les mêmes conditions. Les degrés d'acylation obtenus ont été plus importants (autour de 45%), les fonctions amines étant probablement plus accessibles au réactif dans la protéine de tournesol (Nesterenko *et al.*, 2013b).

I.3.3.7.2 Acylation par l'anhydride succinique

L'anhydride succinique est le réactif chimique le plus fréquemment utilisé pour la modification chimique des protéines. La succinylation des protéines est une réaction chimique qui consiste en une addition nucléophile de l'anhydride succinique sur les fonctions amines des protéines, cette fonctionnalisation substitue donc des groupements acides carboxyliques à des groupements amines (Figure 20).

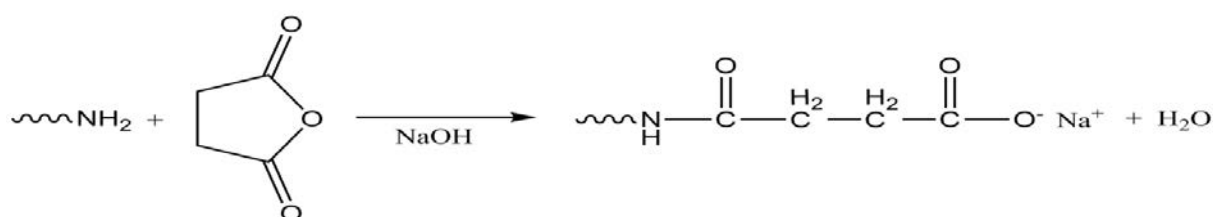


Figure 20. Réaction de succinylation

A pH neutre, les groupes acides carboxyliques sont chargés négativement alors que les fonctions amines sont chargées positivement. Cette modification chimique a donc une influence importante sur le point isoélectrique de la protéine et sur l'allure de sa courbe de solubilité dans l'eau en fonction du pH (Caillard *et al.*, 2009, Shilpashree *et al.*, 2015a). La succinylation abaisse le point isoélectrique et augmente la solubilité des protéines pour des pH supérieurs au PI, ainsi que leurs propriétés émulsifiantes (Achouri and Zhang, 2001).

Il existe de très nombreuses études décrivant cette modification appliquée à des protéines végétales mais aussi animales, les plus anciennes étudient la réactivité des protéines vis-à-vis de l'anhydride succinique. Habeeb *et al.*, ont montré que la réaction n'est possible que si le pH du milieu réactionnel est supérieur à 8 car la fonction amine doit être déprotonée pour avoir un caractère nucléophile (Habeeb *et al.*, 1958).

Les études réalisées récemment décrivent plutôt les propriétés des protéines succinylées et leurs applications potentielles dans différents domaines. Shilpashree *et al.* se sont intéressés à la succinylation des protéines de lait, 95% des fonctions amines sont modifiées après utilisation de 4 eq d'anhydride succinique par fonction amine. Aux faibles valeurs de pH (inférieur à 4), la protéine succinylée est deux fois moins soluble que la protéine native, à partir d'un pH de 4, la protéine modifiée est plus soluble que la native, à partir de 8 sa solubilité est de 100% alors qu'elle n'est que 80 % pour la protéine native. Les propriétés émulsifiantes et la viscosité des protéines de lait succinylées ont également été augmentées. Par contre les propriétés moussantes n'ont pas été affectées par la modification (Shilpashree *et al.*, 2015b). Les protéines de lait succinylées ont montré une capacité à fixer les cations de fer plus importante que les protéines natives faisant envisager leur utilisation comme complément alimentaire (Shilpashree *et al.*, 2016).

Concernant les protéines végétales, des études réalisées sur les protéines de soja, d'avoine et de haricot ont aussi montré une augmentation de la solubilité des protéines succinylées et de bonnes propriétés émulsifiantes, par contre les propriétés moussantes sont diminuées, ces caractéristiques sont intéressantes pour des utilisations en tant qu'additif alimentaire (Achouri *et al.*, 1998, Mirmoghtadaie *et al.*, 2009, Yin *et al.*, 2009, Zhao *et al.*, 2017)

Wu *et al.* ont utilisé des protéines de soja succinylées en formulation avec du chitosane et de l'acide stéarique pour réaliser des films alimentaires capables de prolonger la conservation des fruits (Wu *et al.*, 2017).

Deux études décrivent l'utilisation de protéines de soja succinylées en tant qu'excipient pour la formulation de comprimés pour l'industrie pharmaceutique. Caillard *et al.* ont montré l'impact de la succinylation sur le relargage de principes actifs au pH gastrique (1,2) et intestinal (7,5). Les comprimés réalisés avec des protéines succinylées à 50% ou 100% ont libéré moins de 10% du principe actif dans le pH gastrique simulé (1,2), par contre au pH intestinal seule la protéine succinylée à 100 % a libéré la totalité du principe actif. Ces comprimés ont été qualifiés gastro résistants par leurs auteurs (Caillard *et al.*, 2009). Effionora *et al.* ont utilisé des protéines de soja succinylées à 36 % pour encapsuler par atomisation un principe actif modèle. La publication ne détaille pas les conditions expérimentales utilisées mais ces auteurs concluent que les microsphères synthétisées permettent un relargage contrôlé du principe actif sur une durée de 24 heures (Effionora *et al.*, 2016).

I.4 Conclusions

Cette étude bibliographique est divisée en trois parties. La première partie présente des généralités sur l'administration de principes actifs par voie orale, leur biodisponibilité, ainsi que les différentes formes galéniques adaptées à la voie orale pour une libération retardée pour la voie orale. La deuxième partie aborde les aspects généraux de la microencapsulation, la classification des microparticules et les différents procédés de microencapsulation dans le domaine pharmaceutique. Cette partie présente également les polymères naturels utilisés dans ce domaine. La troisième partie est consacrée aux protéines végétales, à leurs applications en microencapsulation et aux modifications chimiques dont elles peuvent être l'objet.

Comme explicité dans ce chapitre, l'obtention de formes gastrorésistantes pour la voie orale nécessite généralement une étape d'enrobage. Cette étape augmente le coût et le temps de production, elle peut être technologiquement délicate et poser des soucis environnementaux, notamment lors de l'utilisation de solvants organiques. Dans ce contexte, il est donc pertinent de chercher à développer des excipients présentant des propriétés variant avec le pH (que nous qualifierons par la suite de «pH-sensibles») permettant d'éviter cette étape tout en garantissant une meilleure sécurité. La recherche d'une alternative biosourcée, associée à un procédé de mise en forme multi-particulaire environnementalement plus intéressant (manipulation en solvant aqueux, temps de séchage réduit) est l'objectif de ce travail.

Dans ce cadre, les protéines végétales sont une alternative à l'utilisation de biopolymères synthétiques ou de protéines animales en tant que matériaux enrobants pour les principes actifs.

Parmi elles, la protéine de soja a été largement étudiée et caractérisée, et est très utilisée pour la microencapsulation dans l'industrie alimentaire, car elle permet d'encapsuler efficacement des actifs volatils et/ou sensibles à l'oxydation tels que les arômes et molécules antioxydantes. Différents travaux ont également traité des modifications physico-chimiques et enzymatiques de cette protéine, afin d'améliorer certaines de ses propriétés fonctionnelles. Cependant il existe encore peu d'études sur son utilisation en tant que matériau enrobant de principes actifs pharmaceutiques. Pour toutes ces raisons, la protéine de soja a été choisie comme protéine végétale modèle. Afin d'améliorer sa pH-sensibilité, deux modifications ont été envisagées : l'acylation par une chaîne grasse et la succinylation.

Pour illustrer les potentialités de cette protéine en tant qu'excipient pour la voie orale, l'ibuprofène, appartenant à la classe BCS II, a été choisi comme principe actif modèle. Il s'agit d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) présentant des propriétés analgésiques et antipyrétiques. Comme tous les AINS, l'ibuprofène présente des effets indésirables au niveau de la muqueuse gastrique dont il entraîne des ulcérations (Carreras *et al.*, 2013, Devrim and Canefe, 2006). Son enrobage par des additifs ou excipients gastrorésistants permet de limiter cet effet secondaire (Nagpal *et al.*, 2012, Carreras *et al.*, 2013).

L'atomisation a été choisie comme procédé d'encapsulation, car ce procédé est déjà courant dans l'industrie pharmaceutique, qu'il est facile à mettre en œuvre, rapide et économique, et ne nécessite pas l'utilisation de solvant organique. De plus, les microparticules obtenues par ce procédé, de taille réduite (de l'ordre de la dizaine de nm), peuvent éventuellement être incorporées dans différentes formes galéniques et ainsi être envisagées comme une première étape de réalisation de formes pharmaceutiques innovantes.

***Chapitre II. Modification chimique de
l'extrait protéique de soja et effet sur
la microencapsulation***

II.1 Introduction

Ce second chapitre est consacré à l'étude des protéines de soja en microencapsulation. Cette protéine a été choisie d'après la revue bibliographique présentée au chapitre I, car elle possède des propriétés fonctionnelles adaptées, telles qu'une bonne solubilité, une capacité émulsifiante et des propriétés gélifiantes. Les protéines de soja et leurs utilisations en microencapsulation ont été particulièrement décrites dans la littérature, notamment dans le domaine de l'alimentation. De plus, elles sont abondantes et peu coûteuses.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les propriétés de l'extrait protéique. Dans un deuxième temps, des modifications chimiques de la protéine ont été envisagées dans le but de moduler sa solubilité en fonction du pH. Au regard de l'étude bibliographique réalisée, nous avons choisi de réaliser deux réactions d'acylation sur les fonctions amines: une modification par le chlorure de dodécanoyle et une autre par l'anhydride succinique. Au cours de ces deux réactions, aucun solvant organique n'est utilisé et aucun produit indésirable n'est formé, ce qui répond donc aux critères de la chimie verte (Anastas and Zimmerman, 2003). Pour finir, la capacité de l'extrait protéique de soja et des deux protéines modifiées, à encapsuler l'ibuprofène (principe actif modèle) par atomisation, a été étudiée. Différents ratios protéines/principe actif ont été testés. Les résultats les plus significatifs et l'étude du relargage de l'ibuprofène en fonction du pH dans les conditions de la Pharmacopée Européenne 9.5 sont décrits dans les deux publications présentées à la fin de ce chapitre.

II.2 Modifications chimiques de l'extrait protéique

II.2.1 Composition de l'extrait protéique

Les teneurs en différents constituants de l'extrait protéique de soja ont été déterminées par les méthodes décrites dans le Chapitre IV. Les pourcentages massiques de chaque constituant sont les suivants: protéines 87,6%, eau 5,4%, matière minérale 5,3%, polysaccharides 1,4% et lipides 0,4%. L'extrait est très riche en protéines, il reste des taux résiduels de lipides et de polysaccharides qui lors du procédé d'extraction peuvent rester liés ou adsorbés sur les protéines. Le taux d'humidité provient de molécules d'eau emprisonnées dans le réseau de biopolymère et liées par liaison hydrogène aux parties hydrophiles de la protéine. Les

composés minéraux présents sont essentiellement des sels d'azote, de phosphore, de potassium, de calcium et de magnésium (Mondor *et al.*, 2004).

La composition en acides aminés de l'extrait protéique a été déterminée par chromatographie ionique après une hydrolyse acide totale selon la méthode décrite dans le Chapitre IV. Les résultats sont présentés dans la Figure 21. Comme dans toutes les protéines végétales, les acides aminés majoritaires sont les acides glutamique et aspartique. Le taux de lysine est important, c'est une caractéristique des protéines de légumineuse dont le soja fait partie (Nieuwelink and Nieuwenhuis, 2002) Dans cette analyse, le taux d'alanine est surestimé car une partie provient de la dégradation du tryptophane au cours de l'hydrolyse acide.

Le taux de lysine élevé est particulièrement intéressant pour réaliser des modifications chimiques car cet acide aminé possède une fonction amine dont la réactivité permet des réactions de greffage ou de réticulation, comme il a été décrit dans le Chapitre I.

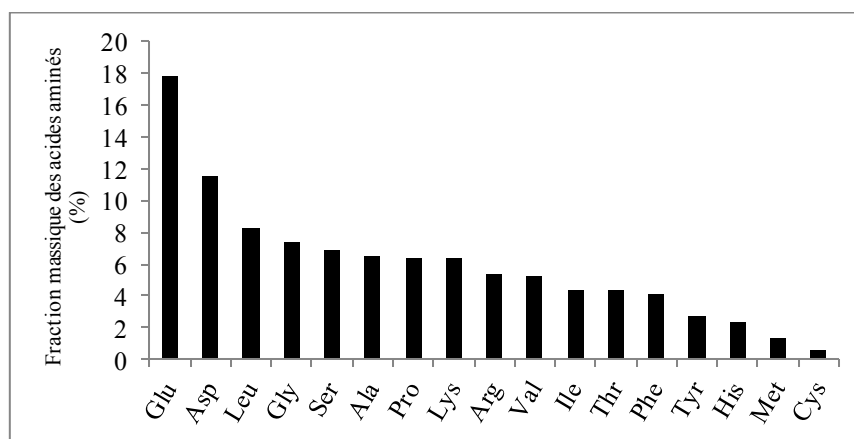


Figure 21. Composition en acides aminés de la protéine de soja

II.2.2 Acylation par le chlorure de dodécanoyle

Dans le cas de la microencapsulation d'un produit hydrophobe, l'intérêt d'un greffage de chaîne grasse sur les fonctions amines de la protéine est d'améliorer leur hydrophobicité et leurs propriétés tensioactives (Yin *et al.*, 2010, Matemu *et al.*, 2011) afin d'augmenter leur affinité pour la matière encapsulée et leur capacité à stabiliser une émulsion. Dans le cadre d'un relargage contrôlé d'un principe actif en fonction du pH, cette modification est intéressante car elle diminue considérablement la solubilité des protéines à pH acide. En effet

à pH acide, la solubilité des protéines est due en grande partie à la protonation des fonctions amines. La réaction d'acylation des protéines selon la réaction de Schotten-Baumann consiste en un greffage d'une chaîne grasse sur les groupements amines terminaux des chaînes peptidiques ou ceux de la lysine (Figure 22).

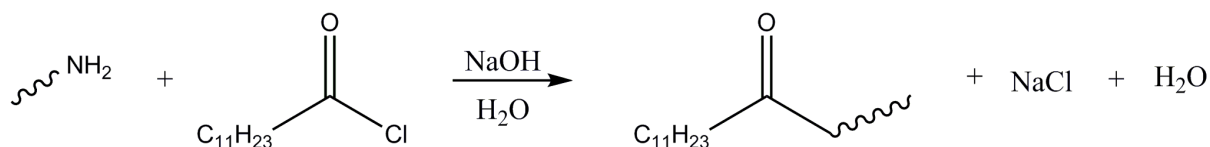


Figure 22. Réaction d'acylation de Schotten-Baumann

Cette réaction s'effectue en milieu aqueux, catalysée par de l'hydroxyde de sodium. Pour ce travail, le chlorure de dodécanoyle a été choisi comme agent d'acylation. En effet, une précédente étude réalisée au laboratoire, portant sur l'encapsulation du tocophérol, a montré une efficacité supérieure des protéines de soja acylées par des chaînes grasses à 12 atomes de carbone par rapport à celles à 8 ou 16 atomes de carbone (Nesterenko *et al.*, 2012). En milieux aqueux basique, le chlorure de dodécanoyle peut s'hydrolyser en partie pour conduire à un savon, le dodécanoate de sodium. Par conséquent, la totalité du réactif n'est pas disponible pour la réaction d'acylation de la protéine. Nous avons donc utilisé différents rapports stœchiométriques entre le nombre de moles de fonctions amines de la protéine (déterminé par dosage colorimétrique, OPA) et le nombre de moles de chlorure de dodécanoyle utilisé, et mesuré l'efficacité de la réaction. Le dodécanoate de sodium produit au cours de la réaction a des propriétés tensioactives, qui peuvent aider à la solubilisation des protéines et du principe actif avant l'étape d'atomisation. Le choix a donc été fait de le conserver avec les protéines acylées. Le paramètre caractérisant la réaction d'acylation est le taux d'acylation qui correspond au pourcentage de groupements amines fonctionnalisés après la réaction. Ce taux est déterminé par dosage des fonctions amines de la protéine, par la méthode OPA, avant et après la modification chimique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Taux d'acylation de la protéine de soja à différents ratios molaires NH_2 de protéine / chlorure de dodécanoyle ($C_{12}H_{23}OCl$)

Ratio molaire NH_2 /chlorure	NH_2 /g protéine	Taux d'acylation (%)
Non modifiées	0,495	
1/0,2	0,461	7
1/0,5	0,435	12
1/1	0,370	25
1/2	0,290	41

Les résultats montrent qu'une augmentation du rapport molaire NH_2 /chlorure entraîne une augmentation du taux d'acylation. Les fonctions amines de la protéine sont donc accessibles au réactif dans les conditions opératoires utilisées (solution protéique à 5% sous agitation mécanique, dans l'eau à pH 10 durant 30min à température ambiante puis 3h à 50°C). L'utilisation de 2 équivalents de chlorure d'acide par fonction amine de la protéine a permis d'obtenir un taux d'acylation de 41%. Ce taux est suffisant pour encapsuler efficacement une matière active hydrophobe (Nesterenko, 2012). La protéine acylée à 41% a donc été utilisée pour les essais d'encapsulation de l'ibuprofène par atomisation.

II.2.3 Acylation par l'anhydride succinique

Le greffage d'un anhydride succinique sur les fonctions amines permet, comme le greffage de chaînes grasses, de diminuer la solubilité à pH acide. En ajoutant des fonctions acides carboxyliques, ionisables à pH supérieur à 5, cette modification augmente la solubilité de la protéine à partir de cette valeur de pH. La réaction de succinylation est réalisée dans l'eau à pH 8,5, catalysée par de l'hydroxyde de sodium. L'anhydride succinique est un réactif couramment utilisé pour la modification chimique de polymère naturel, notamment pour augmenter leur solubilité dans l'eau. C'est un réactif sans danger dont l'utilisation est admise pour des applications alimentaires (Smith and Hong-Shum, 2011). Dans l'eau à pH basique, l'anhydride succinique peut être hydrolysé pour conduire à un diacide: l'acide succinique. La totalité du réactif n'étant pas disponible pour la réaction de succinylation de la protéine, différents rapports stœchiométriques entre le nombre de moles fonctions amines de la protéine (déterminé par dosage colorimétrique, OPA) et le nombre de moles d'anhydride succinique ont été utilisés. L'acide succinique n'est pas un produit toxique mais il n'apporte aucune

propriété particulière aux protéines succinylées pour une application en microencapsulation, il a donc été éliminé en fin de réaction. Le paramètre caractérisant cette réaction est le taux de succinylation qui correspond au pourcentage de groupements amines fonctionnalisés après la réaction. Ce taux est déterminé par dosage des fonctions amines de la protéine, par la méthode OPA, avant et après la modification chimique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 13.

Tableau 13. Taux de succinylation de la protéine de soja à différents ratios molaires NH_2 de protéine / anhydride succinique

Ratio molaire NH_2 / anhydride succinique	NH_2 /g protéine	Taux de succinylation (%)
Non modifiées	0,499	
1/0,5	0,311	37
1/0,75	0,237	52
1/1	0,078	84
1/1,5	0,035	93
1/2,5	0,027	95

Les résultats montrent qu'une augmentation du rapport molaire NH_2 /anhydride succinique entraîne une augmentation proportionnelle du taux de succinylation pour les ratios 1/0,5 ; 1/0,75 et 1/1. Au-delà de 1 équivalent d'anhydride succinique utilisé, l'augmentation du taux de succinylation est moins importante. Les valeurs obtenues avec 1,5 ou 2,5 équivalents de réactif sont très proches. Il semble donc que dans les conditions opératoires utilisées (solution protéique à 5% sous agitation mécanique, dans l'eau à pH 8,5 durant 30 min à température ambiante et 1 heure à 37°C), une petite fraction des fonctions amines de la protéine (de l'ordre de 5%) ne sont pas accessibles au réactif. Les taux de succinylation obtenus avec 1,5 ou 2,5 équivalents d'anhydride succinique étant très élevés et du même ordre de grandeur, c'est le taux de succinylation de 93% obtenu avec 1,5 équivalents de réactif qui a été utilisé pour les essais d'encapsulation de l'ibuprofène par atomisation.

II.2.4 Influence des modifications sur la solubilité des protéines

Trois matières enrobantes ont été utilisées pour les essais de microencapsulation de l'ibuprofène: l'isolat de protéine de soja (SPI), la protéine de soja acylée par le chlorure de dodécanoyle avec un taux d'acylation de 41% (SPA) et la protéine de soja succinylée avec un taux de succinylation de 93% (SPS). Pour chacune de ces matières, une étude de la solubilité en fonction du pH a été réalisée. Les résultats sont présentés dans la Figure 23.

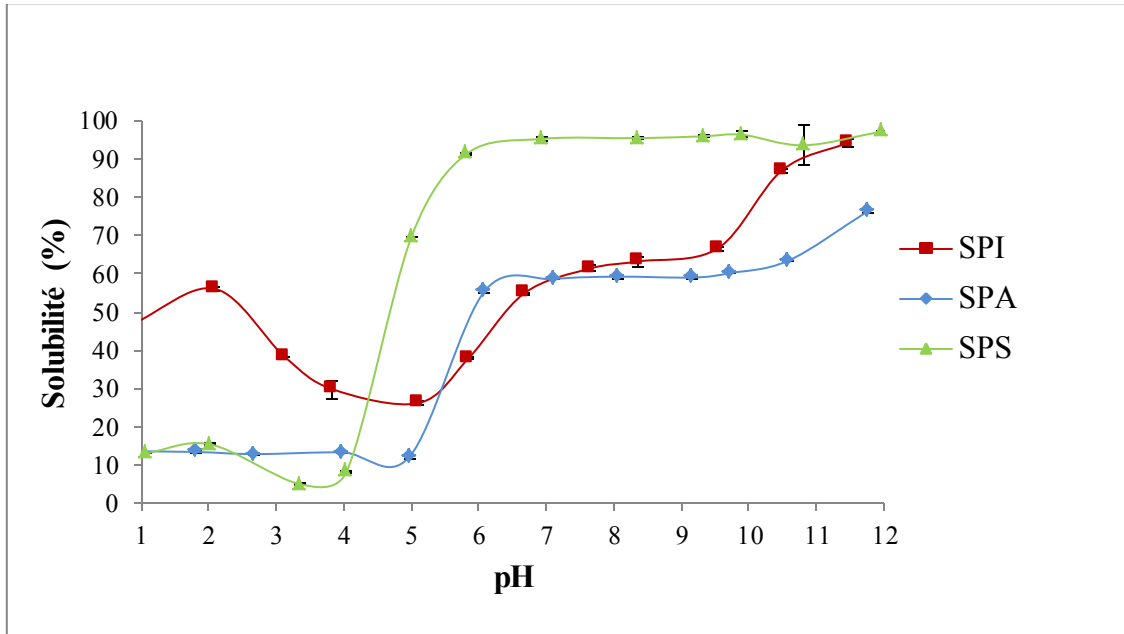


Figure 23. Effet du pH sur la solubilité de SPI, SPA et SPS à 37°C.

SPI présente une courbe de solubilité caractéristique des protéines végétales avec un point isoélectrique (PI) entre 4 et 5 (Nakai and Modler, 1996). En ce qui concerne SPA, sa solubilité est très diminuée jusqu'à un pH de 5, au-delà de cette valeur, sa courbe de solubilité est très proche de celle de SPI. La totalité des fonctions acides carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques de SPI et SPA sont sous forme de carboxylates, les chaînes protéiques sont donc chargées négativement par ces groupes, de sorte que les interactions entre les protéines diminuent et que les interactions avec l'eau augmentent, ce qui entraîne une augmentation de la solubilité (Fennema, 1993). Au pH basique, supérieur à 10, SPI atteint quasiment 100% de solubilité alors que SPA ne dépasse pas 80%. La différence entre SPI et SPA se situe au niveau de la présence des chaînes grasses sur SPA conférant à cette dernière un caractère plus hydrophobe et expliquant probablement cette différence de solubilité aux pH supérieur à 10.

SPS a un profil de solubilité très éloigné de celui d'une protéine native. En effet, elle est très peu soluble jusqu'à un pH de 4, sa solubilité augmente ensuite très rapidement pour atteindre quasiment 100% à un pH de 6. Pour SPS, la presque totalité des fonctions amines (93%) responsables de la solubilité à pH acide ont été remplacées par des fonctions acides carboxyliques. Ces fonctions, sous forme de carboxylate pour des pH supérieurs à 5, expliquent la grande solubilité de SPS à partir de cette valeur de pH (Shilpashree *et al.*, 2015a, Caillard *et al.*, 2009). A pH 8, les trois protéines présentent des taux de solubilité suffisants (60% pour SPI et SPA et 100% pour SPS) pour permettre la préparation de solutions avec l'ibuprofène pour l'atomisation.

II.3 Effet des modifications sur la microencapsulation

II.3.1 L'ibuprofène: principe actif modèle

L'ibuprofène est un Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien (AINS) qui possède des propriétés antipyrétiques et analgésiques. C'est un produit issu de la pétrochimie dont le nom UICPA est acide (RS)-2-(4-(2-méthylpropyl)phényl)propanoïque (CAS 15687-27-1) (Figure 24). Il se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche dont le point de fusion est 76°C (Higgins *et al.*, 2001).

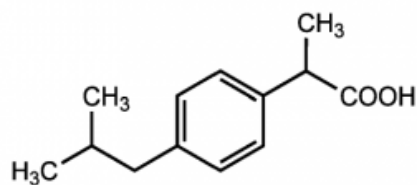


Figure 24. Représentation de la molécule d'Ibuprofène

L'ibuprofène est un principe actif hydrophobe classé en II dans le Système de Classification Biopharmaceutique (Biopharmaceutical Classification System ou BCS) (Vidal and Alegre, 2013). Le pKa de sa fonction acide carboxylique est de 4,4. Sa solubilité dans l'eau est fonction du pH, Il est soluble à pH 7,0 (3,70mg/mL) mais très peu à pH 2,2 (0,024mg/mL) et 4,0 (0,029mg/mL) (Yazdanian *et al.*, 2004, Watkinson *et al.*, 1993). De plus, cette molécule est relativement facile à doser par HPLC (Ren *et al.*, 2014). Pour toutes ces raisons, nous

avons choisi l'ibuprofène comme principe actif modèle pour les essais de microencapsulation par des protéines de soja native ou dont la solubilité en fonction du pH a été modifiée.

Des études du relargage de l'ibuprofène de ces microcapsules en fonction du pH ont été ensuite réalisées.

II.3.2 Influence des modifications chimiques

Les essais de microencapsulation ont été réalisés avec les trois protéines précédemment étudiées : la protéine non modifiée (SPI), la protéine acylée à 41% (SPA) et la protéine succinylée à 93% (SPS). Différents ratios protéine/IBU ont également été testés. Les caractéristiques principales des microparticules obtenues sont rassemblées dans le Tableau 14.

D'un point de vue procédé, les rendements d'atomisation obtenus varient entre 70 et 87%. Ces valeurs, relativement supérieures à celles que l'on peut trouver dans la littérature dans le cas de microencapsulation par atomisation avec des protéines végétales (Effionora *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2015b), sont très encourageantes en vue d'un transfert d'échelle du procédé.

Tableau 14. Propriétés des microparticules des différents ratios Protéine / Ibuprofène

SPI / IBU	Taille des micro-particules D _{4,3} (µm)	Indice de polydispersité	Moisture (%)	Rendement d'atomisation (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Taux d'encapsulation (%)
SPI	5,01±0,09 ^{cd}	2,26±0,10 ^{cd}	5,14±0,03 ^a	80,37	-	-
SPA	4,23±0,03 ^{cd}	2,94±0,02 ^a	3,54±0,30 ^{bcd}	ND	-	-
SPS	5,31±0,11 ^c	2,64±0,16 ^b	3,49±0,04 ^{bcd}	77,82	-	-
SPI 90/10	3,49±0,16 ^d	2,46±0,08 ^{bc}	3,68±0,06 ^{bc}	82,36	92,58±9,34 ^{ab}	9,26±0,93 ^d
SPI 80/20	4,37±0,25 ^{cd}	2,69±0,10 ^{ab}	2,31±0,01 ^c	86,7	84,10±3,61 ^{ab}	16,82±0,72 ^c
SPI 60/40	19,08±1,95 ^a	2,58±0,19 ^b	3,16±0,01 ^{cd}	79,66	81,59±2,78 ^b	32,64±1,11 ^b
SPA 90/10	4,31±0,01 ^{cd}	2,46±0,02 ^{bc}	3,74±0,05 ^{bc}	69,64	87,36±3,66 ^{ab}	8,74±0,37 ^d
SPA 80/20	4,50±0,10 ^{cd}	2,46±0,06 ^{bc}	2,81±0,01 ^{dc}	81,19	86,56±4,47 ^{ab}	17,31±0,89 ^c
SPA 60/40	5,86±0,05 ^c	2,15±0,06 ^d	1,38±0,06 ^f	87,31	93,88±10,24 ^{ab}	37,55±4,10 ^a
SPS 90/10	4,73±0,08 ^{cd}	2,30±0,07 ^{cd}	3,88±0,96 ^b	78,75	95,46±0,68 ^a	9,54±0,06 ^d
SPS 80/20	5,01±0,01 ^{cd}	2,59±0,04 ^b	3,24±0,96 ^{bcd}	76,58	92,41±1,06 ^{ab}	18,48±0,21 ^c
SPS 60/40	7,65±0,04 ^b	2,10±0,05 ^d	2,82±0,97 ^{dc}	72,42	91,43±0,72 ^{ab}	36,57±0,29 ^a

En ce qui concerne les efficacités d'encapsulation, des valeurs sensiblement supérieures sont obtenues dans le cas des protéines modifiées, que ce soit par acylation ou succinylation, par rapport à la protéine non modifiée. Cela est particulièrement visible pour des taux élevés d'ibuprofène, notamment pour un ratio initial protéine/IBU de 60/40, où des efficacités d'encapsulation de 93,9% et 91,4% sont obtenues pour SPA et SPS respectivement, alors que l'efficacité d'encapsulation obtenue avec l'utilisation de SPI est de seulement 81,6%.

Dans le cas de la protéine acylée (SPA), le greffage de chaînes grasses hydrophobes va augmenter l'affinité des chaînes protéiques pour la matière active hydrophobe, leur permettant de mieux enrober cette dernière lors de la mise en solution et de l'atomisation, et donc favorisant une meilleure rétention, par rapport aux extraits protéiques non acylés.

Dans le cas de la protéine succinylée, ces résultats sont plutôt attribués à la meilleure solubilité des protéines modifiées à pH 8, auquel les essais de microencapsulation ont été réalisés, comme le confirme la Figure 23. En effet, cette solubilité maximale (proche de 100%) va permettre un déploiement optimal des chaînes autour des molécules d'ibuprofène et par conséquent une meilleure protection.

II.3.3 Influence du ratio protéine/ibuprofène

Parallèlement, nous avons également étudié l'influence du ratio protéine/IBU.

Dans le cas de la protéine non modifiée (SPI), les valeurs d'efficacité d'encapsulation sont relativement élevées (supérieures à 80%) néanmoins ces valeurs diminuent quand la proportion d'ibuprofène augmente, passant de 92,6% à 81,9% quand le ratio SPI/IBU varie de 90/10 à 60/40. Des résultats contradictoires ont été publiés: certains sont en accord avec nos résultats que ce soit avec SPI (Deng *et al.*, 2014, Tang and Li, 2013b) ou avec d'autres polymères naturels tels que l'amidon (Rocha *et al.*, 2012), alors que d'autres démontrent la tendance inverse (Nesterenko *et al.*, 2012). Cela laisse penser que la nature de l'actif encapsulé et ses interactions avec les protéines jouent un rôle essentiel. Dans notre cas, l'hydrophobicité de l'ibuprofène est telle que pour des taux élevés d'actif, le caractère hydrophobe de SPI n'est plus suffisant pour le protéger aussi efficacement.

A contrario, dans le cas des protéines acylées (SPA) l'augmentation du caractère hydrophobe due au greffage des chaînes grasses permet d'encapsuler plus efficacement l'ibuprofène y

compris pour un ratio SPA/IBU de 60/40. Une augmentation de l'efficacité est même observée avec l'augmentation de la proportion d'ibuprofène. Des résultats similaires sont rapportés dans la littérature, pour différentes protéines végétales : soja, tournesol ou encore colza (Wang *et al.*, 2015b, Nesterenko *et al.*, 2014b), confirmant la pertinence de l'acylation pour améliorer les propriétés encapsulantes des protéines végétales.

Enfin, dans le cas des protéines succinylées (SPS) la même tendance que pour la protéine non modifiée est observée, mais la diminution de l'efficacité d'encapsulation avec l'augmentation de la proportion d'ibuprofène est beaucoup moins prononcée, passant de 95,4% à 91,4% pour un ratio variant de 90/10 à 60/40.

Pour conclure, ces essais ont démontré l'intérêt de ces modifications chimiques pour l'encapsulation de l'ibuprofène, et ont permis d'aboutir à des microparticules avec des taux d'encapsulation particulièrement élevés (37,5% pour SPA, 36,5% pour SPS) et ce, avec des efficacités d'encapsulation supérieures à 90%.

La caractérisation des microparticules en terme de morphologie, cristallinité (par DRX) et température de dégradation (par TGA), mais surtout les études de libération *in vitro* réalisées à partir de ces microparticules sont plus amplement détaillées dans les deux publications qui suivent.

II.4 Soy Protein Microparticles for Enhanced Oral Ibuprofen Delivery: Preparation, Characterization, and *In Vitro* Release Evaluation

Soy Protein Microparticles for Enhanced Oral Ibuprofen Delivery: Preparation, Characterization, and *In Vitro* Release Evaluation

Maria Antonieta Anaya Castro,^{1,2} Isabelle Alric,¹ Fabien Brouillet,² Jérôme Peydecastaing,¹ Sophie Girod Fullana,² and Vanessa Durrieu^{1,3,4}

¹ Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, Toulouse, France.

² CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Faculté de Pharmacie, Toulouse, France.

³ LCA, INP-ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31030, Toulouse, France.

⁴ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: vanessa.durrieu@ensiacet.fr)

Abstract. The objective of this work was to evaluate soy protein isolate (SPI) and acylated soy protein (SPA) as spray-drying encapsulation carriers for oral pharmaceutical applications. SPI acylation was performed by the Schotten–Baumann reaction. SPA, with an acylation rate of 41%, displayed a decrease in solubility in acidic conditions, whereas its solubility was unaffected by basic conditions. The drug encapsulation capacities of both SPI and SPA were tested with ibuprofen (IBU) as a model poorly soluble drug. IBU-SPI and IBU-SPA particles were obtained by spray-drying under eco-friendly conditions. Yields of 70 to 87% and microencapsulation efficiencies exceeding 80% were attained for an IBU content of 20 to 40% w/w, confirming the excellent microencapsulation properties of SPI and the suitability of the chemical modification. The *in vitro* release kinetics of IBU were studied in simulated gastrointestinal conditions (pH 1.2 and pH 6.8, 37°C). pH-sensitive release patterns were observed, with an optimized low rate of release in simulated gastric fluid for SPA formulations, and a rapid and complete release in simulated intestinal fluid for both formulations, due to the optimal pattern of pH-dependent solubility for SPA and the molecular dispersion of IBU in soy protein. These results demonstrate that SPI and SPA are relevant for the development of pH-sensitive drug delivery systems for the oral route.

KEY WORDS: vegetal protein; microencapsulation; oral route; modified release; pH sensitivity.

INTRODUCTION

The oral route is the predominant and preferred drug delivery route, due to several advantages relating to physiological factors, patient compliance and economical production methods (Chen *et al.*, 2017). Research into innovative drug delivery systems for this route has increased over the last 20 years, largely driven by the growing need for novel drug delivery systems to deal with the many newly developed chemical entities with low solubility or poor permeation characteristics, and the need to improve the delivery of existing drugs (Bosselmann and Williams III, 2012, O'Donnell and Williams III, 2012). The development of pH-sensitive formulations is a particularly relevant strategy for protecting both the gastric mucosa and the active pharmaceutical ingredient (API), controlling the delivery of the API to the gastro intestinal tract and as an attractive alternative to coating (better safety and fewer processing steps). Microencapsulation is one of the most effective methods for drug delivery systems, as it makes it possible to keep the API in an appropriate form in the desired therapeutic range of concentrations, and to optimize drug release (Mehta *et al.*, 2011). Spray-drying is a particularly appropriate technique for microencapsulation. It is the most widely used drying technology in the production of biopharmaceutical formulations, with excellent properties, and it can be used at the industrial scale, as a one-step microencapsulation process (Georgetti *et al.*, 2008, Ameri and Maa, 2006).

The development of effective green or environmentally friendly excipients is a key challenge in pharmaceutical development that has triggered considerable interest in natural polymers, due to their relative abundance, low cost, and biodegradable and eco-friendly profiles (Ogaji *et al.*, 2012). Proteins are a biodegradable and biocompatible option with pertinent functional properties for use as encapsulating materials for APIs. Animal proteins have been investigated for several years and have been found to have good solubility characteristics, over a large pH range, and to be flexible; they therefore have good encapsulating properties (Can Karaca *et al.*, 2015), including for pharmaceutical applications (Hsein *et al.*, 2017a, Bruschi *et al.*, 2003). However, given the increasing numbers of vegetarians and people avoiding dietary lactose, together with the need to prevent potential health problems due to contamination (e.g., bovine spongiform encephalopathy), plant proteins appear to be a more appropriate alternative (Nesterenko *et al.*, 2013a, Reddy and Yang, 2011, Tang and Li, 2013a), although their potential for use in pharmaceutical applications has yet to be explored. Given its low cost, emulsifying properties, gelling capacity, nutritional and technological properties, soy protein isolate (SPI) is one of the most frequently studied plant proteins and is already widely used as a carrier for food and nutraceutical applications (Gharsallaoui *et al.*, 2007, Chen and Subirade, 2009, González-Ferrero *et al.*, 2018, Hadzieva *et al.*, 2017, Tang and Liang, 2017). However, only a few studies have focused on the use of SPI for API encapsulation and pharmaceutical applications, and even fewer have considered chemical modifications to the protein to modulate its functional properties (Caillard *et al.*, 2009).

In this study, we compared soy protein isolate (SPI) and chemically modified soy protein (acylated, SPA), as spray drying encapsulation carriers for oral pharmaceutical applications.

Acylation, by grafting fatty chains onto the free amino groups of the protein, should modulate its pH sensitivity, significantly decreasing its solubility in acid media, thereby reducing drug release in the stomach, and improving bioavailability and absorption in the intestine. Indeed, the attachment of hydrocarbon chains may modify the charge and structural properties of water-soluble proteins, increasing their hydrophobicity and improving protein affinity for hydrophobic drugs and microencapsulation efficiency (Lazko *et al.*, 2004).

Ibuprofen, a BCS (Biopharmaceutical Classification System) class II molecule, was chosen as the model hydrophobic drug for this study. Ibuprofen (IBU) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) widely used as an analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic agent, with poor solubility in water (Abraham *et al.*, 2005, Wood *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2017). The oral administration of IBU can lead to gastrointestinal side effects, such as gastric erosion, peptic ulcer, and bleeding (Yang *et al.*, 2013, Tamilvanan and Sa, 2006). Therefore, there is a need for innovative formulations providing better gastric protection and more rapid release of ibuprofen in the intestine.

The first part of this study involved the acylation of SPI to modulate its pH sensitivity and the characterization of the acylated soy protein (SPA) generated. We then assessed the potential of SPI and SPA for drug encapsulation by spray-drying, for various ibuprofen/protein ratios. Spray-drying conditions were optimized so as to generate ibuprofen-soy protein dried particles in a single step. The microparticles obtained were characterized on the basis of their shape (SEM observations), size (laser granulometry), microencapsulation rate, and efficiency. The *in vitro* release kinetics of IBU were determined in simulated gastrointestinal conditions, at pH 1.2 and pH 6.8 and 37°C. The encapsulated IBU was studied by X-ray diffraction (XRD) and thermogravimetric analysis (TGA).

MATERIALS AND METHODS

Materials

SPI (90% pure) was purchased from Solae Belgium NV (Ieper, Belgium). Ibuprofen (100% pure) was purchased from BASF Corporation (USA). NaOH, 37% HCl, dodecanoyl chloride, acetonitrile (HPLC grade), and pepsin porcine gastric mucosa tested according to European Pharmacopeia 9.5 (Ph. Eur.) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

SPI Characterization

The proximate composition of SPI was determined, including moisture, ash, protein, and lipid contents. Moisture and ash contents were obtained with the standard AOAC methods (International, 1995). Ash content was determined gravimetrically, by incineration at 550°C, and moisture content was determined by drying samples to a constant weight at 105°C.

Protein content was determined by the Kjeldahl method ($N \times 6.25$) (Yew *et al.*, 2011) and lipid content by conventional Soxhlet extraction in cyclohexane for 6 h. Total carbohydrate content was determined by subtracting the sum of the moisture, ash, protein, and lipid

contents from the total mass (Yew *et al.*, 2011). Proximate analysis was carried out in triplicate.

The amino acid profile of SPI was determined on a Biochrom 30 amino acid analyzer (Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France).

Acylation of Soy Proteins

Acylated soy protein isolate (SPA) was prepared by the Schotten–Baumann reaction (Figure 25), as described by Nesterenko *et al.* (Nesterenko *et al.*, 2012). Dodecanoyl chloride (C_{12}) chains were grafted onto the free terminal amine or lysine groups of SPI. This reaction was performed in water and was catalyzed by sodium hydroxide (pH 10), at 50°C for 180min, with aNH_2/C_{12} molar ratio of 1/2. The product was lyophilized and stored at 4°C.

The acylation rate (%) was evaluated by determining the number of functional amine groups by the OPA method (Church *et al.*, 1983).

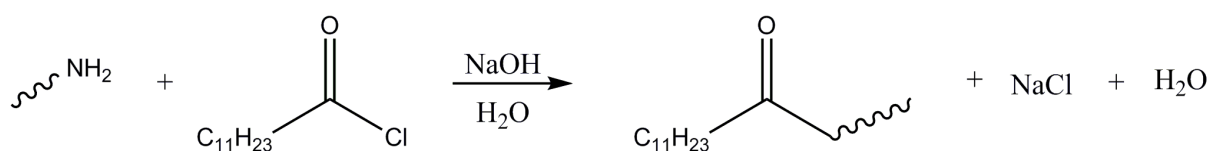


Figure 25. Acylation via Schotten-Baumann reaction

Protein Solubility Profile

Protein solubility profile was determined as described by Zheng *et al.* (Zheng *et al.*, 2008). Protein samples (SPI and SPA) were prepared in deionized water (3% w/w) and the pH of the mixture was adjusted to 1.0–10.0 with 4 M NaOH or 4 M HCl, as appropriate. Each sample was stirred for 1 h at 37°C and centrifuged at 10000×g for 15min (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Germany). The soluble protein content in the supernatant was determined by the Kjeldahl method (triplicate).

Protein solubility (S) was calculated as follows:

$$S (\%) = \text{protein weight in the supernatant} / \text{total protein weight in solution} \times 100$$

Microencapsulation Process

Preparation of Protein/Ibuprofen Solutions

Various ratios of SPI or SPA to IBU were tested: 90/10, 80/20, and 60/40. The solutions were prepared as follows: the protein (acylated or not) was dissolved in deionized water (8% w/w) at room temperature, with magnetic stirring. The pH was then adjusted to 8 (with 2 M NaOH) to dissolve ibuprofen, with magnetic stirring for 30min. The solutions were also stirred mechanically at 500rpm for 30min. High-pressure homogenization was carried out with an

APV Systems homogenizer (Albertslund, Denmark), at 50MPa with double circulation, and to enhance both the stability of the solution and the encapsulation properties of the proteins (Sharif *et al.*, 2017).

Spray-Drying

A Mini Spray Drier B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland) was used to spray 200mL of solution under the following conditions: inlet air temperature $120 \pm 4^\circ\text{C}$ and outlet air temperature $74 \pm 4^\circ\text{C}$, drying air flow rate of 470L/h, liquid feed flow rate of 0.33L/h, and 100% aspiration. Microparticles were collected and stored at 4°C .

Spray-drying yield (%) was calculated as follows:

$$\text{Spray-drying yield (\%)} = M_p / M_{\text{SP+IBU}} \times 100$$

Where M_p is the mass of collected powder and $M_{\text{SP + IBU}}$ is the initial mass of solid content in the solution, including soy protein (acylated or not) and ibuprofen.

HPLC Analysis

Ibuprofen concentration was measured with a HPLC system equipped with a reverse-phase column (PhenomenexGemini® 5 μm C18 110 Å, $250 \times 4.6\text{mm}$) and a precolumn filled with the same phase. The system consists of a DionexP680 quaternary pump, a Dionex ASI-100 auto sampler, an UltiMate 3000 thermostat-controlled column compartment and a Thermo Scientific Ultimate 3000 UV-DAD detector. UV detection was performed at 222nm. The mobile phase was a 60:40 (w/w) mixture of 0.1 M sodium acetate (pH 7) and acetonitrile.

The microparticles (10mg) were dissolved in 50mL of mobile phase and sonicated for 10min, then magnetically stirred for 20min. All samples were passed through cellulose acetate (CA) filters with $0.45\mu\text{m}$ pores and analyzed, in triplicate, by HPLC.

The amount of ibuprofen in the microparticles was determined from a calibration curve (ibuprofen concentration range 0.05–1mg/mL, in the mobile phase). For the *in vitro* release study, two different ibuprofen calibration curves were used to determine the amount of ibuprofen, depending on pH: pH 1.2 with pepsin (ibuprofen concentration range 0.0005–0.02mg/mL) and pH 6.8 (ibuprofen concentration range 0.003–0.2mg/mL).

Microencapsulation Efficiency and Microencapsulation Rate

Microencapsulation efficiency (MEE) and microencapsulation rate (MER) were calculated as follows:

$$\text{MEE} = \text{IBU}_{\text{exp}} / \text{IBU}_{\text{theo}} \times 100$$

Where IBU_{exp} is the amount of ibuprofen in microparticles, determined by HPLC, and IBU_{theo} is the amount of ibuprofen theoretically introduced in the initial solutions.

$$MER (\%) = m_{IBU} / m_m \times 100$$

Where m_{IBU} is the estimated mass of ibuprofen in the microparticles and m_m is the mass of the analyzed microparticle sample.

Microparticle Characterization

Microparticle Size Distribution

Microparticle volume diameters ($D_{4,3}$) were determined by laser diffractometry with a Sirocco 2000 apparatus (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), using a refractive index of 1.52 and a dispersion air pressure of 4 bars.

Morphology

The morphology (internal and external) of the microparticles was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) with a LEO435VP scanning electron microscope (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) operating at 10 kV. The microparticles were deposited on conductive double-faced adhesive tape and sputter-coated with silver.

***In Vitro* Release Kinetics**

Drug release experiments were conducted with models SPI/IBU (90/10) and SPA (90/10). The studies were performed under sink conditions, in flow-through cells (SotaxCE6), as recommended by the European Pharmacopeia 9.5 (Ph. Eur.). Simulated gastrointestinal fluids (SGF and SIF) were used in the closed system (300 or 100mL of dissolution media, at pH 1.2 to simulate gastric conditions and pH 6.8 to simulate conditions in the intestine). The dissolution media were prepared as recommended by Ph. Eur.: simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2, with 0.32% pepsin (w/v), and simulated intestinal fluid (SIF) at pH 6.8. The cells were maintained at 37°C, under a constant flow rate of 8 mL/min. Drug release was followed by sampling 1mL (n = 3) of the medium, at predefined time intervals, for up to 2h. After each sampling, 1mL of pure medium was added in order to maintain sink conditions. The amount of drug released at each time point was determined by the HPLC-UV method described above.

X-ray Diffraction

The powder crystallinity of ibuprofen, SPI, SPA, microparticles, and physical mixtures was assessed by X-ray powder diffraction (EQUINOX 1000, France) at room temperature with a Co target at 30mA and 30 kV, in the region of $5^\circ \leq 2\theta \leq 40^\circ$, with an angular increment of 0.02° s⁻¹ (Li et al., 2008a).

Thermogravimetric Analysis

TGA of ibuprofen, and ibuprofen/protein physical mixtures and microparticles was carried out with an ATG/ETDQ600 from TA Instruments (Newcastle, USA) at a linear heating rate of 10°C/min, under air flow, from 20 to 600°C.

Statistical Analysis

All analyses were carried out in triplicate and the data collected were analyzed by one-way ANOVA with a confidence level of 0.95 and Tukey-Kramer multiple mean comparisons in the MINITAB Release 17 statistical package(Minitab Inc., USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Before chemical modification and evaluation, the composition of SPI was determined, to check that acylation was feasible.

SPI Composition

SPI was found to consist predominantly of protein (87.6%), but it also contained 0.4% lipids, 5.3% ash, 1.4%carbohydrates, and 5.4% moisture. Its amino acid composition (Figure 26) was determined. The protein chains consisted essentially of 17 amino acids, with two amino acids, glutamic acid (17.8%), and aspartic acid (11.6%), predominating, a feature characteristic of plant proteins (Chen and Subirade, 2009). The high levels of carboxyl groups in these plant proteins should confer good solubility in basic conditions. SPI also contained relatively high levels of lysine (6.3%), within the normal range for the proteins of leguminous plants (Nielsen *et al.*, 2001). The amino group of lysine can take part in various chemical reactions involving the formation of amino bonds. SPI is, therefore, particularly suitable for chemical modifications, such as acylation.

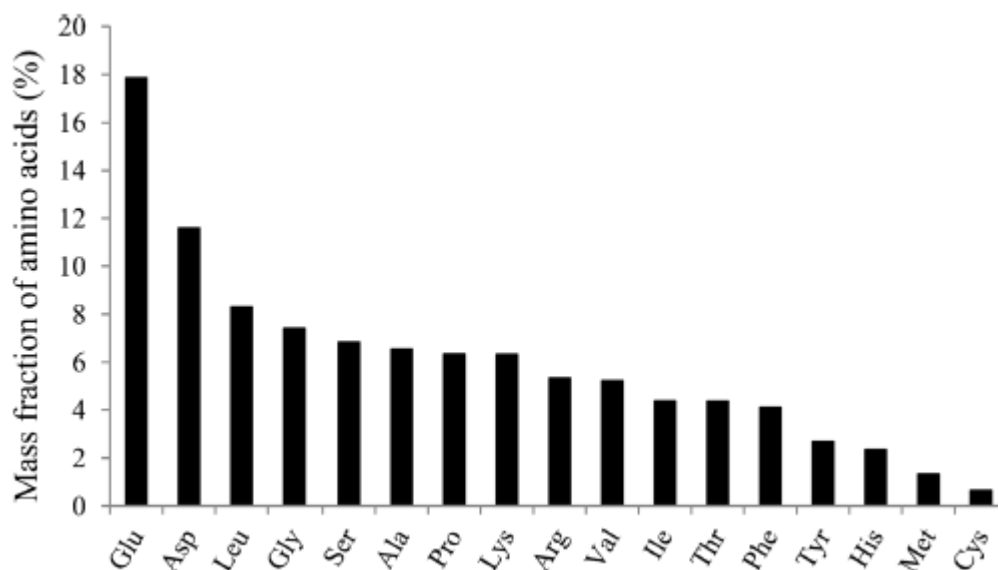


Figure 26. Amino acid composition of soy protein isolate

SPI Acylation

SPI was acylated with dodecanoyl chloride, a cheap, biosourced reagent, which has been shown to improve the encapsulation properties of SPI more effectively than octanoyl and hexadecanoyl chlorides (Nesterenko *et al.*, 2012). A $\text{NH}_2/\text{C}_{12}$ molar ratio of 1/2 was used to obtain a sufficiently high acylation ratio (41%).

The attachment of alkyl chains should increase the surface hydrophobicity of the protein chains, and greater amphiphilicity induced should have an impact on protein solubility and protein/drug interactions. The efficiency of this chemical modification was checked by comparing SPI and SPA solubility profiles.

SPI and SPA pH Solubility Profiles

The pH solubility profiles of SPI and SPA were compared (Figure 27). The pH sensitivity of proteins is determined by the presence of acidic and basic groups in their amino acid chains, which groups can accept or release protons, depending on the pH of the medium (Maltais *et al.*, 2009). The solubility curve of SPI was U-shaped, like those of most plant proteins. Both proteins had a minimal solubility around pH 4–5, corresponding to their isoelectric point. At lower pH values, the protonation of amino groups increased SPI solubility, whereas acylation, which decreased the number of available lysine cationic ammonium groups, prevented this phenomenon (Gruener and Ismond, 1997). At pH values above 6, the carboxylic groups of glutamic and aspartic acids were in their sodium carboxylate form, increasing the solubility of both proteins. In basic conditions (pH 8–10), the solubility profiles of the two proteins were similar, with about 60% solubility, sufficient for effective microencapsulation (Nesterenko *et al.*, 2012), although SPA appeared to be slightly less soluble than SPI, probably due to the presence of lipophilic fatty chains.

These results demonstrate the efficacy of the chemical strategy developed: acylation greatly decreases protein solubility in acidic conditions, without significantly modifying the maximal solubility in basic conditions.

Both SPI and SPA have been tested as potential carriers for encapsulating IBU via spray-drying, in optimized experimental conditions (Nesterenko *et al.*, 2012).

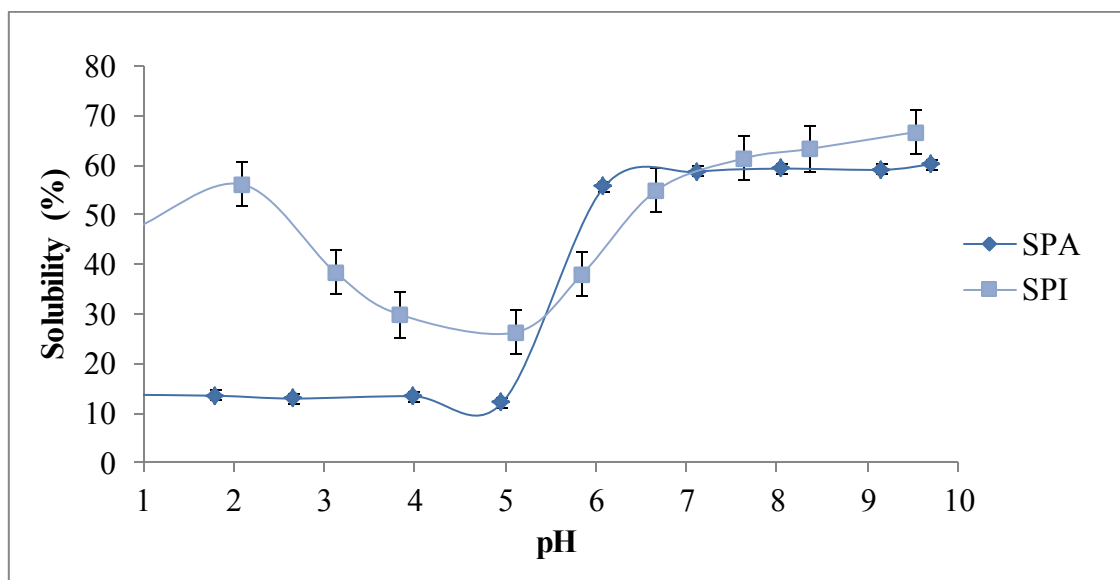


Figure 27. Solubility profiles of SPI and SPA at 3% w/w and 37°C

Microencapsulation Results

The properties of loaded spray-dried microparticles are presented in Table 15.

Spray-drying yields of 70 to 87% were obtained. These values are higher than those previously reported for microencapsulation with plant proteins, ranging from 50 to 70% (Nesterenko *et al.*, 2013a, Wang *et al.*, 2015b). The spray-drying yields obtained in this study, reaching a maximum of 80%, even for high ibuprofen ratios, are very promising in terms of the industrial feasibility of this process.

High MEE values (systematically greater than 80%) were obtained for both proteins and for all soy protein/IBU ratios, confirming the excellent microencapsulation properties of SPI and the suitability of the chemical modification based on acylation. However, SPI- and SPA-loaded microparticles behaved differently.

For SPI-loaded microparticles, an increase in the proportion of IBU (SPI/IBU ratio changing from 90/10 to 60/40) leads to a decrease in MEE from 92 to 82%. Similar results were reported in several previous studies on SPI (Deng *et al.*, 2014, Tang and Li, 2013b), and on other natural polymers, such as modified starch (Rocha *et al.*, 2012). In these studies, the decrease in MEE was explained principally by an increase in total solid content. In this study, increase in the proportion of ibuprofen also resulted in a higher total solid content. However, the decrease in MEE may also be related to the hydrophobicity of ibuprofen, preventing effective protection by SPI when the protein/IBU ratio was too low (high amount of IBU).

By contrast, MEE increased with decreasing SPA/IBU ratio, reaching 94% for SPA microparticles with a SPA/IBU ratio of 60/40. The grafting of hydrophobic hydrocarbon chains onto the protein probably enhanced the affinity of the acylated proteins for the hydrophobic core, even for high ibuprofen contents. Previous studies reported similar results (Wang *et al.*, 2015b, Nesterenko *et al.*, 2014b), for various plant proteins, from soy, sunflower, and rapeseed, for example, confirming the suitability of acylation for improving the encapsulation properties of plant proteins.

Microparticle moisture content was between 1.4 and 3.7%, ensuring microbiological stability (Mendanha *et al.*, 2009). The SPI-loaded microparticles had a higher moisture content than the SPA loaded microparticles, due to the greater hygroscopy of unmodified proteins. Similarly, highly loaded microparticles had a lower moisture content, due their higher content of ibuprofen, a hydrophobic drug.

Microparticles were between 3.5 and 5.8 μm in diameter, except for the SPI 60/40 sample, for which some aggregates were observed, making it difficult to determine the size of the microparticles correctly. These values are consistent with those expected for spray-dried microspheres (Sharif *et al.*, 2017).

Table 15. Properties of loaded spray-dried microparticles

Soy protein / Ibuprofen (% w/w)	Spray-drying yield (%)	MEE (%) [*]	MER (%) [*]	Microparticle size (D _{4,3}) μm	Moisture content of microparticles (%)
SPI	80	-	-	5.0 \pm 0.1bc	5.1 \pm 0.1a
SPA	ND	-	-	4.2 \pm 0.1bc	3.5 \pm 0.3b
SPI 90 / 10	82	92.6 \pm 9.3a	9.3 \pm 0.9d	3.5 \pm 0.2c	3.7 \pm 0.1b
SPI 80 / 20	87	84.1 \pm 3.6a	16.8 \pm 0.7c	4.4 \pm 0.3bc	2.3 \pm 0.1e
SPI 60 / 40	80	81.9 \pm 2.8a	32.6 \pm 1.1b	19.1 \pm 2.0a	3.2 \pm 0.1c
SPA 90 / 10	70	87.4 \pm 3.7a	8.7 \pm 0.4d	4.3 \pm 0.1bc	3.7 \pm 0.1b
SPA 80 / 20	81	86.6 \pm 4.5a	17.3 \pm 0.9c	4.5 \pm 0.1bc	2.8 \pm 0.1d
SPA 60 / 40	87	93.9 \pm 10.2a	37.6 \pm 4.1a	5.8 \pm 0.1b	1.4 \pm 0.1f

Superscripts with the same letters in the same column were not significantly different $P > 0.5$ (Tukey-Kramer multiple mean comparisons)

ND not determined

^{*}Determined by HPLC

Morphology

The morphology of the microparticles was observed by SEM. Some representative micrographs are displayed in Figure 28. The powder consisted of spherical particles with a smooth surface, without fissures or cracks, which protected the ibuprofen well. An uneven shrinkage of the microparticles was observed, and such shrinkage is generally associated with the drying and/or cooling step(s) (Deng *et al.*, 2014). The external structure had wrinkled surface, typical of spray dried microparticles with a high protein content (Liu *et al.*, 2014), but

no significant differences according to the protein or ibuprofen/protein ratio were observed. The internal structure revealed no evident porosity in the matrices, but thinner shells were observed for highly loaded microparticles (60/40 protein/IBU ratio). Moreover, no free drug crystals were observed even for high IBU encapsulation rates.

The size of the microspheres, from 1 to 9 μm , confirmed the values obtained by laser granulometry.

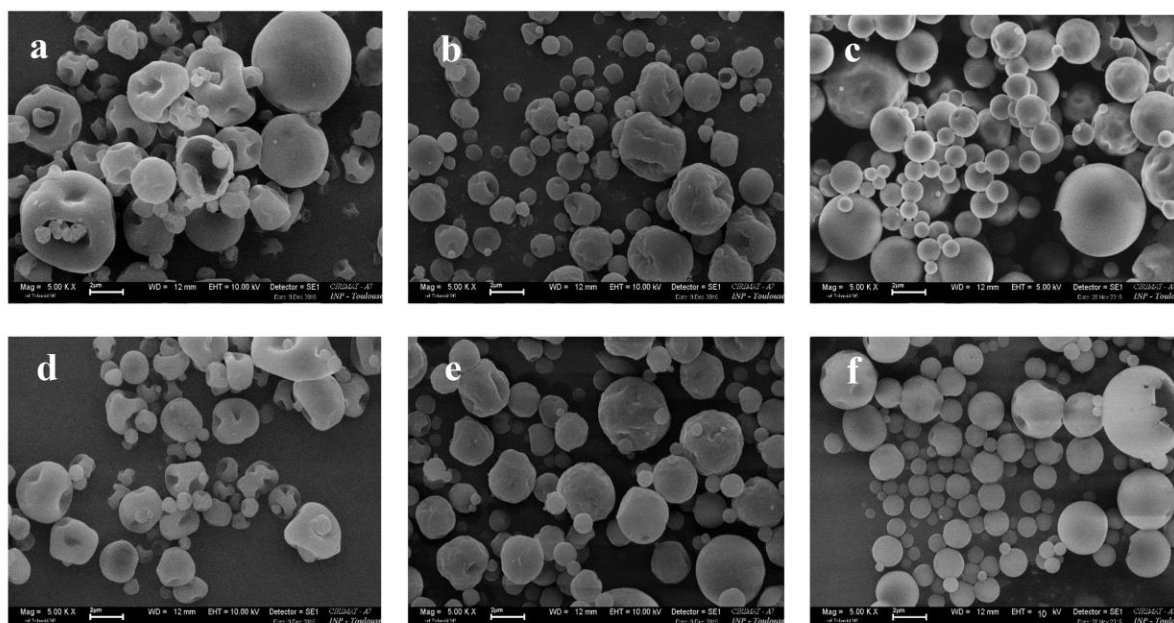


Figure 28. Scanning electron micrographs of microparticles. *a* SPI microparticles. *b* SPI/IBU 80/20. *c* SPI/IBU 60/40. *d* SPA. *e* SPA/IBU 80/20. *f* SPA/IBU 60/40. Magnification of $\times 5000$, scale bars 2 μm

***In Vitro* Release Studies**

IBU, a BCS (Biopharmaceutical Classification System) class II molecule, was chosen as the model drug for encapsulation in SPI and SPA microparticles. The absorption of BCS class II drugs (characterized by low solubility in water and high permeation) can be significantly improved by optimizing the formulation so as to ensure that the drug remains solubilized at the absorption site (Pouton, 2006). This study investigated whether SPI and SPA could be used to improve the delivery of this poorly soluble drug with gastric side effects.

The effect of encapsulation in SPI and SPA microparticles on the solubility of ibuprofen was assessed in dissolution studies performed *in vitro* in sink conditions, with SPI and SPA microparticles loaded with various amounts of IBU (from 10 to 40%) in USP buffers at pH 1.2 or 6.8 USP, for 2 hat 37°C. The dissolution profiles of IBU in two ibuprofen loaded preparations, SPI 90/10 and SPA 90/10, are presented in Figure 29. IBU release kinetics varied considerably with the pH of the medium.

In acidic conditions (i.e., in simulated gastric fluid (SGF)) in the presence of a gastric enzyme (pepsin), a slow release profile was obtained for the IBU encapsulated in microparticles of SPA or SPI, with 28.0 ± 4.3 and $42.8 \pm 4.4\%$ IBU release, respectively, within the first hour.

Significantly less IBU was released from the SPA 90/10 formulation than from the SPI 90/10 formulation ($P < 0.05$).

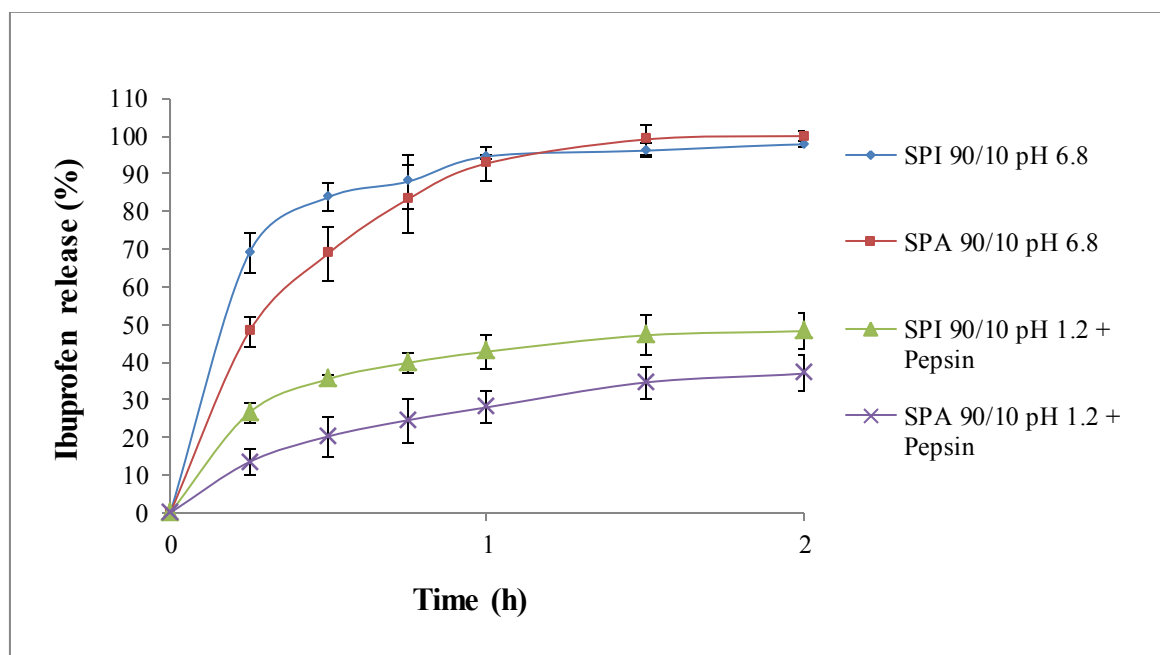


Figure 29. Ibuprofen release kinetics with SPI and SPA (at 90/10 ratio) in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2 with pepsin and simulated intestinal fluid at pH 6.8 (SIF)

These results may be considered to reflect the pH sensitivity of SPI and SPA. Based on solubility data, pH had a significant effect on drug release from IBU-loaded SPI and SPA microspheres. Below the isoelectric point of SPI and SPA ($\text{pH} = 4.5\text{--}5$), the conformation of the protein chain resulted in a compact, shrunken structure and low release rate. This effect was particularly marked for SPA, which insolubility in acidic conditions was enhanced by acylation. In such conditions, the observed release was probably due to drug diffusion, as already reported for whey proteins (Hsein *et al.*, 2017b). However, the observed release levels were higher than expected in SGF, as release was evaluated in the presence of pepsin, a proteolytic enzyme. In this context, the release mechanism involved a combination of diffusion and erosion, for which the rate of release depends on protein content (data not shown). This phenomenon was limited in our case, as pepsin preferentially cleaves the peptide bonds of aromatic amino acids (histidine, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine) (Maltais *et al.*, 2009), of which there are very few in SPI, as shown in Figure 26. The pH sensitivity of SPI and SPA made it possible to obtain pH-sensitive profiles of IBU release kinetics compatible with the oral administration of this drug.

In neutral conditions (i.e., in simulated intestinal fluid (SIF) without enzymes), the release rates were faster, with almost 100% of the IBU released within 90min for both SPA and SPI (99.1 ± 3.9 and $96.1 \pm 1.8\%$, respectively). At pH 6.8, the 90/10 ratio curves for SPA and SPI were similar, with a release of at least 50% of the encapsulated IBU within the first 30 min. These results for SIF may be partly explained by the solubility of SPI and SPA, and, thus, the dissolution of particles at pH 6.8, but remain surprising for a poorly soluble crystalline drug as IBU.

We decided to explore the interactions of IBU with SPI and SPA, which may have a major influence on drug solubility or thermal stability, and, consequently, on drug delivery performance and bioavailability.

The possible interaction between the drug (IBU) and the carrier (SPI and SPA) was investigated, with a view to explaining the results for dissolution in SIF, by characterizing the prepared microparticles, ibuprofen alone, and physical mixtures, by XRD and TGA. An absence of characteristic peaks/transitions of the drug after processing or a shifting of those peaks, on the XRD pattern or the TGA thermogram, indicates changes in the characteristics of the drug or the possibility of drug-carrier interactions (Zheng *et al.*, 2007).

X-ray Diffraction

The X-ray diffraction patterns of IBU were compared with those of IBU-SPI or IBU-SPA physical mixtures and microparticles, for each protein/IBU ratio tested. The X-ray diffraction patterns of IBU, SPI, and of the 60/40 SPI/IBU physical mixture and microparticles are presented in Figure 30. The powder X-ray diffractogram of IBU has sharp peaks at diffraction angles $2\theta=6^\circ, 16^\circ, 17^\circ, 19^\circ, 20^\circ,$ and 22° , showing a typical crystalline pattern (Liu *et al.*, 2017). SPI powder was semicrystalline, with two major peaks (Li *et al.*, 2008a).

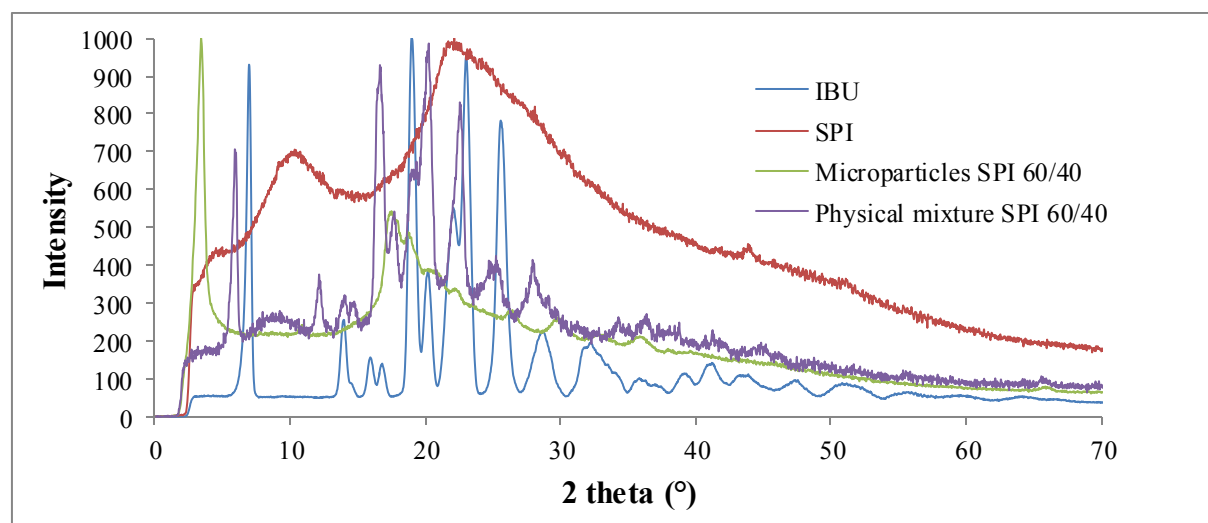


Figure 30. DR-X patterns of ibuprofen, SPI, microparticles, and physical mixture of SPI/IBU 60/40

All the major characteristic crystalline peaks of IBU were also observed in the physical mixture, but were barely detectable in microparticles, suggesting that the IBU was present in an amorphous state in the microparticles. Similar results were reported for IBU encapsulation with gelatin by spray-drying (Li *et al.*, 2008a) or riboflavin encapsulation with soy/zein protein (Chen and Subirade, 2009). Our results suggest that the combination of soy protein and spraydrying led to a change in the crystallinity state of IBU, from a crystalline to an amorphous form. Similar behavior was observed for SPA, confirming that acylation has no impact on the encapsulation properties of soy protein at neutral pH.

Spray-drying is one of the most widely used solvent evaporation procedures in the production of solid dispersions and it often produces amorphous materials (Patel *et al.*, 2015,

Vasconcelos *et al.*, 2007). The amorphous solid state has the advantage of greater solubility and, therefore, faster dissolution rates than crystalline material, as no energy is required to break up the crystal lattice during the dissolution process (Duarte *et al.*, 2011). This, together with the solubility of SPI and SPA at neutral pH, may account for the better dissolution of encapsulated IBU in SIF. This change in crystalline state should increase the oral bioavailability of IBU, by facilitating rapid absorption in the intestine (Zheng *et al.*, 2007).

Thermal Analysis

In addition to XRD, we also performed TGA studies. TG mass loss curves were generated for IBU, SPI, and SPI/IBU physical mixtures and microparticles with a 60/40 ratio of protein to IBU (Figure 31). Similar behavior was observed for both proteins and for higher protein/IBU ratios. Ibuprofen degradation occurred at about 170°C, with complete decomposition at 230°C. Protein degradation did not start until 210°C for SPA, and 250°C for SPI, with mass loss maximal (up to 70%) between 220 and 450°C, as generally observed for plant proteins (Nesterenko *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2015b).

The small loss of mass observed at around 100°C on all curves (other than that for IBU alone) can be attributed to the evaporation of the residual water molecules present in plant proteins (SPI and SPA).

A comparison of the curves for physical mixtures and microparticles demonstrated the efficacy of IBU protection by spray-drying encapsulation. Indeed, thermal degradation began at 170–175°C for physical mixtures, but not until 220°C for microparticles, confirming the improvement in the thermal stability of IBU conferred by this microencapsulation process.

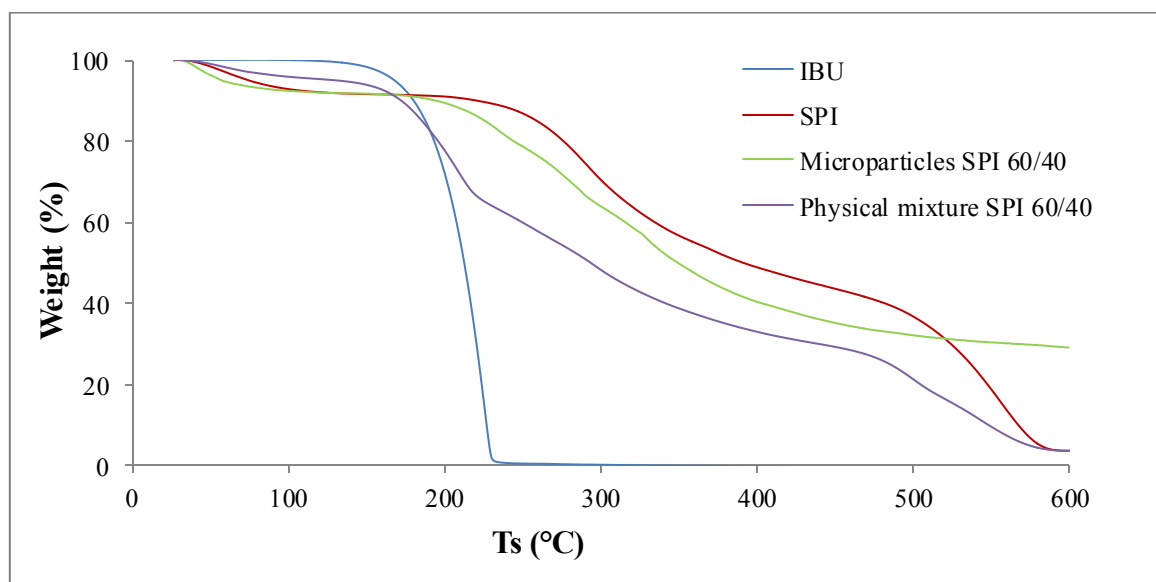


Figure 31. TGA curves of IBU, SPI, physical mixture, and microparticles of SPI/IBU 60/40

CONCLUSION

The results presented here demonstrate the suitability of SPI and SPA as encapsulating materials for API by spray-drying, particularly for delayed release oral applications. Their advantages include pH sensitivity, the possibility of incorporating high proportions of drug (up to 40%), and excellent encapsulation efficiencies (greater than 80%). The acetylation of SPI considerably decreases its sensitivity to enzymes and acidity and, thus, greatly decreases drug release in acidic conditions (simulated gastric fluid). Furthermore, an amorphous molecular dispersion of IBU was obtained, improving the thermal stability of the drug and resulting in its rapid dissolution at neutral pH (simulated intestinal fluid). Thus, SPI and SPA are promising excipients for the development of hydrophobic drug delivery systems for the oral route.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Mexican Council of Science CONACyT for providing financial support, Yannick Thebault and Cédric Charvillat from CIRIMAT for SEM and XRD analyses, and Christine Rey-Rouch from LGC for TGA analyses.

II.5 Spray-dried succinylated soy protein microparticles for oral ibuprofen delivery

Spray-dried succinylated soy protein microparticles for oral ibuprofen delivery

Maria Antonieta Anaya Castro^{1,2}, Isabelle Alric¹,
Fabien Brouillet², Jérôme Peydecastaing¹, Sophie Girod Fullana² and Vanessa Durrieu^{1*}

¹Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, Toulouse, France.

²CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Faculté de Pharmacie, France.

*corresponding author.

Mailing address: LCA, INP-ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France

Tel.: +33 534 323 509; Fax: +33 534 323 597

E-mail address: Vanessa.durrieu@ensiacet.fr

Abstract. The potential value of succinylated soy protein (SPS) as a wall material for the encapsulation of ibuprofen (IBU), a model hydrophobic drug, by spray drying was investigated. A succinylation rate of 93% was obtained for soy protein isolate, with a molar ratio of 1/1.5 (NH₂/succinic anhydride). The solubility profile at 37°C showed that this chemical modification decreased the solubility of the protein below its isoelectric point, whereas solubility increased in alkaline conditions. Various SPS/IBU ratios (90/10, 80/20 and 60/40) were studied and compared with the same ratio of SPI/IBU. High encapsulation efficiency was achieved (91-95%). Microparticles were spherical and between 4 and 8 µm in diameter. The spray-drying of protein/IBU solutions appeared to be beneficial, as it resulted in an amorphous solid dispersion of IBU within the microparticles, coupled with an increase in the thermal stability of IBU. In vitro release was evaluated in acidic (pH 1.2 in the presence of pepsin) and neutral (pH 6.8) conditions similar to those in the gastrointestinal (GI) tract. IBU was released significantly more slowly at pH 1.2, for both proteins. However, this slowing was particularly marked for SPS, for which rapid (within 2 hours) and complete release was observed at pH 6.8. These results validate the hypothesis that SPS is suitable for use as a coating material for hydrophobic active pharmaceutical ingredients (APIs) due to its pH sensitivity, which should delay IBU release in the gastrointestinal tract.

KEY WORDS: Plant protein; Succinylation; Green excipient; Microencapsulation; Oral route; Modified release; pH sensitivity.

INTRODUCTION

In recent decades, the pharmaceutical industry has developed several strategies for the controlled delivery of active pharmaceutical ingredients (APIs), for oral administration in particular, as this is the favoured route, most widely used in patients. Microencapsulation, in particular, has been widely studied, as this method can be used to generate different dosage forms, such as powders, tablets, and capsules (Gupta and Dey, 2013, Boh, 2007).

There is currently very strong demand for new drug delivery systems (DDSs) suitable for the chosen administration route and able to deliver APIs to particular sites, to limit adverse reactions and side effects, and to improve patient comfort (Gupta and Dey, 2013). Microencapsulation is a technological strategy that seems to perform well, particularly for APIs with a short half-life that are rapidly hydrolysed or broken down by enzymes *in vivo*, but also for APIs with low solubility or poor permeation characteristics (Paulo and Santos, 2017, O'Donnell and Williams III, 2012).

Spray drying is a well-established method that is already widely used in the pharmaceutical industry to convert liquid formulations into dry powders, in cheap, fast, easy, scalable one-step processes (Ziaee et al., 2017). This technology can also be used to encapsulate sensitive APIs, to generate relatively uniform and stable particles with high encapsulation efficiencies and without the need for an organic solvent (Hsein et al., 2017).

The choice of encapsulation carrier is one of the key parameters in the design of delivery systems for APIs based on spray-drying. Various natural and synthetic polymers are currently being explored, but the persistent demand for environmentally friendly excipients has led to intensive research into natural polymers, such as polysaccharides and proteins. Plant proteins are cheap and readily available. They also seem to be highly suitable for medical applications, thanks to their bio- and cytocompatibility, and their biodegradability (Mehta et al., 2011, Reddy and Yang, 2011). Moreover, their surfactant and film-forming properties make them attractive for microencapsulation applications. Finally the presence of amino and carboxyl groups on protein chains renders them pH-responsive, a feature that is particularly useful for APIs sensitive to gastric conditions, for which bioavailability may be decreased by passage through the gut (Caillard et al., 2009), or for those known to have gastric side effects (Yang et al., 2013, Boltin and Niv, 2014)

Soy, wheat and maize proteins are the most abundant plant proteins and have been shown to be potentially useful for medical applications (Reddy and Yang, 2011). Microspheres of the maize protein zein have even been formulated as carriers for anticancer drugs (Mathiowitz et al., 1993).

However, there have been few studies investigating the potential of plant protein microparticles for oral API delivery systems, and even fewer evaluating the utility of chemical modifications to improve their pH sensitivity. Conversely, the potential of chemical modifications, such as acylation or succinylation, to expand the range of functions of plant

proteins has driven research activities, particularly for research into microencapsulation applications (Nesterenko et al., 2014a, Nesterenko et al., 2014b, Caillard et al., 2009, Effionora et al., 2016, Anaya Castro et al., 2017).

Succinylation is the addition of succinic acid to protein amino groups, resulting in the replacement of mostly positively charged lysine ϵ -amino groups with carboxyl groups, which are negatively charged (for a pH range of about 4 to 10). This modification leads to chain unfolding and a lower isoelectric point (pI), accompanied by a decrease in solubility below the pI and an increase in solubility above it (Gruener and Ismond, 1997). This chemical modification is used to enhance certain functional properties of proteins, such as solubility, emulsification, and foaming capacity (Shilpashree et al., 2015b). Succinylation is, thus, a possible method for modifying the pH sensitivity of soy protein and controlling the release of active ingredients in gastrointestinal conditions. Furthermore, succinylation is a “soft” modification, and the use of succinic anhydride is approved by the Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2008) and this molecule is considered to be GRAS (generally recognised as safe) by the FDA (Food and Drug Administration) (Shilpashree et al., 2015a).

The aim of this study was to investigate the microencapsulating properties of succinylated soy protein (SPS), comparing them with those of soy protein isolate (SPI), to determine its suitability for use as a multiparticulate drug delivery system.

Ibuprofen (IBU) was chosen as the model drug for this study. Its poor solubility in water and the gastric adverse effects reported following its oral administration (Hawkey, 2000) make this drug a clear candidate for encapsulation and delayed release.

In the first part of the study, SPI was succinylated and the impact of this modification on soy protein solubility was analysed. Modified and native proteins were then used for IBU microencapsulation by spray-drying, with various protein/IBU ratios. The effects of protein succinylation on process yield, IBU encapsulation efficiency, microparticle morphology and size distribution were examined. IBU encapsulation state was assessed by DRX and TGA. Finally, *in vitro* IBU release kinetics were studied in simulated gastrointestinal conditions (pH 1.2 with pepsin, and 6.8, 37°C).

MATERIALS AND METHODS

Materials

SPI (90% pure) was purchased from Solae Belgium NV (Ieper, Belgium). Ibuprofen (100% pure) was purchased from BASF Corporation (USA). All other chemicals for protein modification were of analytical grade. NaOH, 37% HCl, succinic anhydride, acetonitrile (HPLC grade) and pepsin from porcine gastric mucosa tested according to European Pharmacopoeia 9.5 (Ph. Eur.) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

SPI characterisation

SPI proximate composition analysis included determinations of moisture, ash, protein and lipid contents. Moisture and ash contents were determined according to the standard methods of the AOAC (International, 1995). Ash content was determined gravimetrically, by incineration at 550°C, and moisture content was determined by drying samples to a constant weight at 105°C. Protein content was determined by the Kjeldahl method ($N \times 6.25$) (Yew et al., 2011) and lipid content was determined by conventional Soxhlet extraction with cyclohexane for 6 h. Total carbohydrate content was obtained by subtracting the sum of moisture, ash, protein and lipid contents from the total mass (Yew et al., 2011). Proximate analysis was carried out three times for each sample.

The amino-acid profile of SPI was determined with a Biochrom 30-amino acid analyzer (Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France).

Succinylation of soy proteins

The succinylation reaction (Figure 32) involves the replacement of positively charged lysine ϵ -amino groups with negatively charged carboxyl groups through the addition of succinic anhydride.

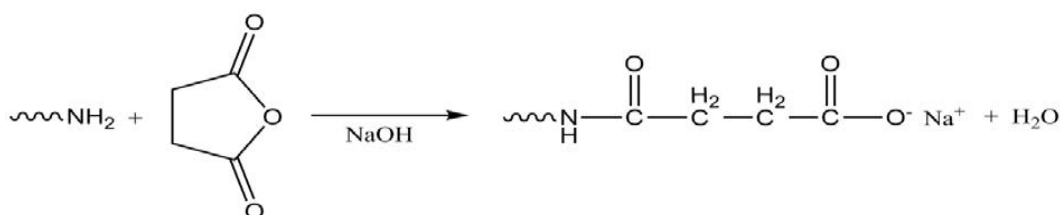


Figure 32. Succinylation reaction of proteins

Succinylated soy protein isolate (SPS) was prepared as described by Shilpashree for the succinylation of milk protein (Shilpashree et al., 2015a). A 200g 5% w/w protein solution in deionised water was prepared in a three-necked flask equipped with a mechanical stirrer and a pH meter. The pH was adjusted to 8-8.5 with 2 M NaOH. Succinic anhydride was added in three stages, over a 30-minute period, with mechanical stirring (500rpm) at room temperature. The molar ratio of NH_2 -proteins/succinic anhydride was 1/1.5. The reaction mixture was then heated at 37°C for 1hour, and pH was maintained at 8-8.5 by adding 2M NaOH solution. The solution was then cooled at room temperature and the pH was lowered to 3-4 by adding 2M HCl, leading to protein precipitation. The reaction mixture was centrifuged at $5000 \times g$ at 20°C for 20 minutes in a 6-16K Sigma Centrifuge (Osteode, Germany). The supernatant was removed and the precipitate was dissolved in 100 mL of water. The pH was adjusted to 7 (with 2 M NaOH solution). The reaction product was lyophilised (Lyophiliser Alpha 2-4, Christ Martin) and stored at 4°C.

The succinylation rate (SR) was calculated by determining the number of amine functional groups by the OPA-method (Church et al., 1983).

$$SR (\%) = [(N_0 - N_s) / N_0] \times 100$$

where

N_0 is the number of mmol of amine groups in the native protein

N_S is the number of mmol of amine groups in the protein after succinylation

A succinylation rate of 93% was obtained.

Protein solubility profile

Protein solubility profile was determined according as described by Zheng *et al.* (Zheng *et al.*, 2008). Protein samples (SPI and SPS) were mixed with deionised water (3% w/w) and the pH of the mixture was adjusted to 1.0–10.0 with 4M NaOH or 4M HCl. Each sample was stirred for 1h at 37°C and centrifuged at 10 000×g for 15min (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Germany). The soluble protein content in the supernatant was determined by the Kjeldahl method (in triplicate). Protein solubility (S) was calculated with the following formula:

$$S (\%) = 100 * \text{protein weight in the supernatant} / \text{total protein weight in solution}$$

Microencapsulation process

Preparation of protein/ibuprofen solutions

Protein/IBU solutions were prepared with different ratios of SPI/IBU or SPS/IBU: 90/10, 80/20 and 60/40, as previously described (Anaya Castro *et al.*, 2017). Protein (succinylated or not) was dissolved in deionised water (8% w/w) at room temperature, with magnetic stirring. The pH was then adjusted to 8 and the IBU was gradually added, with magnetic stirring, over a period of 30min. The solutions were mechanically stirred at 500rpm for 30min, and homogenised at high pressure (50MPa) with double circulation (APV Systems, Albertslund, Denmark).

Spray-drying

The solutions (200mL) were spray-dried in a Mini Spray Drier B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland) under the following process conditions: inlet air temperature at 120±4°C and outlet temperature at 74±4°C, drying air flow rate of 470L/h, liquid feed flow rate of 0.33L/h and 100% aspiration. Microparticles were collected and stored at 4°C.

Spray-drying yield (%) was calculated as follows:

$$\text{Spray-drying yield (\%)} = M_p / M_{SP+IBU} * 100$$

where M_p is the mass of the powder collected and M_{SP+IBU} is the initial mass of solid content in the solution, including soy protein (succinylated or not) and IBU.

HPLC analysis

IBU concentration was determined in an HPLC system equipped with a reverse-phase column (Phenomenex Gemini® 5µm C18 110 Å, 250 x 4.6mm) and a precolumn filled with the same phase. This system consisted of a Dionex P680 quaternary pump, a Dionex ASI-100

autosampler, an UltiMate 3000 thermostat-controlled column compartment and a Thermo Scientific Ultimate 3000 UV-DAD detector. A wavelength of 222 nm was used for UV detection. The mobile phase was a 60:40 (w/w) mixture of 0.1M sodium acetate (pH 7) and acetonitrile.

Microparticles (10mg) were dissolved in 50mL of the mobile phase and sonicated for 10min, and were then stirred magnetically for 20min. All samples were filtered through CA filters with 0.45µm pores and then analyzed, in triplicate, by HPLC.

The amount of IBU in microparticles and for the *in vitro* study was determined from ibuprofen calibration curves, as previously described (Anaya Castro et al., 2017).

Microencapsulation efficiency and microencapsulation rate

Microencapsulation efficiency (MEE) and microencapsulation rate (MER) were calculated as follows:

$$MEE = IBU_{exp} / IBU_{theo} * 100$$

where IBU_{exp} is the amount of ibuprofen in microparticles, as determined by HPLC, and IBU_{theo} is the amount of ibuprofen theoretically introduced in the solutions.

$$MER = m_{IBU} / m_m * 100$$

where m_{IBU} is the estimated mass of ibuprofen in microparticles, and m_m is the mass of the microparticle sample analyzed.

Microparticle characterisation

Moisture content

The moisture content of the microparticles was determined gravimetrically, by oven-drying at 105°C to constant weight.

Microparticle size distribution

The size distribution of the microparticles was determined by laser diffractometry with a Sirocco 2000 machine (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A refractive index of 1.52 was used, with an air dispersion pressure of 4 bars. The volume-based particle diameter ($D_{4,3}$) was calculated as the mean of three measurements per sample.

Morphology

Microparticles were observed by scanning electron microscopy (SEM) with a LEO435VP scanning electron microscope (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) operating at 10kV. They were deposited on a conductive double-faced adhesive tape and sputter-coated with silver.

X-ray diffraction

The powder crystallinity of ibuprofen, SPI, SPS, microparticles and physical mixtures was assessed by X-ray powder diffraction (EQUINOX 1000, France) at room temperature with a Co target at 30mA and 30 kV in the $5^{\circ} \leq 2\theta \leq 40^{\circ}$ region, with an angular increment of $0.02^{\circ} \text{s}^{-1}$ (Li et al., 2008).

Thermogravimetric analysis (TGA)

TGA was carried out with an ATG/ETD Q600 machine from TA Instruments (New castle, USA), at a linear heating rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ under air flow, from 20°C to 600°C . The thermal stabilities of ibuprofen, ibuprofen/protein physical mixtures and microparticles are presented on TG curves.

In vitro release kinetics

Drug-release experiments were performed under sink conditions in flow-through cells (Sotax EC6), as recommended by the European Pharmacopoeia 9.5 (Ph. Eur.), with SPI/IBU and SPS/IBU (90/10) microparticles. Simulated gastrointestinal fluid (SGIF) was used in a closed system (300 or 100mL of dissolution medium at pH 1.2 and pH 6.8, respectively). The dissolution medium was as recommended by Ph. Eur. The release medium was simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2 supplemented with 0.32% pepsin (w/v), and simulated intestinal fluid (SIF) at pH 6.8. The cells were maintained at 37°C , under a constant flow rate of 8 mL/min. Drug release was followed by taking 1mL samples ($n=3$) at predefined time intervals for 2h. The amount of drug released at each time point was determined by the previously described HPLC-UV method.

Statistical analysis

The experimental data were subjected to statistical analysis with the MINITAB Release 17 statistical package (Minitab Inc., USA). A one-way analysis of variance (ANOVA) with a confidence level of 0.95 and Tukey-Kramer tests for multiple comparisons were performed.

RESULTS AND DISCUSSION

SPI composition

As previously reported (Anaya Castro et al., 2017), the SPI used consisted essentially of protein (87.6%), but also contained 0.4% lipids, 5.3% ash, 1.4% carbohydrates and 5.4% water.

An analysis of SPI amino-acid composition revealed a predominance of two amino acids: glutamic acid (17.8%) and aspartic acid (11.6%), accounting for the low isoelectric point of

the protein ($pI = 5$). Lysine levels were also relatively high (6.3%), and the free amino groups of this amino acid could be used for chemical modifications, such as succinylation.

Zhao *et al.* (2018) reported very similar results for a SPI containing 18.37-17.59% glutamic acid, 10.45-11.47% aspartic acid and 5.16-5.62% lysine (Zhao *et al.*, 2018).

Impact of succinylation on soy protein solubility

The effect of succinylation on soy protein solubility is shown in Figure 33. SPI has a typical bell-shape pH-solubility profile, with minimum solubility at the isoelectric point. Succinylation led to a significant decrease in solubility at pH values below the pI . This effect can be explained by the removal of ammonium groups from lysine residues by succinylation, leading to the presence of too few hydrophilic cationic groups to counterbalance hydrophobic protein-protein interactions, and, thus, protein-protein aggregation (Gruener and Ismond, 1997). Conversely, at pH values above 6 (i.e. above the pK_a), the carboxyl groups of both glutamic and aspartic acids, and those induced by succinylation, were in their hydrophilic sodium carboxylate forms, enhancing interactions between the protein and water and, thus, protein chain unfolding and solubility (Shilpashree *et al.*, 2015a).

These solubility profiles highlight the relevance of the chosen chemical modification, as succinylation greatly decreased protein solubility in acidic conditions and maximised solubility (almost 100%) at pH values above 6.

Protein/IBU solution spray-drying experiments were performed at pH 8, to maximise the solubility of IBU and proteins, and ensure effective encapsulation.

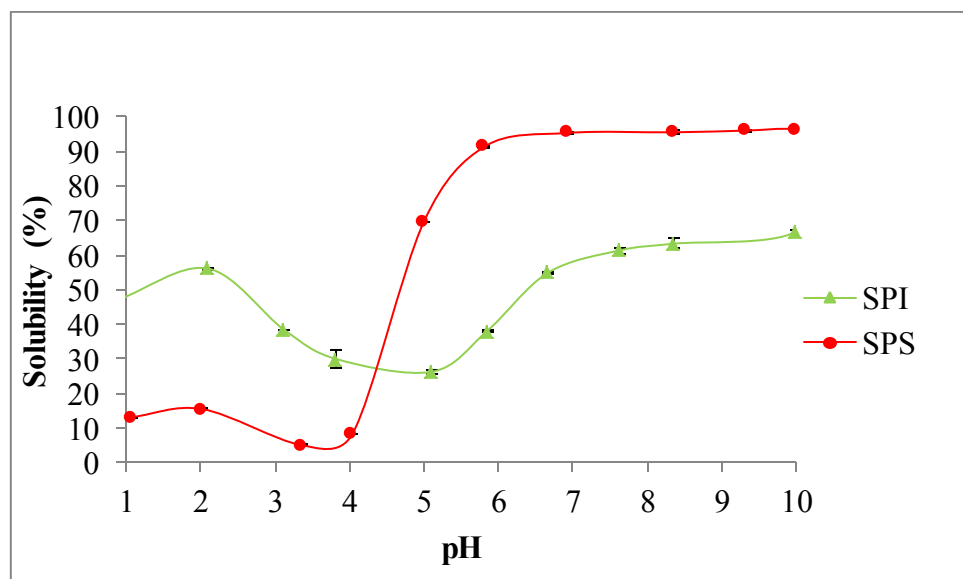


Figure 33. Solubility profile of SPI and SPS as a function of medium pH

Impact of succinylation on microencapsulation

Process yield, microencapsulation efficiency (MEE) and rate (MER), microparticle size (Table 16) and morphology (Figure 34) were determined for spray-dried microparticles of unloaded SPI and SPS, and for SPI/IBU and SPS/IBU microparticles loaded with various amounts of IBU (from 90/10 to 60/40 ratios, % w/w).

Table 16. Properties of loaded spray-dried microparticles

Soy protein / Ibuprofen (% w/w)	Spray- drying yield (%)	MEE (%)*	MER (%)*	Microparticle size (D _{4,3}) µm	Moisture content of microparticles (%)
SPI	80	-	-	5.0±0.1 ^c	5.1±0.1 ^a
SPS	77	-	-	5.3±0.1 ^c	3.5±0.4 ^{bc}
SPI 90 / 10	82	92.6±9.3 ^{ab}	9.3±0.9 ^c	3.5±0.2 ^c	3.7±0.1 ^b
SPI 80 / 20	87	84.1±3.6 ^{bc}	16.8±0.7 ^d	4.4±0.3 ^c	2.3±0.1 ^d
SPI 60 / 40	80	81.6±2.8 ^c	32.6±1.1 ^b	19.1±2.0 ^a	3.2±0.1 ^{bc}
SPS 90 / 10	78	95.4±0.6 ^a	9.5±0.1 ^c	4.7±0.1 ^c	3.8±0.1 ^b
SPS 80 / 20	76	92.4±1.0 ^{ab}	18.5±0.2 ^c	5.0±0.1 ^c	3.2±0.1 ^{bc}
SPS 60 / 40	72	91.4±0.7 ^{abc}	36.6±0.3 ^a	7.6±0.1 ^b	2.8±0.2 ^{cd}

^{a,b,c} Superscripts with the same letters in the same column were not significantly different $P>0.5$ (Tukey-Kramer multiple mean comparisons).

ND= Not determined

*Determined by HPLC

Microparticles loaded with protein and IBU were successfully prepared by the spray drying technique. Spray drying yield ranged from 72 to 87%, and was higher than published values for the use of plant proteins for spray-drying encapsulation (Effionora et al., 2016, Nesterenko et al., 2014a, Nesterenko et al., 2013, Wang et al., 2015) and IBU encapsulation (Gonnissen et al., 2008, Ziaee et al., 2017).

MEE values were highly satisfactory, exceeding 80% for all experiments. However, several significant differences were observed. For a given protein/IBU ratio, MEE was higher for SPS than for SPI, particularly for high IBU contents (91.4% and 81.6%, respectively), confirming the relevance of the chosen chemical modification for optimising IBU encapsulation. This higher encapsulation efficiency can be attributed to the higher solubility of SPS (at pH 8), enhancing protein chain unfolding, thereby improving the encapsulation of the IBU molecules.

Conversely, MEE decreased for at high levels of IBU loading, for both proteins, but this decrease was significantly smaller for SPS microparticles. With SPS, it was possible to load the microparticles with large amounts of IBU (MER greater than 36%) with a very high MEE, greater than 91%.

IBU-loaded microparticle moisture content was slightly lower than reported in many previous studies (Nesterenko et al., 2012) due to the hydrophobicity of IBU. It ranged from 2.3 to 3.8%, ensuring microbiological stability (Mendanha et al., 2009).

SEM micrographs (Figure 34) showed that spray-dried microparticles had similar morphologies, regardless of the protein used and the protein/IBU ratio. They were round, with no fissures or disruption, ensuring that the API was well-protected (Silva et al., 2014). A wrinkled surface may occur due to uneven shrinkage during drying or a high protein content at the surface (Li and Tang, 2013). Microparticle diameter, as measured by laser granulometry, ranged from 3.5 to 7.6 μm (Table 1), consistent with SEM observations. The aggregates of SPI microparticles observed on SEM may account for the large diameters obtained for these microparticles (19.1 μm). In addition, the microparticles had a trimodal size distribution (results not shown), with a majority population at about 5 μm . Microparticle size was unaffected by formulation. The initial solutions had a low viscosity, and the particle sizes obtained were those expected for a B-290 spray dryer (Nesterenko et al., 2014a).

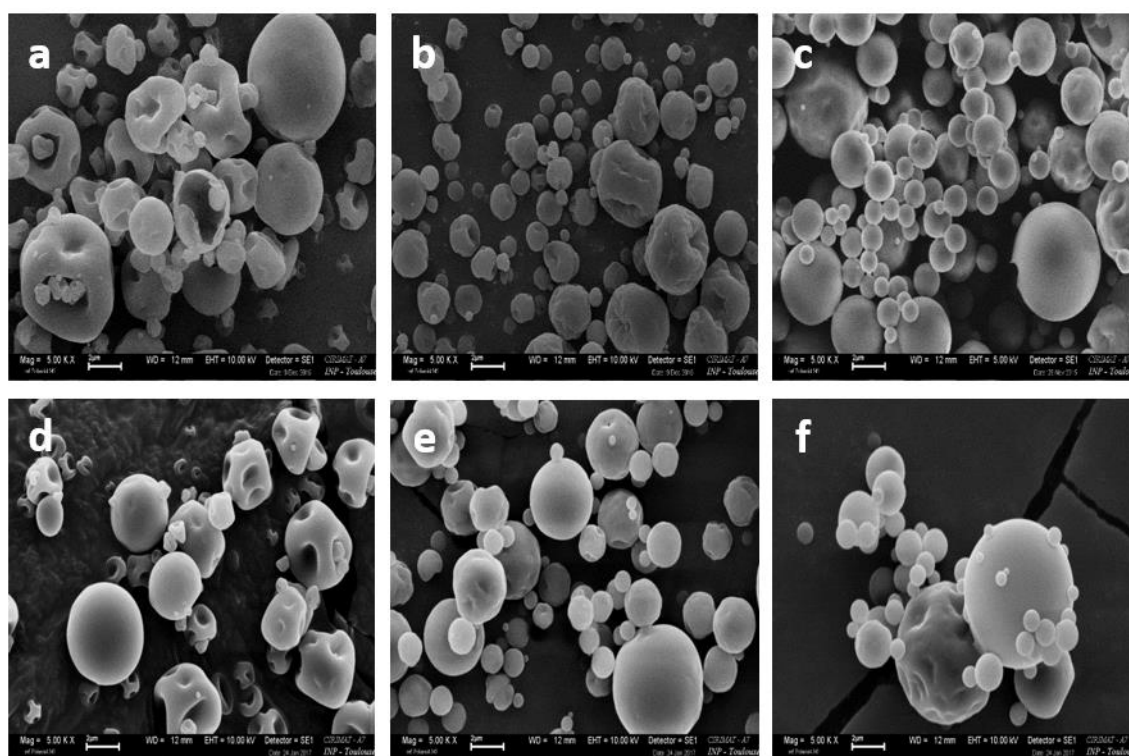


Figure 34. Scanning electron micrographs of microparticles: a) SPI microparticles, b) SPI 80/20, c) SPI 60/40, d) SPS, e) SPS 80/20, f) SPS 60/40. X5000 scale bar 2 μm .

Crystalline state of encapsulated IBU

The crystalline state of encapsulated IBU was assessed by X-ray powder diffraction (XRD). The XRD patterns of IBU were compared with those for physical mixtures and microparticles of SPI or SPS with IBU, for each protein/IBU ratio tested. The XRD patterns of IBU, SPS, and a 90/10 SPS/IBU physical mixture and microparticles are presented in Figure 35. The powder X-ray diffractogram of IBU had sharp peaks at diffraction angles $2\theta =$

6°, 16°, 17°, 19°, 20° and 22°, demonstrating a typical crystalline pattern (Liu et al., 2017). SPS powder was semicrystalline, with only one main peak, whereas SPI was characterised by two major peaks (Chen and Subirade, 2009). This change in XRD pattern suggests that the chemical modification led to a change in conformation. All the characteristic major crystalline peaks of IBU were also observed in the physical mixture but were barely detectable in microparticles, suggesting that IBU was in an amorphous state in the microparticles. Spray-drying is known to trigger the formation of amorphous solid dispersions (Patel et al., 2015, Vasconcelos et al., 2007), a phenomenon that has been reported for IBU encapsulation with gelatin (Li et al., 2008), acylated soy protein (Anaya Castro et al., 2017), or HPMCP-HP55 and Kollidon VA 64 (Ziaee et al., 2017). This change in crystalline form would be expected to increase solubility and, thus, the bioavailability of drugs poorly soluble in water (Ogawa et al., 2018).

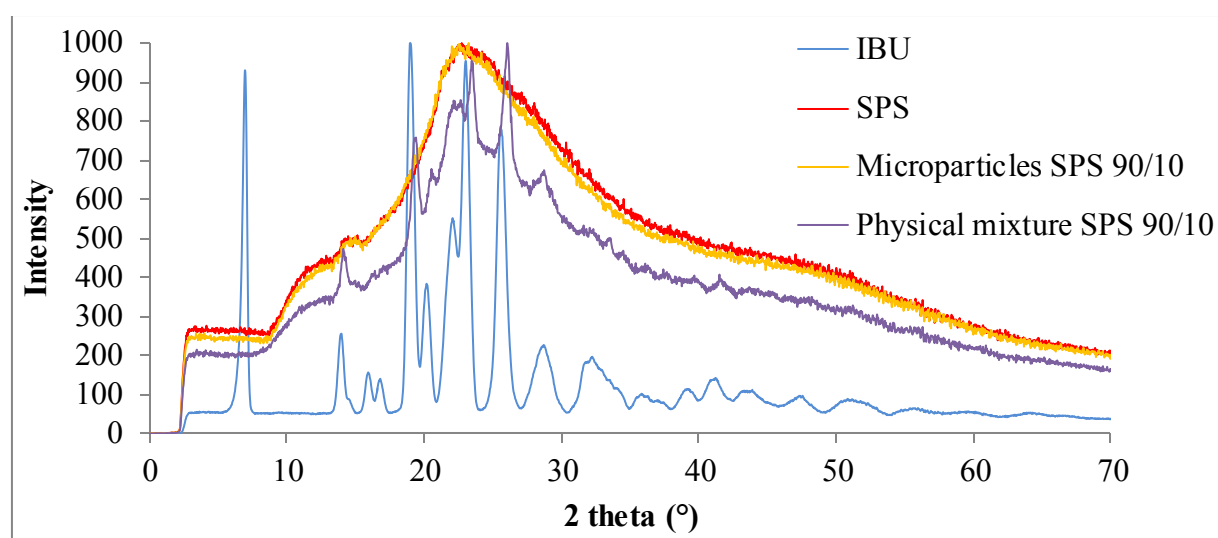


Figure 35. DR-X patterns of Ibuprofen, SPS, and SPS/IBU 90/10 physical mixture and microparticles.

Thermal properties of encapsulated ibuprofen

The thermal properties of encapsulated IBU were studied by thermogravimetric analysis (TGA). The TG mass loss curves of IBU, SPS, and SPS/IBU 60/40 physical mixtures and microparticles are presented in Figure 36. Similar behavior was observed for the two proteins and for other protein/IBU ratios. Ibuprofen degradation occurred at about 170°C, with complete decomposition at 240°C, due to the evaporation of IBU (Du and He, 2010, Xu et al., 2004). Protein degradation did not begin until 230°C for SPI, and 250°C for SPS, with maximal mass loss occurring between 250 and 450°C, as generally observed for plant proteins (Wang et al., 2015, Nesterenko et al., 2012).

The small mass loss observed at about 100°C, for all curves (except that for IBU,) can be attributed to the evaporation of residual water molecules from the plant protein (SPS).

A comparison of the curves for physical mixtures and microparticles demonstrated that encapsulation in SPS by spray drying effectively protected the IBU. Indeed, the thermal

degradation of physical mixtures began at 170-175°C, whereas no degradation was observed until 250°C for SPS-IBU microparticles, confirming that this microencapsulation process prevented the thermal degradation of IBU.

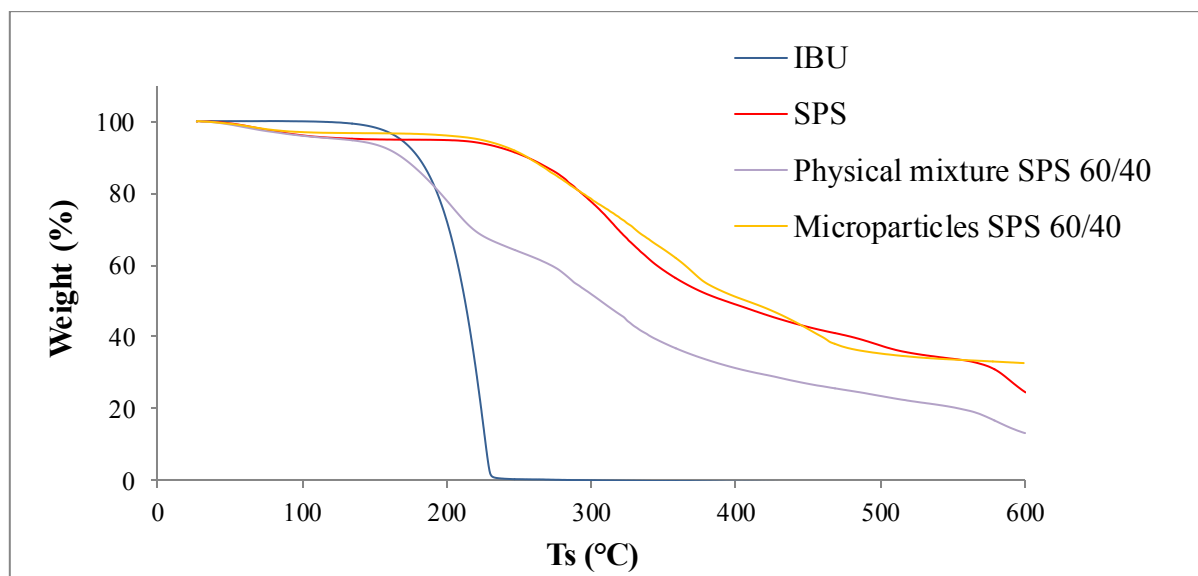


Figure 36. TGA curves of IBU, SPS, and SPS/IBU 60/40 physical mixture and microparticles.

Impact of succinylation on IBU *in vitro* release

The kinetics of IBU release *in vitro* were studied in simulated gastrointestinal fluids, SGF and SIF, in sink conditions, for 2 h at 37°C. IBU was chosen as a model BCS (Biopharmaceutical Classification System) class II drug for this study. Indeed, the absorption of BCS class II drugs (characterised by low solubility and high permeability) can be significantly improved by optimising the formulation so as to maintain the class II drug in a soluble state at the absorption site (Pouton, 2006). Moreover, IBU is a good candidate for delayed release because it is known to have gastric side-effects.

We showed, in a previous study, that the pH sensitivity of SPI can be used to decrease IBU release in acidic conditions (Anaya Castro et al., 2017). In this study, we investigated whether succinylation could be used to optimise control over this advantageous property.

In vitro dissolution studies were performed on IBU-loaded SPI and SPS microparticles, with IBU contents of 10 to 40% w/w. The dissolution profiles of IBU from two IBU-loaded preparations, SPI 90/10 and SPS 90/10, are presented in Figure 37.

In both cases, IBU release kinetics differed considerably between pH conditions, due to the change in soy protein solubility with pH. Below the isoelectric point, the conformation of the protein chains resulted in a dense structure responsible for lower levels of IBU release in SGF. In these conditions, the mechanism of IBU release in SGF may involve a combination of: (i) rapid release into the medium of IBU molecules located at the surface of the microparticles (burst but limited release); (ii) the diffusion of encapsulated IBU out of the

hydrated microparticles; (iii) the action of pepsin, a proteolytic enzyme, accelerating IBU release in a protein content-dependent manner, by triggering microparticle erosion (Caillard et al., 2009). However, this effect is probably very limited with soy protein, as pepsin preferentially cleaves the peptide bonds of aromatic amino acids (histidine, phenylalanine, tryptophan and tyrosine) (Maltais et al., 2009), of which there are very few in SPI. Above the isoelectric point (i.e. in SIF), the protein microparticles rapidly dissolved, releasing their content.

Soy protein succinylation amplified this phenomenon, particularly in acidic conditions. Under simulated gastric conditions, the release profile of IBU differed significantly ($P < 0.5$) between SPI and SPS microparticles. IBU release was slower for SPS, reaching 34% in 2 hours, whereas about 50% of the total IBU content was released over the same time period for SPI. These findings are consistent with the solubility profiles of the two proteins (Figure 2), as the solubility of the modified protein is much lower than that of the native protein in acidic conditions. The replacement of positively charged lysine residues with negatively charged carboxyl groups decreased both the isoelectric point of the protein (pI from 4.5 to about 3.5) and its charge density (Caillard and Subirade, 2011), resulting in a decrease in electrostatic repulsion between proteins at pH 1.2, and protein unfolding (Caillard and Subirade, 2012). Consequently, forces acting over short distances, such as van de Waals attraction and hydrophobic effects, dominated (Caillard et al., 2009), potentially leading to hydrophobic IBU–SPS interactions, slowing IBU release.

Under simulated intestinal conditions, at pH 6.8, IBU release was rapid for both formulations, with more than 70% of the IBU released after 15 minutes, and complete IBU release after 1 hour. The rate of IBU release from SPS was slightly higher than that from SPI, but this difference was not statistically significant. The amorphisation of encapsulated IBU, which increased solubility, leading to the rapid degradation of protein microparticles in the release medium, did not reveal an effect of greater SPS solubility at neutral pH. However, IBU release from SPS microparticles appeared to be more even, with a lower standard deviation during the first hour. SPS appears to be a valuable candidate for controlling and delaying the release of hydrophobic APIs, given the lower levels of IBU release observed in acidic conditions and the rapid release of this API at neutral pH.

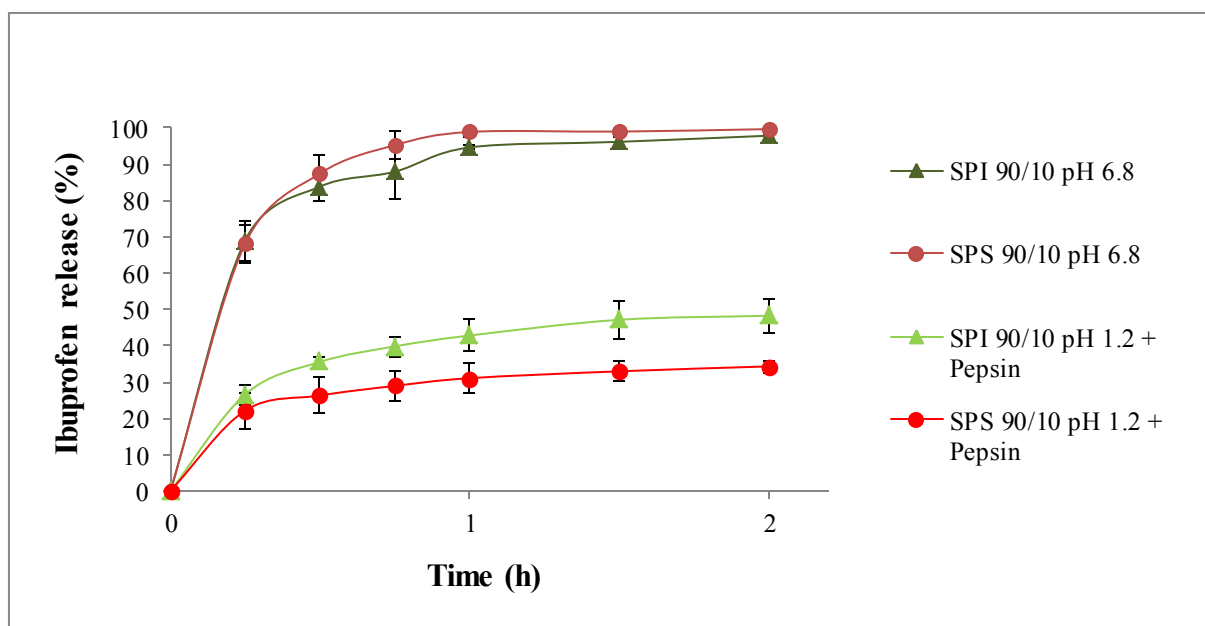


Figure 37. Ibuprofen release kinetics with SPI and SPS (at 90/10 ratio) in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2 with pepsin and simulated intestinal fluid at pH 6.8 (SIF).

CONCLUSION

The results presented demonstrate the suitability of SPS for the encapsulation of hydrophobic APIs by spray-drying, particularly for delayed-release oral applications. Succinylation greatly decreased protein solubility at acidic pH while maximising solubility (almost 100%) at pH values above 6. Higher encapsulation efficiencies were thus obtained for IBU (higher than 90%), a model hydrophobic drug. Individual microparticles were observed, even at high IBU contents (protein/IBU ratio of 60/40). *In vitro* release kinetics reflected the optimised pH-sensitivity of SPS, resulting in lower levels of IBU release in acidic conditions than were observed with SPI microparticles. The chemical modification of soy protein did not affect the change in IBU crystalline state upon spray drying. An amorphous molecular dispersion of IBU was obtained, which improved the thermal stability of the drug (by comparison with IBU alone and with IBU encapsulated in SPI) and resulted in rapid dissolution at neutral pH (simulated intestinal fluid), for both proteins. SPS therefore appears to be a promising material for the encapsulation of hydrophobic API in a multiparticulate form for delayed delivery. Such microparticles could be administered as a powder or in a capsule form, via the oral route.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Mexican Council of Science CONACyT for providing financial support, Yannick Thebault, Cédric Charvillat from CIRIMAT for SEM and XRD analyses, and Christine Rey-Rouch from LGC for TGA analyses.

***Chapitre III. Evaluation des protéines
végétales, modifiées ou non, en tant
qu'excipients pour la formulation de
comprimés gastrorésistants***

III.1 Objectifs

III.1.1 Effet des modifications chimiques sur la libération d'un actif modèle, l'ibuprofène, à partir des microparticules de protéine de soja

Les expérimentations du chapitre II nous ont permis d'explorer les effets de deux types de modifications chimiques, l'acylation et la succinylation, sur la capacité des protéines de soja à microencapsuler (par atomisation) et relarguer de l'ibuprofène (IBU), utilisé comme molécule modèle représentant un PA BCS de classe II, et nécessitant une mise en forme pour une libération retardée pour la voie orale. Les résultats obtenus ont permis de montrer l'influence de ces modifications chimiques sur la solubilité et la pH-sensibilité de la protéine de soja, et mettre en évidence les conséquences de cette pH-sensibilité sur le relargage de l'IBU en milieux digestifs gastrique et intestinal (FGS et FIS) simulés (Figure 38 et Figure 39).

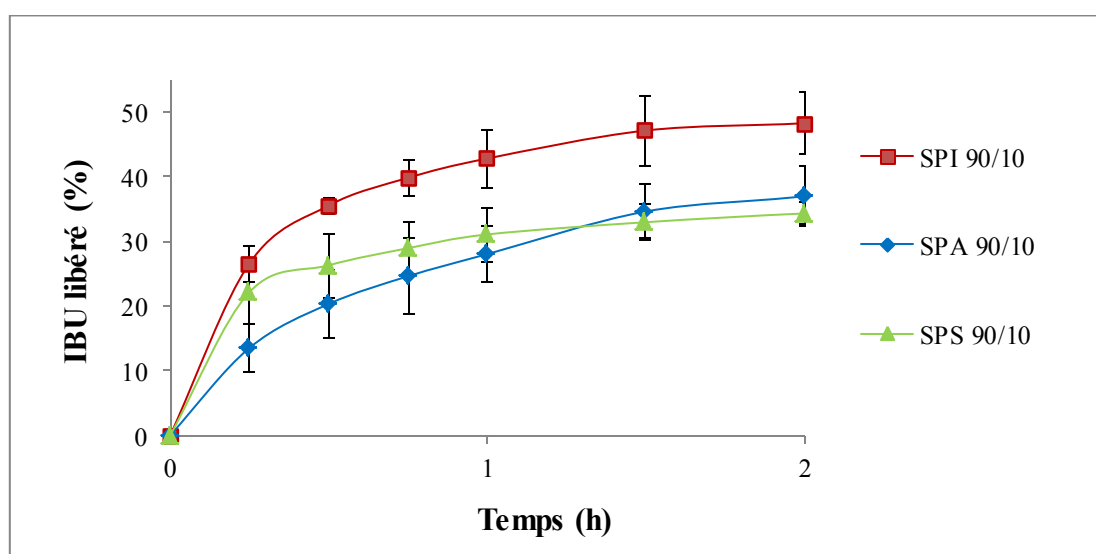


Figure 38. Cinétique de libération d'IBU à partir des microparticules SPI, SPA et SPS, au taux protéine/IBU de 90/10, à pH 1,2 en présence de pepsine

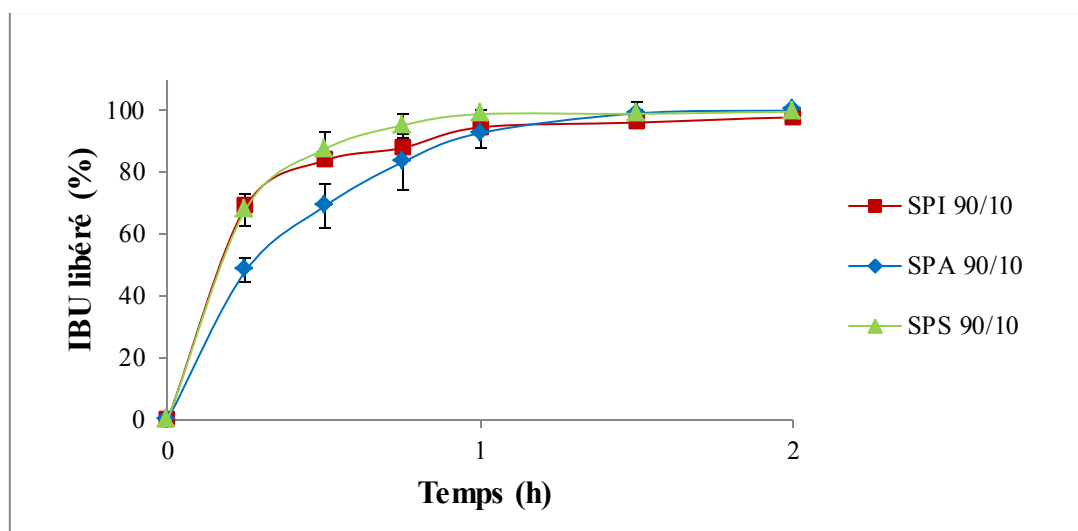


Figure 39. Cinétique de libération d'IBU à partir des microparticules SPI, SPA et SPS, au taux protéine/IBU de 90/10, à pH 6,8

S'ils ont permis de montrer l'intérêt et l'efficacité des modifications chimiques appliquées à la protéine de soja, les résultats n'ont cependant pas permis d'aboutir à des formulations gastrorésistantes à proprement parler. Néanmoins, des cinétiques ralenties ont été obtenues à pH acide (Figure 38) comparativement à celles réalisées à pH neutre (Figure 39), et ce quelle que soit la protéine testée.

Les taux de libération d'IBU observés à pH acide peuvent s'expliquer par la présence d'IBU en surface des microparticules, à l'origine d'une libération rapide sur les premières minutes des cinétiques, puis par la diffusion de l'IBU hors des microparticules protéiques. Les taux libérés sont majorés par la présence de pepsine, celle-ci étant une enzyme protéolytique clivant préférentiellement les liaisons peptidiques des acides aminés aromatiques comme l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine (Maltais *et al.*, 2009). Cette action enzymatique a pour conséquence d'entraîner l'érosion des microparticules, ce qui majore le taux d'actif libéré par rapport à des cinétiques réalisées en pH acide sans enzyme. Nous avons d'ailleurs observé que les % d'IBU libéré à pH acide en présence de pepsine étaient d'autant plus importants que la proportion en protéine était importante dans les microparticules. Néanmoins ces effets enzymatiques restent limités du fait des faibles proportions d'acides aminés aromatiques dans les protéines de soja ; au bout de 2h en SGF moins de 50% de l'IBU a été libéré dans le cas de la SPI, moins de 40% dans le cas de SPA et SPS.

A pH acide en présence de pepsine, les effets des modifications chimiques des protéines de soja sont nettement visibles. Des taux de libération d'IBU significativement diminués, et plus reproductibles, ont été obtenus par rapport à ceux obtenus à partir des microparticules de SPI. Ainsi, dans le cas des ratios protéines/IBU 90/10, pour lesquels les effets sont les plus visibles en raison de la proportion plus importante de protéines par rapport au PA, 28% et 31% de l'IBU est libéré au bout d'une heure dans le cas des microparticules en SPA et SPS, respectivement, contre 43% dans le cas des microparticules en SPI. Cette diminution de libération de l'IBU, de l'ordre de 30% est la conséquence des modifications chimiques de la protéine de soja sur sa solubilité et sa densité de charge (Figure 40). Les possibilités d'interaction intra- et inter-chaines qui en découlent, tout comme les capacités d'interaction entre la protéine, modifiée ou non, et l'actif encapsulé jouent un rôle essentiel dans le mécanisme de libération.

Ainsi, l'acylation a permis de diminuer fortement la solubilité de la protéine jusqu'à un pH de 5, ce qui se traduit logiquement à pH acide par un gonflement moindre des particules en présence d'eau par rapport à celles en SPI. En outre, la présence de chaînes grasses permet d'augmenter les capacités d'interaction de type hydrophobe de la protéine avec l'ibuprofène. Ces deux phénomènes permettent d'expliquer la diminution des taux d'IBU libérés en milieu gastrique à partir de la SPA, par rapport à la SPI.

Dans le cas de la succinylation, la presque totalité des fonctions amines (93 %) de la SPI, responsables de sa solubilité à pH acide, ont été remplacées par des fonctions acides carboxyliques. Le point isoélectrique de la protéine est décalé vers pH 3,5 environ au lieu de 5,5 (Caillard and Subirade, 2011). La succinylation entraîne une modification de conformation de la protéine à pH acide, qui se déplie, ainsi qu'une diminution des possibilités d'interactions ioniques entre les chaînes protéiques, et favorise plutôt la mise en place d'interactions de faible énergie type Van der Waals ou hydrophobe (Caillard *et al.*, 2009) entre les chaînes protéiques et avec le PA. De ce fait les particules de SPS gonflent moins en présence d'eau et permettent l'obtention d'un gel plus dense que la SPI en présence de SGF. Ce gel, très stable, permet l'obtention d'un taux de libération d'IBU par diffusion dans le SGF significativement diminué par rapport à la SPI et plus stable au cours du temps que celui obtenu avec la SPA (moins de 10% de variation entre le taux d'IBU libéré après 1h et 2h dans le SGF dans le cas de la SPS contre 25% de variation dans le cas de la SPA). Ces différences pourraient s'expliquer par une action moindre de la pepsine sur la SPS du fait du changement de conformation de la protéine. Ceci a déjà été rapporté pour la zéine dont les acides aminés

aromatiques se retrouvent plus ou moins exposés en fonction de la structure qu'elle adopte (Shukla and Cheryan, 2001).

A pH neutre, en milieu SIF, les effets des modifications chimiques des protéines de soja sont peu visibles. A pH 6,8, SPI, SPA et SPS sont solubles et les particules se délitent, libérant la totalité du PA encapsulé en 45 minutes à 1h. Au-delà de pH 5, la totalité des fonctions acides carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques des protéines sont sous forme de carboxylates, les chaînes protéiques sont donc chargées négativement ; les interactions entre chaînes protéiques diminuent et celles avec l'eau augmentent (Fennema, 1993). A pH 7 SPI et SPA sont solubles à 60%. Dans le cas de la SPS cette solubilité est augmentée pour atteindre quasiment 100% à pH 6, du fait du remplacement de la presque totalité des fonctions amines (93 %) de la SPI par des fonctions acides carboxyliques (Shilpashree *et al.*, 2015a, Caillard *et al.*, 2009). On aurait donc pu s'attendre à une libération plus rapide à partir des formulations en SPS. Elle est effectivement sensiblement plus rapide sur la première heure par rapport à la SPA, mais n'apparaît étonnamment pas plus rapide que les formulations en SPI. On peut supposer que cela est lié à la rapidité de délitement des microparticules en milieu FIS, qui ne permet pas de mettre en évidence des différences entre les formulations. Une étude complémentaire en FIS en présence de pancréatine permettrait peut-être la mise en évidence de différences entre les formulations, mais les résultats publiés dans la littérature tendent à montrer que, même en présence de pancréatine, l'influence de la succinylation des protéines sur leur capacités de libération d'actif en milieu intestinal n'est pas toujours visible (Caillard *et al.*, 2011, Caillard and Subirade, 2012).

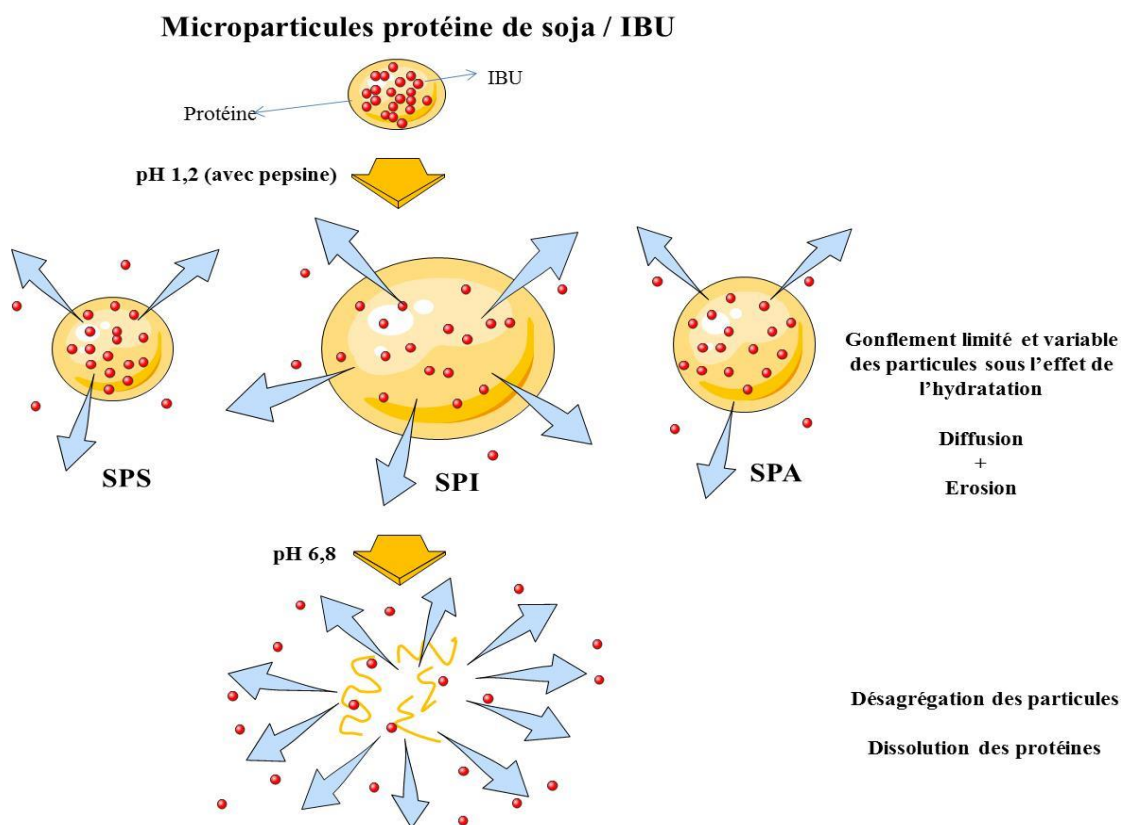


Figure 40. Illustration du mécanisme de libération de l'IBU à partir des microparticules SPI, SPA et SPS, en fonction du milieu de libération (FGS et FIS).

III.1.2 Exploration de l'intérêt potentiel des protéines de soja en tant qu'excipient pour la mise en forme de comprimés gastrorésistants

Au vu des résultats des cinétiques de libération de l'IBU à partir des microsphères, la pH-sensibilité optimisée de la protéine de soja peut donc permettre d'envisager une libération retardée du PA, avec une libération minimisée dans l'estomac et donc une limitation des effets indésirables à ce niveau. **Ces microsphères pourraient constituer la première étape d'obtention d'une forme gastrorésistante, en les incorporant ensuite dans une gélule (capsule dure) ou dans une forme comprimé.**

Cette dernière partie du travail a eu pour but, dans une première approche, de regarder s'il est possible d'utiliser les microparticules de protéine de soja, modifiée ou non, chargées en IBU, pour réaliser des comprimés gastrorésistants par compression directe et d'évaluer leurs

propriétés pharmacotechniques. Il s'agit donc d'une **étude de faisabilité de mise au point de formulation, sur le modèle des comprimés MUPS.**

Ce choix de forme comprimé a été dicté par plusieurs raisons. Cette forme est la forme préférentielle de la VO, en raison de sa facilité de fabrication, sa commodité de dosage et sa stabilité (Jivraj *et al.*, 2000). Dans l'industrie pharmaceutique, il existe principalement trois méthodes de fabrication de comprimés, le choix dépend de la dose, des propriétés physicochimiques du principe actif et des propriétés physiques du mélange (Bushra *et al.*, 2008). Dans la cadre de ce travail, **nous avons choisi la méthode la plus simple, la compression directe, pour rester en cohérence avec notre objectif premier qui est de proposer une alternative technologique la plus simple possible aux formes gastrorésistantes traditionnelles.**

La compression directe permet d'obtenir comprimés directement à partir des mélanges du principe actif et excipients seulement en deux étapes: le mélange et la compression. Les principaux avantages de la compression directe sont sa simplicité, sa rapidité (son nombre d'étapes est moindre) et son coût inférieur (elle demande moins d'équipements, moins d'énergie et d'espace) aux autres méthodes d'obtention de comprimés, les granulations par voie sèche ou humide (Terashita and Imamura, 2002, Bushra *et al.*, 2008, Widodo and Hassan, 2015).

Cette étude de faisabilité a été réalisée en 4 étapes :

- 1^{ère} étape : **évaluation pharmacotechnique** des propriétés de la poudre de protéine de soja isolée SPI, issue du fournisseur, et non atomisée par nos soins (appelée non atomisée par la suite), afin de déterminer ses propriétés intrinsèques en tant qu'excipient pour compression directe ;
- 2^{ème} étape : **screening de formulations** de comprimés contenant des quantités croissantes de protéine de soja isolée, afin de déterminer le taux optimum de protéine de soja incorporable dans une formulation pour compression directe. Pour cela une évaluation pharmacotechnique des mélanges de poudres à comprimer, puis des comprimés a été réalisée selon les tests préconisés par la Pharmacopée Européenne (Edition 9.5) ;
- 3^{ème} étape : **évaluation pharmacotechnique** des formulations les plus pertinentes (mélanges de poudres à comprimer et comprimés) contenant une part fixe de

microparticules de protéine de soja non modifiée (SPI), acylée (SPA) ou succinylée (SPS) au taux protéine/IBU de 90/10 ;

- 4^{ème} étape : réalisation **d'essais de dissolution de l'ibuprofène** à partir de ces formulations.

III.2 Evaluation pharmacotechnique des propriétés de la poudre de protéine de soja non atomisée

L'ibuprofène présente une mauvaise compressibilité du fait de sa nature hydrophobe. Sa poudre est très cohésive et a tendance à se coller sur les pistons des machines à comprimé (Rasenack and Müller, 2002). De ce fait ce principe actif ne peut être comprimé directement et nécessite d'être formulé.

Dans un premier temps, l'écoulement et l'aptitude au tassement de la poudre de protéine de soja isolée, non atomisée, utilisée pour ces travaux de thèse, a été réalisée. La poudre présente des propriétés pouvant être qualifiées d'«extrêmement médiocres», selon l'échelle d'aptitude à l'écoulement de la Pharmacopée Européenne 9.5; elle ne s'écoule pas. Ces résultats démontrent que cette poudre seule présente de piètres propriétés pour une utilisation en tant qu'excipient pour compression directe, ce qui est en adéquation avec ce qui avait été constaté par Caillard *et al.* Il faut néanmoins pondérer ces résultats par le fait que la comprimabilité et la compressibilité des poudres de protéines peuvent varier selon la densité des poudres et leur taux d'humidité (Caillard and Subirade, 2011) , ainsi que selon la taille des particules (Caillard *et al.*, 2011).

Les propriétés de la poudre de protéine de soja pourraient être grandement améliorées par atomisation, technique qui est déjà utilisée pour améliorer les propriétés d'usage des excipients pharmaceutiques, comme par exemple le lactose. La taille des particules est connue pour influencer la comprimabilité des mélanges de poudre (van Veen *et al.*, 2005). Malheureusement, nous n'avons pu, pour des raisons de temps, explorer cet aspect d'optimisation de la fonctionnalité de la poudre de protéine de soja isolée. De même, il ne nous a pas été possible d'étudier les caractéristiques pharmacotechniques, en termes d'écoulement et d'aptitude au tassement, des protéines modifiées, après atomisation ou non, en raison des trop faibles quantités à disposition.

III.3 Screening de formulations de comprimés sans principe actif, contenant des quantités croissantes de protéine de soja

III.3.1 Critères de choix des éléments de la formulation des comprimés

La poudre de protéine de soja isolée a été associée à d'autres excipients pharmaceutiques pour réaliser un mélange de poudre utilisable par compression directe. Pour ce faire, un tel mélange doit présenter un écoulement et une aptitude à la compression compatibles avec l'utilisation d'une machine à comprimé ; ces propriétés sont essentielles à évaluer lors d'un screening de formulations. Dans la littérature les protéines de soja non modifiées ou succinylées ont déjà été testées pour la réalisation de comprimés 100% protéiques obtenus à partir d'une presse (Caillard *et al.*, 2009, Caillard and Subirade, 2011, Maltais *et al.*, 2010). Néanmoins **elles ne l'ont jamais été en mélange de poudre optimisé pour la compression.**

Selon la Pharmacopée Européenne (9^{ème} édition), les comprimés sont définis comme «des préparations solides contenant 1 unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Les comprimés sont le plus souvent destinés à la voie orale. Les particules sont constituées d'une ou de plusieurs substances actives, additionnées ou non d'excipients tels que : diluants, liants, désagrégeants, agents d'écoulement, lubrifiants, composés pouvant modifier le comportement de la préparation dans le tube digestif, colorants autorisés par l'Autorité compétente, aromatisants. Ils se présentent généralement sous la forme d'un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés.». Une formule simple de comprimés peut être considérée composée d'un ingrédient actif, d'un diluant et d'un lubrifiant (Di Martino *et al.*, 2004).

Jivraj *et al.* ont classé les diluants pour compression directe en termes de désintégration et propriétés d'écoulement comme présenté dans le Tableau 17.

Tableau 17. Principaux diluants pour compression directe (Jivraj et al., 2000)

Classification	Exemple	Commentaires
Matériaux qui peuvent agir comme agents de désintégration avec de mauvaises caractéristiques d'écoulement	Cellulose Microcristalline	<ul style="list-style-type: none"> - Probablement les excipients de compression directe les plus largement utilisés. - Excellente comprimabilité à basse pression, grande capacité de dilution.
	Amidon directement compressible	
Matériaux à écoulement libre qui ne se désintègrent pas	Phosphate de calcium dibasique dihydraté	Excellentes propriétés d'écoulement.
Matériaux à écoulement libre qui se désintègrent par dissolution	Lactose	<ul style="list-style-type: none"> - Le β-lactose anhydre possède d'excellentes propriétés de comprimabilité. - Capte l'humidité et peut être moins compatible avec les composés sensibles à l'humidité que la forme monohydrate.
	Sorbitol	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne comprimabilité. - Populaire dans les comprimés à croquer en raison de son goût frais en la bouche.
	Mannitol	<ul style="list-style-type: none"> - Hygroscopique

Lactose et cellulose microcristalline (CMM) sont les diluants les plus communément utilisés dans les mélanges de poudre pour compression directe. Ce sont en fait des familles d'excipients dont les propriétés peuvent varier en fonction de son état cristallin/amorphe et du procédé d'obtention en ce qui concerne le lactose; de la taille des particules, de leur densité et de leur taux d'humidité en ce qui concerne la CMM. De ce fait, nous avons choisi pour le screening de formulation préliminaire: un lactose, le FlowLac 90, et deux celluloses microcristallines: Avicel PH 302NF et Avicel PH 102SCG. La sélection de ces excipients, tous adaptés à la compression directe, s'est basée sur leurs principales caractéristiques et avantages présentés dans le Tableau 18, établi d'après les documentations des fournisseurs. Afin de préserver la cohérence de notre démarche tous sont d'origine naturelle, et obtenus par atomisation, afin de garder une homogénéité dans le procédé d'obtention des principaux excipients de nos comprimés.

Tableau 18. Principales caractéristiques des excipients utilisés pour le screening de formulation.

Excipient	Caractéristiques	Valeurs Typiques	Avantages
Avicel PH 302NF (cellulose microcristalline)	Poudre blanche sans odeur et insoluble dans l'eau	Taille des particules : 100µm Densité apparente [g/cc]:0,35-0,46	- Grade de haute densité - Favorise l'uniformité de poids - Evite la ségrégation des poudres et permet d'atteindre de bons écoulements (http://www.signetchem.com/product.aspx?prdid=2)
Avicel PH 102SCG (cellulose microcristalline)	Poudre blanche sans odeur et insoluble dans l'eau	Taille des particules : 100 µm Densité apparente [g/cc]: 0,28 - 0,33	Améliore l'écoulement en compression directe, en phase sèche de granulation humide et en granulation sèche. (http://www.signetchem.com/product.aspx?prdid=2)
FlowLac 90 (Lactose monohydrate et amorphe)	Poudre blanche, sans odeur, soluble dans l'eau	Taille des particules : 150µm Densité apparente [g/l]: 560 Densité tassée [g/l]: 670 Facteur d'Hausner: 1,2 Index Carr: 16,42 %	- Ecoulement amélioré - Excellente comprimabilité - Peu hygroscopique et très stable - Amène à des temps courts de désintégration - Recommandé pour les PA à écoulement médiocre (https://www.meggle-pharma.com/en/lactose/9-flowlac90.html)

La cellulose microcristalline (CMM) est utilisée comme diluant et présente une bonne compressibilité (Bi *et al.*, 1999). L'Avicel grade PH facilite la compression directe par amélioration de la compressibilité et des propriétés de la poudre (Thoorens *et al.*, 2014). L'Avicel PH102 présente un écoulement optimisé, et l'Avicel PH302 une plus grande densité pour une gamme taille de particules identique au PH102.

Du fait de son obtention par atomisation, le FlowLac[®]90 se présente sous la forme d'agglomérats sphériques, constitués de petits cristaux d'alpha-lactose monohydrate liés par du lactose amorphe. Il est utilisé pour apporter une plus grande comprimabilité aux poudres pour compression directe (Boschini *et al.*, 2015).

Le Tableau 19 montre les différents lubrifiants et leur utilisation en compression.

Tableau 19. Principaux lubrifiants et leur utilisation (Davies, 2004)

Lubrifiant	Niveau requis (%)	Commentaires
Stéarate de magnésium	0,2-2,0	Hydrophobe, propriétés variables selon les fournisseurs
Stéarate de calcium	0,5-4,0	Hydrophobe
Stéaryl fumarate de sodium	0,5-2,0	Moins hydrophobe que les stéarates métalliques, partiellement soluble
Polyéthylène glycol 4000 et 6000	2,0-10,0	Soluble, une plus faible activité lubrifiante que les sels d'esters d'acides gras
Laurylsulfate de sodium	1,0-3,0	Soluble, agit également comme agent mouillant
Laurylsulfate de magnésium	1,0-3,0	Agit comme agent mouillant
Benzoate de sodium	2,0-5,0	Soluble
Huile minérale légère	1,0-3,0	Hydrophobe
Huiles végétales hydrogénées	1,0-5,0	Hydrophobes, utilisées à des concentrations plus élevées
Acide stéarique	0,25-2,0	Hydrophobe
Béhénate de glycéryle	0,5-4,0	Hydrophobe également utilisé comme agent de libération contrôlée

Le stéarate de magnésium est le lubrifiant le plus efficace, favorisant l'éjection des comprimés depuis la chambre de compression (Turkoglu *et al.*, 2005). Dans notre étude, le stéarate de magnésium a été utilisé comme lubrifiant antifriction (à hauteur de 1% w/w) et l'Aerosil R972, silice colloïdale hydrophobe de grande pureté, amorphe, anhydre comme agent d'écoulement/glidant (à hauteur de 0,5 % w/w).

III.3.2 Evaluation pharmacotechnique des mélanges de poudres contenant des proportions variables de protéine de soja

Des mélanges de poudre (SPI + diluant + lubrifiant + glidant) contenant des proportions variables de diluant et d'isolat de protéine de soja SPI (cette dernière occupant de 10 à 40% w/w de la formulation) ont été réalisés. Ce type de formulation correspond à une formulation classique pour compression directe permettant de mettre en évidence l'impact de la présence de protéines dans les comprimés (Hsein *et al.*, 2017b). Les mélanges ont ensuite été caractérisés d'après les recommandations de la Pharmacopée Européenne 9.5 (écoulement, aptitude au tassement, Indice de Hausner et Indice de compressibilité).

Le Tableau 20 montre les résultats obtenus. Les formulations y sont désignées comme suit : Nom du diluant_taux de SPI. Concernant l'écoulement, toutes les formulations testées s'écoulent en moins de 10 secondes, démontrant l'amélioration des propriétés de la poudre à compresser lorsque la poudre de protéine de soja est formulée en mélange.

Les formulations qui contiennent du Flowlac 90 présentent un temps d'écoulement similaire ($P < 0.5$) quel que soit le pourcentage de protéine dans la formulation. De la même façon, leurs indices de Carr et de Hausner sont très similaires : la coulabilité des mélanges de poudre avec le Flowlac comme diluant est considérée comme «assez bonne» quelle que soit la proportion de protéine de soja testée.

Dans le cas des formulations préparées avec Avicel PH302 et Avicel PH102, il existe des différences statistiquement significatives ($P < 0.5$) entre les temps d'écoulement, qui augmentent avec la proportion de protéine. En réalité, si on considère l'aptitude à l'écoulement des mélanges de poudre contenant de l'Avicel PH102, elle est, selon que l'on considère l'indice de Carr ou de Hausner, à la limite entre «assez bonne» et «passable» pour 20 à 40% de SPI. Dans le cas des formulations avec Avicel PH102, leur aptitude à l'écoulement est légèrement moindre, elle peut être qualifiée de «passable» pour des taux de SPI de 10 à 30% et ne devient «assez bonne» que pour 40% de SPI.

L'ensemble des résultats montre que tous les mélanges de poudres testés sont acceptables pour une mise en forme comprimé. Les résultats obtenus en termes d'indice de compressibilité sont similaires à ceux obtenus dans le cas de comprimés à base de protéine de lait dénaturées (Hsein *et al.*, 2017b), et même meilleurs pour les taux de protéine de 40%.

Tableau 20. Détermination des propriétés d'écoulement et de tassement des formulations contenant des proportions variables de protéine de soja, sans principe actif

Formulation	Temps d'écoulement (s)	Aptitude au tassement (mL)	Indice de Hausner	Indice de Carr	Aptitude à l'écoulement
Avicel PH302_10% SPI	6,03±0,05 ^{de}	25	1,15	13,02	Bonne
Avicel PH302_20% SPI	6,60±0,12 ^{cd}	44	1,26	20,56	Assez Bonne /Passable
Avicel PH302_30% SPI	6,80±0,09 ^{cd}	44	1,26	20,91	Assez Bonne /Passable
Avicel PH302_40% SPI	7,69±0,08 ^{abc}	45	1,26	20,35	Assez Bonne /Passable
Avicel PH102_10% SPI	7,18±0,17 ^{bcd}	53	1,28	21,86	Passable
Avicel PH102_20% SPI	8,23±0,23 ^{ab}	48	1,27	21,14	Passable
Avicel PH102_30% SPI	8,37±0,20 ^{bc}	50	1,28	21,60	Passable
Avicel PH102_40% SPI	8,86±0,28 ^a	50	1,25	20,00	Assez Bonne
FlowLac_10% SPI	4,23±0,22 ^f	26	1,21	17,24	Assez Bonne
FlowLac_20% SPI	4,42±0,09 ^f	28	1,21	17,02	Assez Bonne
FlowLac_30% SPI	4,67±0,18 ^f	28	1,20	16,49	Assez Bonne
FlowLac_40% SPI	5,09±0,15 ^{ef}	30	1,20	16,67	Assez Bonne

^{abc} Différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes $P < 0.5$ (comparaisons multiples des moyennes par la méthode Tukey-Kramer)

III.3.3 Evaluation pharmacotechnique des comprimés sans IBU contenant des proportions variables de protéine de soja

Une compression directe a été réalisée sur les différents mélanges de poudres et les comprimés caractérisés en termes de masse, diamètre, épaisseur et volume spécifique (Tableau 21), résistance à la rupture normalisée, friabilité et temps de désintégration (Tableau 22).

Tableau 21. Caractérisation des comprimés contenant des proportions variables de protéine de soja, sans principe actif

Formulation	Masse (g)	Épaisseur (mm)	Diamètre (mm)	Volume spécifique (Vsp)
Avicel PH302_10%_SPI	0,710±0,022 ^c	5,55±0,14 ^{de}	10,79±0,08 ^a	715,26
Avicel PH302_20%_SPI	0,699±0,003 ^{cd}	5,53±0,06 ^{de}	10,82±0,04 ^a	728,49
Avicel PH302_30%_SPI	0,674±0,009 ^{de}	5,60±0,05 ^d	10,82±0,04 ^a	765,66
Avicel PH302_40%_SPI	0,646±0,019 ^e	5,47±0,08 ^{ef}	10,80±0,05 ^a	776,35
Avicel PH102_10%_SPI	0,610±0,004 ^f	5,23±0,02 ^h	10,76±0,06 ^a	781,30
Avicel PH102_20%_SPI	0,600±0,001 ^{fg}	5,27±0,04 ^{gh}	10,73±0,13 ^a	796,52
Avicel PH102_30%_SPI	0,596±0,001 ^{fg}	5,42±0,03 ^{ef}	10,79±0,08 ^a	832,61
Avicel PH102_40%_SPI	0,583±0,010 ^{gh}	5,48±0,05 ^{def}	10,81±0,11 ^a	862,18
FlowLac_10%_SPI	0,925±0,071 ^a	7,90±0,11 ^a	10,84±0,05 ^a	789,10
FlowLac_20%_SPI	0,824±0,004 ^b	7,86±0,05 ^a	10,81±0,07 ^a	877,14
FlowLac_30%_SPI	0,828±0,027 ^b	6,71±0,17 ^b	10,78±0,10 ^a	741,50
FlowLac_40%_SPI	0,718±0,031 ^c	6,00±0,11 ^c	10,80±0,08 ^a	766,71

^{abc} Différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes P<0.5 (comparaisons multiples des moyennes par la méthode Tukey-Kramer)

Tableau 22. Caractérisation des comprimés contenant des proportions variables de protéine de soja, sans principe actif (suite)

Formulation	Résistance à la rupture normalisée (N/mm ²)	Désagrégation (min)	Friabilité (%)
Avicel PH302_10%_SPI	5503,40±194,9 ^a	47,66±4,61 ^b	0,18±0,10 ^{bc}
Avicel PH302_20%_SPI	4859,69±600,5 ^{ab}	59,66±3,51 ^{ab}	0,13±0,03 ^c
Avicel PH302_30%_SPI	3935,78±267,0 ^{bcd}	63,33±2,51 ^{ab}	0,14±0,04 ^c
Avicel PH302_40%_SPI	3604,90±615,9 ^{cd}	75,66±4,16 ^a	0,11±0,05 ^c
Avicel PH102_10%_SPI	4884,69±444,1 ^{ab}	10,92±2,03 ^d	0,51±0,52 ^{abc}
Avicel PH102_20%_SPI	4176,43±157,3 ^{bc}	23,32±1,78 ^{cd}	0,13±0,02 ^c
Avicel PH102_30%_SPI	3035,23±204,2 ^{de}	28,33±5,50 ^c	0,25±0,28 ^{bc}
Avicel PH102_40%_SPI	2456,55±402,2 ^c	26,00±9,00 ^{cd}	0,29±0,05 ^{bc}
FlowLac_10%_SPI	2081,92±643,3 ^c	17,66±2,30 ^{ed}	0,73±0,27 ^{ab}
FlowLac_20%_SPI	331,79±50,5 ^f	9,66±2,51 ^d	1,05±0,07 ^a
FlowLac_30%_SPI	2953,78±968,8 ^{de}	59,66±10,78 ^{ab}	0,51±0,07 ^{abc}
FlowLac_40%_SPI	4551,11±726,8 ^{abc}	65,66±8,50 ^a	0,30±0,07 ^{bc}

^{abc} Différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes P<0.5 (comparaisons multiples des moyennes par la méthode Tukey-Kramer)

Le réglage de la machine à compression a été effectué pour préparer tous les comprimés selon des conditions identiques, avec une masse autour 500-600mg. Tous les comprimés sont lisses, brillants et présentent un aspect homogène (Figure 41).

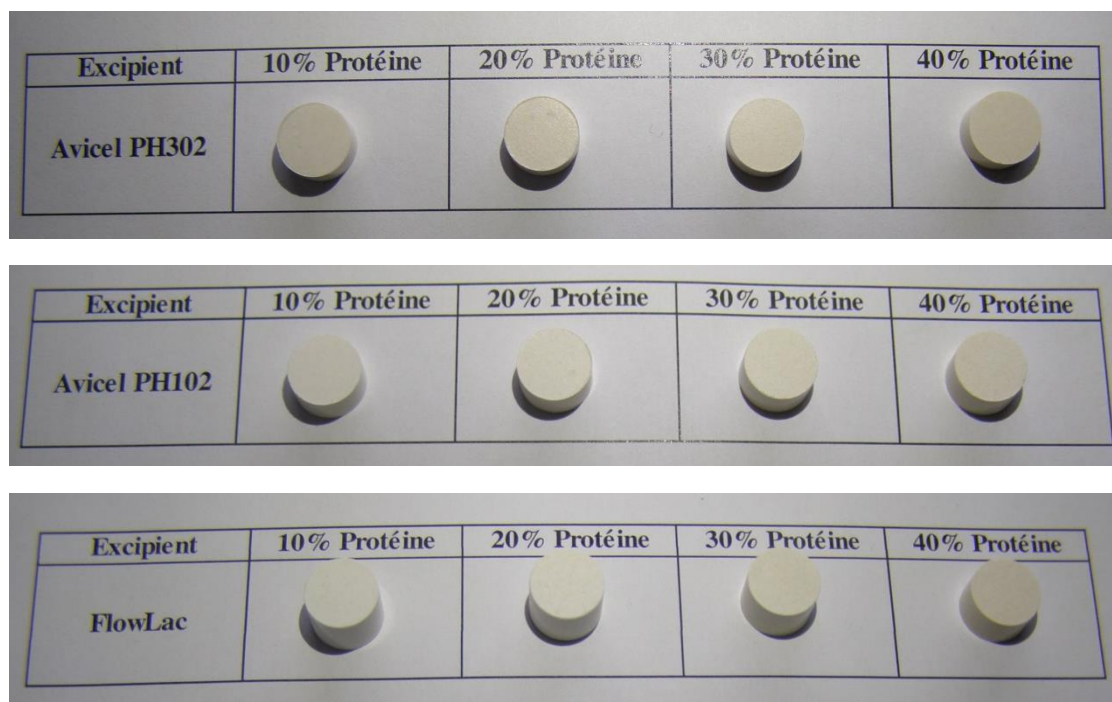


Figure 41. Photographies des comprimés sans PA contenant différentes proportions de protéine de soja et d'excipients pour compression direct.

La machine à comprimer n'étant pas instrumentée, et les caractéristiques des mélanges de poudres étant différentes, de légères variations en masse et en épaisseur peuvent être observées entre les formulations contenant des proportions croissantes de protéines, mais elles n'excèdent pas 10%. Caillard *et al.* ont montré que la force de compression nécessaire pour obtenir des comprimés à base de β -lactoglobuline succinylée n'a pas d'influence sur les propriétés finales des comprimés (Caillard and Subirade, 2012). Au sein d'un même lot une uniformité de masse est obtenue (variations de masse des comprimés inférieure à 5%).

En ce qui concerne la résistance à la rupture, une augmentation de la quantité de SPI entraîne une diminution des valeurs de résistance à la rupture dans le cas des comprimés contenant de l'Avicel. La tendance est à l'inverse dans le cas des comprimés contenant du FlowLac, à l'exception du FlowLac_20%_SPI. Pour les trois types de diluant, les proportions extrêmes de 10 et 40% de SPI présentent des résistances à la rupture significativement différentes. Les résistances à la rupture les plus importantes sont observées pour les comprimés d'Avicel contenant une proportion minimale de SPI (10%), et les comprimés de Flowlac contenant une proportion maximale de SPI (40%).

En ce qui concerne les essais de friabilité, ils sont corrects quelle que soit la formulation considérée (le pourcentage de friabilité, qui représente la perte en masse des comprimés après l'essai, doit être inférieur à 1% selon la Ph. Eur. 9.5) sauf pour le FlowLac_20%_SPI. Ce résultat est cohérent avec la résistance à la rupture plus faible constatée pour cette formulation.

En dehors de cette formulation qui sera écartée de l'étude, **l'ensemble des formulations de comprimés présente donc des propriétés de dureté et de friabilité correctes.**

Dans la mesure où nous souhaitons tester la pH-sensibilité de nos formulations, la désagrégation des comprimés à pH acide constitue un paramètre déterminant du screening des formulations. Ces essais ont été réalisés dans les conditions décrites dans la Pharmacopée Européenne pour les comprimés gastrorésistants, qui préconisent que ce type de comprimés résiste au moins 1 heure à pH acide.

Globalement, l'effet de l'introduction de protéine de soja sur la pH-résistance des formulations est notable, et d'autant plus important que la proportion de protéine de soja est importante. Cependant, sa présence n'est pas toujours suffisante pour que les formulations répondent aux conditions de l'essai de désagrégation modifié. Ainsi, les formulations contenant de l'Avicel PH102 ont été aussi écartées en raison de leur temps de désagrégation trop court, inférieur à la demi-heure, en milieu acide (pH1,2).

Les formulations de FlowLac avec 40% de SPI et Avicel PH302 avec 30% et 40% de SPI présentent des temps de désagrégation supérieurs à 60 minutes, temps pertinents et comparables à ceux demandés à une formulation gastrorésistante classique (obtenue par enrobage). Cependant, les mélanges de poudres contenant du FlowLac ont grippé le mécanisme de fonctionnement de l'appareil pendant la fabrication des comprimés, ils ont donc été écartés.

De ce fait, les formulations contenant de l'Avicel PH302 ont été choisies. Afin d'étudier l'influence de la présence de protéine de soja dans les formulations de comprimés, le taux de 40% de SPI a été retenu.

III.4 Evaluation des comprimés (formulation sélectionnée) contenant les microparticules chargées en principe actif

III.4.1 Evaluation pharmacotechnique des mélanges de poudre contenant les microparticules à base de protéine de soja, chargées en principe actif (IBU)

Le choix de la formulation du comprimé ayant été fait (Avicel PH302 + 40% SPI), des comprimés contenant des microparticules chargées en IBU (proportions protéine/IBU 90/10) ont été réalisés (Figure 42). Cette proportion protéine/IBU a été choisie afin de favoriser la mise en évidence du rôle de la protéine sur la libération de l'IBU. Les quantités de microsphères à incorporer, 14% du mélange final, ont été déterminées pour respecter les conditions sink tout au long des cinétiques quel que soit le pH étudié. La quantité des microparticules disponibles pour cet essai étant limitée, le pourcentage de protéine dans les comprimés a été complété à 40% w/w avec la protéine de soja native non atomisée.

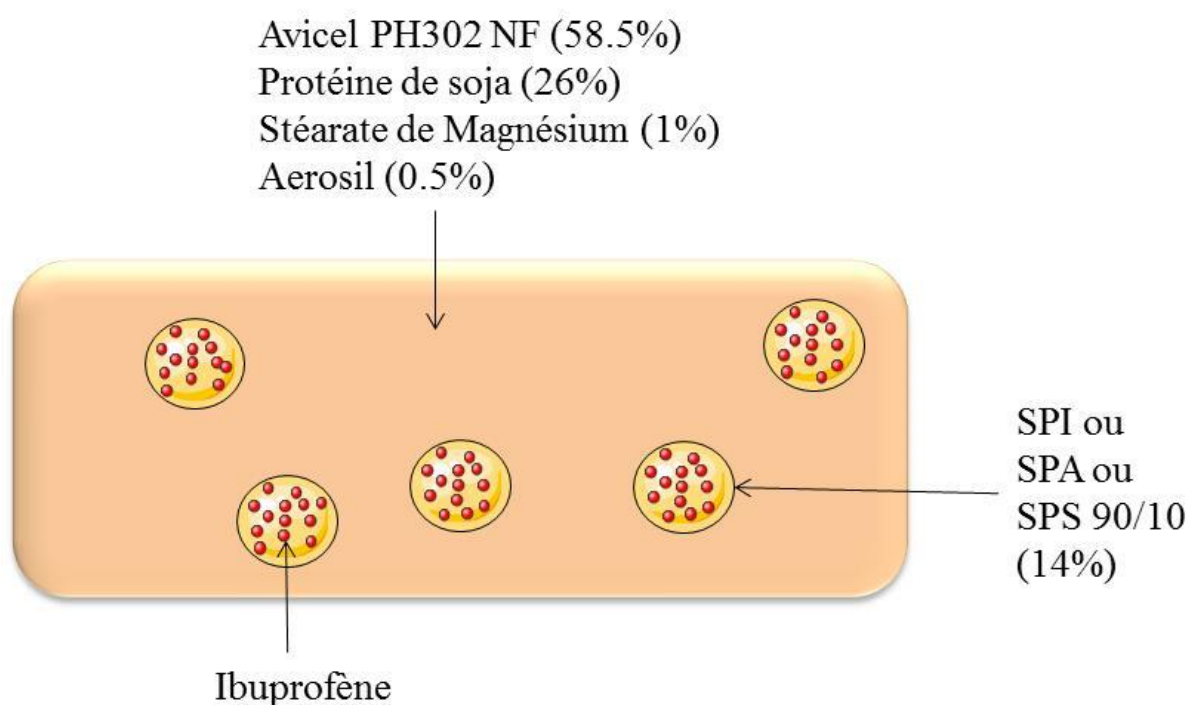


Figure 42. Formulation des comprimés contenant des microparticules avec un taux protéine/IBU de 90/10

Le Tableau 23 montre les propriétés des poudres à comprimer contenant 14% de microparticules SPI, SPA et SPS/IBU 90/10. Pour faciliter la lecture, les différentes formulations y sont désignées par un C (pour comprimé), suivi par le type de microsphères qu'elles contiennent. Le temps d'écoulement des poudres reste inférieur à 10 secondes et a été notablement diminué par la présence des microsphères atomisées qui favorisent un meilleur écoulement ($P < 0,5$). Concernant la coulabilité des poudres, l'introduction de 14% w/w de protéine de soja atomisée, modifiée ou non, n'impacte pas de manière importante l'aptitude à l'écoulement des poudres. Celle-ci reste adaptée à la compression directe, en étant passable au regard de l'indice de Hausner et de l'indice de Carr.

Tableau 23. Détermination des propriétés d'écoulement et de tassement des mélanges de poudres avec microsphères chargées en principe actif et Avicel pH 302NF

Formulation	Temps d'écoulement (s)	Aptitude du tassement (mL)	Indice de Hausner	Indice de Carr	Aptitude à l'écoulement
C_SPI 90/10	4,07±0,43 ^a	20	1,31	23,40	Passable
C_SPA 90/10	4,63±0,28 ^a	22	1,33	25,00	Passable
C_SPS 90/10	3,12±0,12 ^b	20	1,31	23,91	Passable

^{abc} Différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes $P < 0.5$ (comparaisons multiples des moyennes par la méthode Tukey-Kramer)

III.4.2 Evaluation pharmacotechnique des comprimés contenant des microparticules à base de protéine de soja, chargées en principe actif (IBU)

Des comprimés ont été obtenus par compression des mélanges de poudre sus-décrits. Ces comprimés apparaissent brillants, de surface lisse, sans différence notable par rapport aux comprimés obtenus en présence de SPI non atomisée (Figure 43).

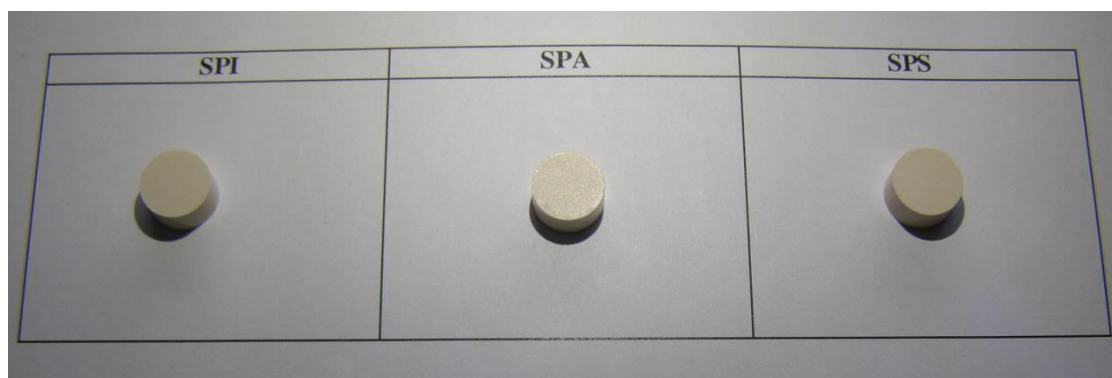


Figure 43. Photographies des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU

Le Tableau 24 et le Tableau 25 rassemblent les résultats de caractérisation des comprimés contenant de l'ibuprofène encapsulé dans des microparticules à base de protéine de soja, modifiée ou non. Leur masse est uniforme, comprise entre 677 et 704mg, avec un volume spécifique inférieur aux comprimés sans microparticules. La bonne reproductibilité des masses obtenues révèle une répartition homogène des différents excipients dans les comprimés (Bushra *et al.*, 2008).

Tableau 24. Caractérisation des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU

Formulation	Masse (g)	Épaisseur (mm)	Diamètre (mm)	Volume spécifique (Vsp)
C_SPI 90/10	0,677±0,008 ^b	5,50±0,07 ^{bc}	10,79±0,01 ^a	744,32
C_SPA 90/10	0,684±0,006 ^b	5,57±0,05 ^b	10,82±0,02 ^a	750,12
C_SPS 90/10	0,704±0,005 ^a	5,72±0,07 ^a	10,81±0,03 ^a	746,34

^{abc} Différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes $P < 0.5$ (comparaisons multiples des moyennes par la méthode Tukey-Kramer)

Leur résistance à la rupture est augmentée par rapport aux comprimés sans microparticules (effet significatif pour SPI et SPS, $P < 0,5$). Leurs temps de désagrégation présentent aussi une tendance à augmenter en présence de microsphères, et devient statistiquement supérieur ($P < 0.5$) dans le cas des comprimés contenant des microparticules de SPS ; ces comprimés se désagrègent en 248 min tandis tous les autres le sont en moins de 2h. Ce résultat est cohérent avec le fait que les comprimés contenant des microparticules en SPS présentent la résistance à la rupture la plus élevée. Néanmoins les trois formulations testées répondent à l'essai de

désagrégation selon le protocole modifié pour les formes gastrorésistantes (pas de désagrégation en moins d'une heure à pH acide). Ces trois formulations ont donc été gardées pour réaliser des essais de dissolution de l'IBU à partir des comprimés.

Tableau 25. Caractérisation des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU (suite)

Formulation	Résistance à la rupture normalisée (N/mm ²)	Désagrégation (min)
C_SPI 90/10	5060,68±401,3 ^a	104,66±5,68 ^b
C_SPA 90/10	4450,91±454,2 ^a	97,00±31,32 ^b
C_SPS 90/10	5154,17±449,8 ^a	248,00±21,65 ^a

^{abc} Différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes P<0.5 (comparaisons multiples des moyennes par la méthode Tukey-Kramer)

III.4.3 Essais de dissolution de l'IBU à partir des comprimés à 40% de protéine de soja, contenant des microsphères de SPI, SPA ou SPS chargées en IBU

Les comprimés contenant des microparticules SPI, SPA ou SPS chargées en IBU (proportions protéine/IBU 90/10) ont été soumis à un essai de dissolution en dissolutes à palettes, dans des conditions préconisées par la Pharmacopée Européenne. Afin de mimer leur comportement après administration par VO, ces essais ont été réalisés à 37°C en conditions de dissolution séquentielle, c'est-à-dire à pH croissant: pH 1,5 pendant 1h, suivi de pH 4,5 pendant 1h, puis pH 7,2 pendant 22h, pour une durée totale des cinétiques de 24h.

A l'issue de la première heure à pH 1,5, tous les comprimés ont libéré moins de 5% de l'IBU. Les comprimés contenant de la SPI libèrent sensiblement plus d'ibuprofène (3.9%) comparativement à ceux contenant de la SPS et de la SPA, qui libèrent une quantité similaire d'IBU (2.5-2.8%) (Figure 44).

Ensuite, à pH 4,5 (Figure 45), la quantité d'actif libéré reste faible. On observe un comportement similaire : les comprimés de SPI libèrent sensiblement plus d'ibuprofène (5 %) que les autres formulations contenant des protéines modifiées, qui libèrent autour de 4% du PA après 2h.

A pH 7,2 (Figure 46) la libération augmente considérablement pour atteindre être quasi-totale à 24h (Pourcentages libérés d'environ 94 %, 96% et 83% pour les formulations SPI, SPA et SPS, respectivement). Elle est progressive, SPI et SPA libèrent 50% du PA à 7h, alors qu'à 8H la SPS n'en est qu'à 45% d'IBU libéré.

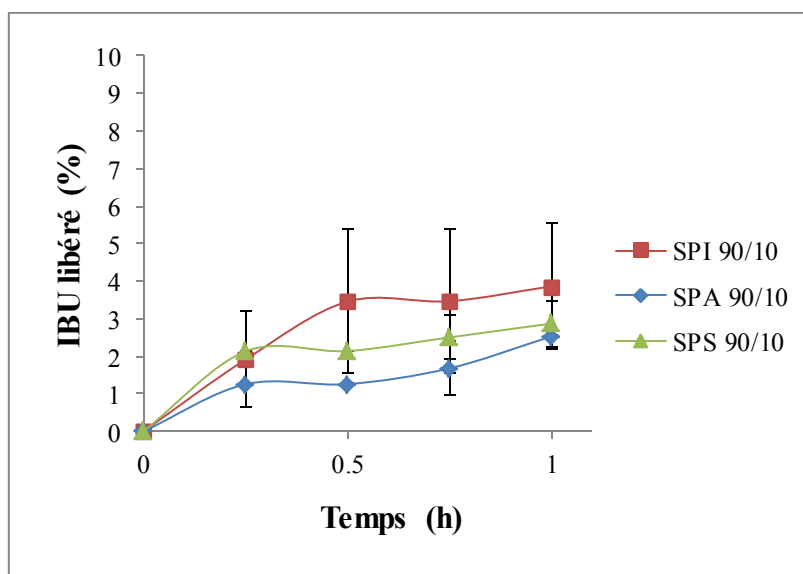


Figure 44. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe, partie effectuée à pH 1,5

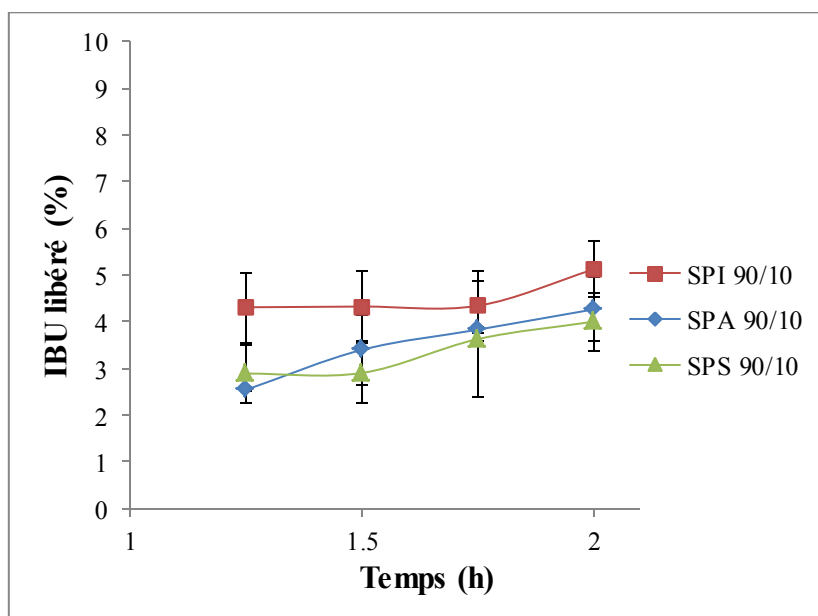


Figure 45. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe, partie effectuée à pH 4,5

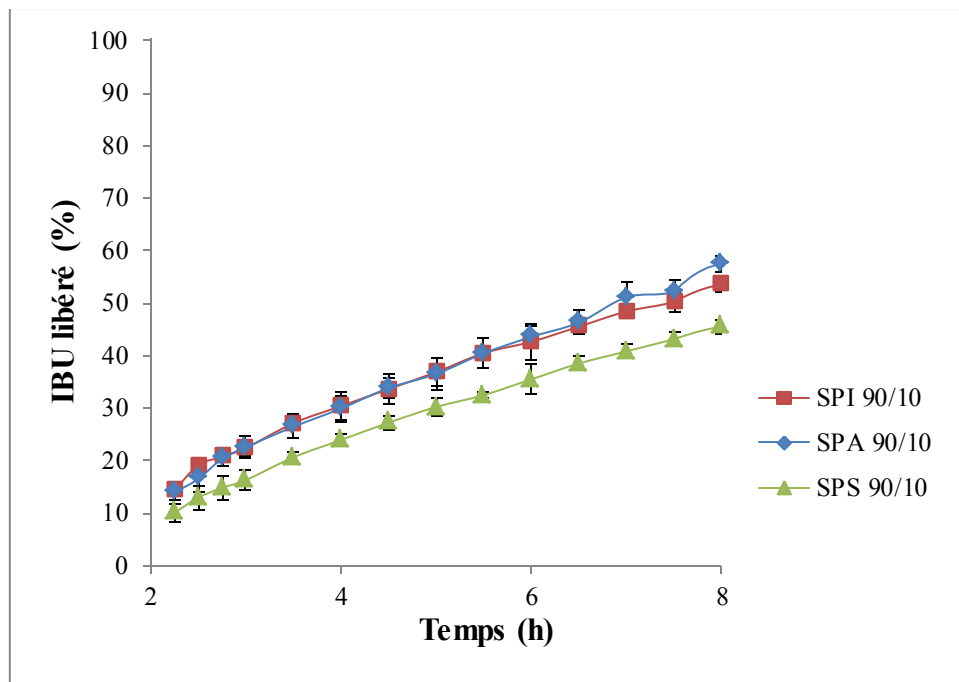


Figure 46. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe, partie effectuée à pH 7,2

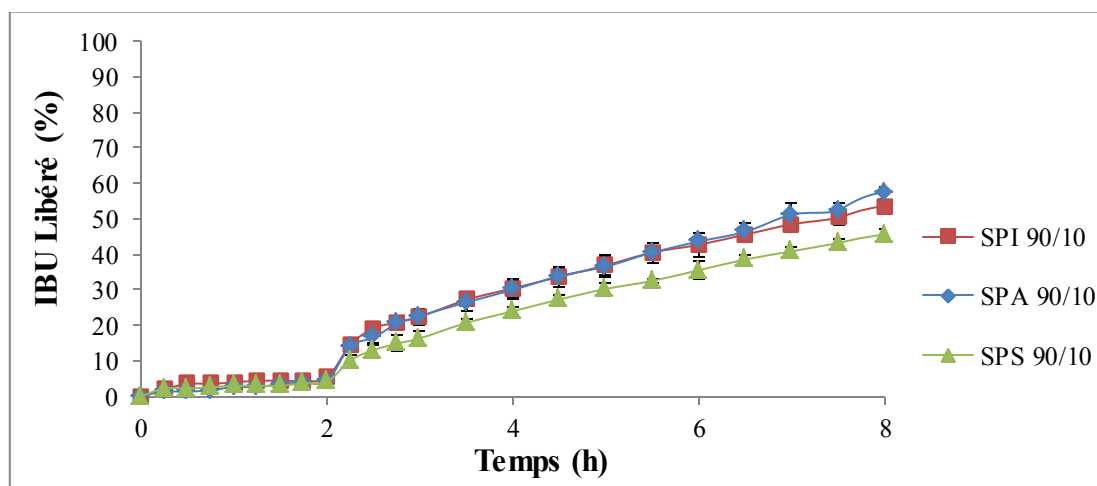


Figure 47. Libération de l'ibuprofène à partir des comprimés MUPS obtenus par compression directe en fonction de la variation séquentielle de pH

L'analyse statistique des résultats révèle une différence entre les cinétiques obtenues à partir des comprimés contenant des microsphères de SPS et les autres formulations testées ($f1 > 15$).

Les résultats obtenus résultent de l'influence de la présence de protéine de soja dans les formulations, qui se traduit par une libération ralentie à pH 1,5 et pH 4,5, proche du point

isoélectrique de la protéine. En effet, les comprimés d'IBU contenant de la cellulose microcristalline libèrent la totalité du PA en environ 60 minutes (Chandira *et al.*, 2012), sans sensibilité particulière aux variations de pH. Ces résultats sont en lien avec ce qui avait déjà été observé dans le cas des microsphères, mais relèvent d'un mécanisme de libération de l'IBU complexifié par la mise en forme comprimé et la présence d'autres excipients dans la formulation.

Quelle que soit la formulation de comprimé testée, la quantité de PA libéré est inférieure à 10% à pH 1,5, ce qui permet de qualifier toutes ces formulations de gastrorésistantes selon la Pharmacopée. A pH 4,5 la libération d'IBU reste faible, et c'est à pH 7,2 que la majeure partie de l'IBU est libéré, de manière prolongée sur environ 24h.

Un mécanisme de libération de l'IBU peut être proposé par analogie avec celui que nous avons proposé dans le cas des microsphères en protéines de soja et celui proposé par d'autres auteurs dans le cas de comprimés en protéines de soja (Caillard *et al.*, 2009).

Le ralentissement des cinétiques à pH 1,5 et 4,5 est clairement lié à la faible solubilité et la proximité du point isoélectrique de la protéine de soja, modifiée ou non. A ces pH les protéines ont tendance à interagir les unes avec les autres, aboutissant à une structure compacte induisant une libération par diffusion du PA fortement ralentie (Gunasekaran *et al.*, 2007). Ce phénomène s'exprime avec une plus grande ampleur dans le cas de formes massives comme les comprimés. Les comprimés contenant des protéines végétales (Caillard *et al.*, 2009, Maltais *et al.*, 2010) ou animales (Caillard *et al.*, 2012, Poulin *et al.*, 2011, Caillard *et al.*, 2011, Hsein *et al.*, 2017b) se comportent comme des éponges absorbant l'eau ; une couche de gel se forme à la surface des comprimés, qui ralentit l'hydratation de leur cœur. Dans cette configuration l'IBU se dissout d'abord dans cette couche de gel, puis est libéré par diffusion. A pH 1,5 et 4,5, en l'absence de pepsine, l'érosion de ce gel est négligeable (Caillard *et al.*, 2009) et n'intervient vraisemblablement pas dans le mécanisme de libération du PA. La formation et l'épaisseur de cette couche hydratée autour du comprimé est influencée par la densité de charge de la protéine, et peut donc varier si cette dernière est modifiée chimiquement. Ce phénomène a été décrit pour des protéines succinylées (Poulin *et al.*, 2011, Caillard *et al.*, 2009, Caillard *et al.*, 2011), et on peut supposer qu'il pourrait être similaire dans le cas des protéines acylées. Malheureusement dans notre cas ces effets n'ont pu être observés, probablement masqués par la présence de SPI non atomisée dans les

formulations. Les cinétiques obtenues à pH acides sont toutes très proches, néanmoins quelques différences ténues sont observables entre comprimés avec SPI, SPA et SPS, qui pourraient être liées aux différences de composition chimique entre les microsphères. La forte diminution des quantités d'IBU libéré à pH acide, comparativement à ce qui avait été observé pour la forme microsphère, est à imputer à la proportion protéine/IBU (augmentée par la présence de protéine de soja non atomisée), à la formulation (présence de cellulose comme diluant) et la géométrie (surface de contact, porosité) des comprimés, et à l'absence de pepsine (Caillard *et al.*, 2009).

A pH 7,2 la protéine de soja, modifiée chimiquement ou non, devient soluble. En effet, au-dessus de leur point isoélectrique les fonctions acides des protéines s'ionisent, il y a répulsion ionique entre les chaînes protéiques et augmentation de leur affinité pour le solvant. Ceci induit un gonflement et une érosion des comprimés qui en contiennent, responsables de la libération rapide du PA (Caillard *et al.*, 2009, Caillard and Subirade, 2012). Dans notre cas la libération de l'IBU s'accélère effectivement notablement à pH 7,2 mais elle est prolongée sur environ 24 heures, ce qui peut sembler étonnant au regard des cinétiques obtenues à partir des microsphères de protéine de soja seules, qui étaient rapides à pH 6,8. Ceci peut s'expliquer par la mise en forme et la présence de cellulose (insoluble) dans la formulation. Sa présence ralentit certainement le gonflement et/ou l'érosion de la couche de protéine gélifiée. Les comprimés obtenus présentent une résistance à la rupture importante, liée à la présence d'Avicel (Heiner and Teleman, 1997). Ils sont denses et induisent un temps de libération de l'IBU plus long puisque ce dernier doit, une fois libéré des microsphères, diffuser dans la structure du comprimé qui ne se délite que lentement, comme l'ont montré les essais de désagrégation.

Les cinétiques obtenues à pH 7,2 sont proches, néanmoins la formulation contenant des microsphères en SPS libère l'IBU de manière significativement plus lente. Bien que les microsphères de protéines succinylées ne représentent que 14% de la formulation, leur présence semble avoir un impact à la fois sur les propriétés des comprimés et leur capacité de libération de l'IBU. Mais l'effet observé est l'inverse de celui attendu : la protéine succinylée étant plus soluble à pH neutre que la protéine native, une libération plus rapide du PA était attendue, comme Caillard *et al.* l'ont observé avec la riboflavine et la rifampicine (Caillard *et al.*, 2009). Plusieurs hypothèses peuvent être émises : (i) le changement de conformation de la protéine de soja, induit par la succinylation, peut être à l'origine d'interactions de type

hydrophobe avec l'IBU et en ralentir la libération ; (ii) dans notre cas les comprimés ne sont pas constitués de protéine uniquement, et l'actif est encapsulé, ce qui impacte nécessairement le mécanisme de libération du PA et le ralentit ; (iii) les comprimés contenant des microsphères de SPS présentent des propriétés pharmacotechniques significativement différentes des deux autres formulations testées. Or une résistance à la rupture et un temps de désagrégation supérieurs sont réputés ralentir la libération de PA à partir des comprimés (Hassan, 1997). Ces points seraient à élucider et font partie des perspectives ouvertes par ce premier essai de faisabilité. Néanmoins, les résultats de cette étude exploratoire montrent qu'il est possible d'obtenir des formes gastrorésistantes adaptées à un PA BCS de classe II à partir de protéines de soja, et que des modifications chimiques comme la succinylation peuvent permettre d'en moduler la libération.

III.5 Conclusion préliminaire

Même s'il ne s'agit que d'une étude préliminaire, **les résultats obtenus démontrent l'intérêt de la protéine de soja, modifiée ou non, comme excipient pour la formulation de comprimés à libération retardée, voire même prolongée.**

Même si la poudre de protéine de soja possède de piètres propriétés pour la compression, nous avons montré qu'elle peut être incorporée à hauteur de 40% w/w dans des mélanges pour compression directe et permettre d'obtenir des poudres dont l'aptitude à l'écoulement est acceptable pour la réalisation de comprimés. Les comprimés obtenus sont lisses et brillants, non friables. La proportion de protéine de soja dans la formulation influence de manière significative la résistance à la rupture des comprimés et leur désagrégation, et peut permettre l'obtention de comprimés dont la résistance à pH acide peut être comparable à celles de comprimés gastrorésistants obtenus par pelliculage.

Les microsphères à base de protéines de soja native, acylée ou succinylée ont été incorporées dans des comprimés à hauteur de 14% w/w, mais il aurait très certainement été possible d'aller bien au-delà. Leur incorporation améliore le temps d'écoulement des poudres et démontre qu'il serait intéressant de tester les propriétés à la compression de la protéine de soja, modifiée ou non, et atomisée. La présence de microsphères de protéine de soja, et plus particulièrement de protéine de soja succinylée, impacte de manière significative la résistance à la rupture et le temps de désagrégation des comprimés.

Enfin, les comprimés contenant des microsphères de SPI, SPA et SPS chargées en IBU ont été testés en termes de capacités de libération d'actif. Les formulations obtenues sont gastrorésistantes et permettent d'obtenir une cinétique de libération retardée et contrôlée du principe actif. Peu de différences ont pu être mises en évidence entre les différentes formulations, néanmoins nos premiers résultats montrent que la présence de microsphères de protéine de soja succinylée peut permettre d'obtenir une libération encore plus prolongée à pH neutre que les formulations contenant des microsphères de SPI et SPA.

Il ne s'agit là que d'une première étude exploratoire et de nombreux points mériteraient d'être approfondis ou améliorés dans l'approche expérimentale :

- La trop faible quantité de microsphères de protéine de soja modifiée chimiquement et atomisée ne nous a pas permis de faire des formulations ne contenant qu'un seul type de protéine. La présence de protéine de soja non modifiée et non atomisée a empêché la mise en évidence claire du rôle potentiel joué par les modifications chimiques des protéines. Il serait donc intéressant d'envisager une étude de plus grande envergure, dans laquelle l'impact de l'atomisation des protéines, et celui de leurs modifications chimiques pourraient être étudiés. Ceci permettrait d'ouvrir plusieurs champs exploratoires. En effet, l'atomisation est une technique largement utilisée pour modifier la fonctionnalité d'excipients pharmaceutiques et mieux maîtriser leur propriétés. A notre connaissance, l'impact de cette technique sur la comprimabilité de protéines végétales n'a encore jamais été étudié. De même, l'intérêt de l'acylation de la protéine de soja en encapsulation a encore peu été étudié, et pas du tout dans le domaine de mise au point de formes comprimés.
- Des expérimentations complémentaires seraient à envisager pour élucider plus clairement le mécanisme de libération d'un PA à partir d'un comprimé contenant des microparticules à base de protéine de soja :
 - Ainsi, réaliser des cinétiques de libération à chaque pH, sans et en présence d'enzymes (pepsine et pancréatine) permettraient de mettre en évidence le rôle de l'érosion sur les différentes formulations et de modéliser les cinétiques. Certaines études ont montré l'intérêt de ces comparaisons (Maltais *et al.*, 2010), d'autant plus pertinentes que les modifications chimiques des protéines, lorsqu'elles ont pour conséquence de changer leur conformation, peuvent modifier l'action enzymatique (Caillard *et al.*, 2009, Caillard and Subirade, 2012);
 - L'évaluation cinétique du gonflement et de l'érosion des comprimés, réalisée en parallèle des essais de dissolution, permettrait d'obtenir des compléments d'information sur le comportement des comprimés et de visualiser la couche hydratée en surface et son aspect en fonction du pH (Caillard *et al.*, 2011, Poulin *et al.*, 2011);
 - L'étude de l'effet des modifications chimiques sur la structure des protéines de soja, qui pourrait être menées par FTIR ou FT-Raman, permettrait de mettre en évidence les changements de conformation de la protéine de soja modifiée chimiquement, comme cela a pu être fait sur la β -lactoglobuline (Caillard and

Subirade, 2012), et ses interactions potentielles avec le principe actif, d'autres éléments de la formulation, et les enzymes digestives ;

- La comparaison de plusieurs principes actifs modèles, de différente nature en termes d'hydrophilie/hydrophobie ou de charge, permettrait d'approfondir les aspects concernant les possibilités d'interaction entre protéine de soja, modifiée ou non, et principes actifs.

Néanmoins, ces premiers résultats sont très encourageants car ils permettent l'établissement de la preuve de concept de l'intérêt des protéines de soja, modifiées ou non, en tant qu'excipients pour comprimés, pour la mise au point de formes gastrorésistantes.

Quelques publications font état de l'intérêt de la succinylation de protéines pour la mise au point de formulations de comprimés gastrorésistants (Caillard *et al.*, 2009, Caillard *et al.*, 2011, Caillard and Subirade, 2012, Poulin *et al.*, 2011) ou pour de l'enrobage entérique de gélules (Caillard *et al.*, 2016). Mais jusqu'à présent ce sont surtout les protéines animales qui ont été décrites pour ces applications (Caillard *et al.*, 2011, Caillard *et al.*, 2012, Poulin *et al.*, 2011, Caillard *et al.*, 2016), les protéines de soja apparaissant comme moins performantes pour la réalisation de formes comprimés (Caillard and Subirade, 2011). Ceci peut s'expliquer par le fait que dans ces travaux les protéines n'ont fait l'objet d'aucune mise en forme (comme l'atomisation) susceptible de modifier leur fonctionnalité et ont été directement comprimées avec une presse. Si cette technique est certes plus simple pour voir l'effet des protéines sur une libération d'actif, elle n'est pas révélatrice des potentialités des protéines de soja en tant qu'excipient pour la compression. Ainsi la possibilité d'obtention de formes à libération prolongée à partir de protéines de soja n'a jamais été explorée, alors que nos résultats montrent que ce pourrait constituer une voie de recherche à développer. De même les potentialités des protéines de soja acylées pour applications pharmaceutiques n'ont jamais été explorées. Ces premiers résultats ouvrent donc un certain nombre de pistes pour le développement d'applications pharmaceutiques pour les protéines de soja, modifiées ou non.

Si l'intérêt des protéines succinylées pour l'élaboration de comprimés ou d'enrobages gastrorésistants pour des gélules ou des comprimés est déjà décrit, le concept proposé ici est plus novateur car il associe l'encapsulation et la compression directe, deux procédés rapides et peu énergivores, pour la réalisation de formes gastrorésistantes. Par rapport aux formes gastrorésistantes traditionnelles, qui nécessitent une étape de pelliculage, le procédé proposé

est composé de moins d'étapes, n'utilise pas de solvants organiques et garantit une plus grande sécurité d'emploi pour les patients puisque l'absence de pelliculage entérique supprime le risque lié à un film cassant ou fendu qui ne jouerait pas son rôle de protection du PA de l'acidité gastrique et/ou des muqueuses du tractus gastrointestinal.

Ces travaux permettent d'identifier les protéines végétales comme permettant la mise au point de formes gastrorésistantes innovantes, alternatives « vertes » de par leurs procédés d'obtention et leur composition, aux formes enrobées traditionnellement proposées sur le marché.

Chapitre IV. Matériels et Méthodes

IV.1 Matériels et Méthodes

IV.1.1 Matériels

IV.1.1.1 Matière enrobante

Extrait protéique de soja concentré à 93% produit par Solae Belgium NV (Ieper, Belgique). Cet extrait est une poudre inodore de couleur blanc jaunâtre et de qualité alimentaire.

IV.1.1.2 Principe actif

Ibuprofène, nom UICPA: acide(RS)-2-(4-(2-méthylpropyl)phényl)propanoïque, commercialisé par BASF Corporation, (Texas, Etas Unis), poudre cristalline, grade pharmaceutique.

IV.1.1.3 Solvants et réactifs

L'eau déminéralisée est utilisée pour la préparation de toutes les solutions protéiques. Les produits suivants ont été achetés chez Sigma Aldrich, l'acide chlorhydrique (37%), l'acide sulfurique (95%), l'hydroxyde de sodium, le diiode, le dodécyl-sulfate de sodium, le tétraborate de sodium, l'orthophtaldialdéhyde, le DTT 1,4-Dithiothreitol, la L-leucine (99%), le chlorure de dodécanoyle, l'anhydride succinique, l'acétonitrile (grade HPLC), le cyclohexane et la pepsine de muqueuse gastrique porcine (testée selon Ph.Eur, ≥ 250 unités/mg).

Les excipients pour compression Avicel PH-102 SCG (cellulose microcristalline, FMC Europe NV, Bruxelles, Belgique), Avicel PH-302 NF (cellulose microcristalline, FMC International, Cork, Irlande), FlowLac 90 (Lactose monohydraté, Ph. Eur./USP-NF/JP, MEGGLE, Wasserburg, Allemagne), Aerosil R972 et stéarate de magnésium sont tous de grade pharmaceutique. Pour la réalisation des tampons, ont été utilisés en outre le Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (ACROS Organics), l'acétate de sodium anhydre (Sigma Aldrich), le chlorure de sodium (Fisher chemical).

IV.1.2 Méthodes

IV.1.2.1 Caractérisation et analyse de l'extrait protéique de soja

IV.1.2.1.1 Teneur en différents composants

Toutes les analyses de la composition de l'extrait protéique sont réalisées en triplicat.

Teneur en protéines

La teneur en protéines de l'extrait est déterminée par la détermination du taux d'azote par la méthode de KJELDAHL (Yew *et al.*, 2011) (Annexe I).

Taux d'humidité

La teneur en humidité de l'extrait protéique est déduite de la mesure du taux de matière sèche et correspond à perte de masse d'un échantillon (masse initiale : 1 à 2g) après chauffage dans une étuve Memmert (Schwabach, Allemagne) à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à poids constant (NF-V-ISO03-921).

$$H (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

avec H – teneur en humidité, % ;

m_0 – tare du creuset (g)

m_1 – masse du creuset et d'échantillon avant chauffage (g)

m_2 – masse du creuset et d'échantillon après chauffage (g)

Teneur en matières minérales.

La teneur en matières minérales de l'extrait protéique est déterminée par la mesure de la différence de masse de l'échantillon après calcination au four (Nabertherm, Allemagne) à 550°C pendant 24 heures. Cette valeur est calculée par la relation suivante :

$$MM (\%) = \frac{m_{\text{cendre}}}{m_{\text{prot}}} \times 100$$

avec MM – teneur en matières minérales, % ;

m_{cendre} – masse d'échantillon après calcination au four (g)

m_{prot} – masse d'échantillon avant calcination au four (g)

Teneur en lipides

La teneur en lipides est déterminée en réalisant une extraction au cyclohexane à l'aide d'un appareil de Soxhlet dans lequel sont placés 3g d'extrait protéique de soja au sein d'une cartouche en cellulose. 10mL de cyclohexane ainsi que quelques pierres ponce sont introduits dans le ballon préalablement taré. Après chauffage à reflux pendant 7 heures, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le ballon est placé à l'étuve à 50°C pendant 24 heures. La teneur en lipides totaux est déterminée par la relation suivante :

$$L (\%) = \frac{m_{b1} - m_{b0}}{m_{\text{prot}}} \times 100$$

avec L – teneur en lipides (%)

m_{b0} – masse du ballon vide contenant quelques pierres ponce (g)

m_{b1} – masse du ballon contenant les lipides et quelques pierres ponce (g)

m_{prot} – masse d'extrait protéique introduite dans l'appareil (g)

Polysaccharides

La quantité de polysaccharides ou de sucres totaux dans l'extrait protéique est calculée par différence avec les teneurs en protéines, humidité, lipides et matières minérales.

IV.1.2.1.2 Evaluation de la solubilité des extraits protéiques en fonction du pH par la méthode Kjeldahl

Des solutions aqueuses à partir des extraits protéiques de soja, natifs, acylés et succinylés sont préparées à différents pH (1 – 12) afin de tracer les courbes de solubilité. La concentration des solutions protéiques de soja est de 3% w/w. Le pH de chaque solution protéique est ajusté à l'aide des solutions de NaOH 4M et de HCl 4M. La solution d'un volume final de 100mL est soumise à une agitation magnétique de 500tr/min à 36°C durant une heure. La valeur du pH

est mesurée après agitation. Les phases soluble et insoluble sont séparées par centrifugation à 10000tr/min, à 20°C, pendant 15min à l'aide d'un appareil 6-16K Sigma Centrifuge (Osteode, Germany). La détermination du taux de protéine solubilisée dans le surnageant est réalisée par la méthode de Kjeldahl (Annexe I). L'analyse est effectuée en duplicata. La solubilité pour chaque valeur de pH est exprimée de la façon suivante :

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{\text{Teneur en protéines dans le surnageant}}{\text{Teneur en protéines dans la solution de départ}} \times 100$$

IV.1.2.1.3 Analyse de la composition en acides aminés

L'analyse de la composition en acides aminés de la protéine de soja est effectuée après une hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique.

0.1g de protéine de soja est dissous dans 10mL d'une solution d'acide chlorhydrique 5.37N, et placé dans un tube en verre de 20mL. Afin que la réaction se déroule en atmosphère inerte, l'oxygène présent dans le tube est éliminé par un bullage sous azote pendant 2min. Ensuite, le tube est scellé et chauffé à 105°C pendant 24 heures. L'hydrolysate est filtré sur papier filtre et le filtrat est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est séché au dessiccateur sous vide à 40°C, pendant 48 heures. Le résidu obtenu après hydrolyse est dissous dans 3mL d'une solution tampon de citrate de sodium à pH 2.2, 0.5mL de cette solution est placé dans une fiole jaugée de 10mL complétée avec la même solution tampon. La solution est filtrée à l'aide d'un filtre en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 0.45µm. Les acides aminés des protéines de soja sont ensuite analysés en chromatographie par échange d'ions sur l'appareil Biochrom30 Amino Acid Analyser (Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France). Chaque analyse est effectuée en triplicat.

IV.1.2.2 Modifications chimiques de l'extrait protéique de soja

IV.1.2.2.1 Acylation selon la réaction de Schotten-Baumann, obtention de SPA

La réaction d'acylation est effectuée sur la protéine de soja selon le protocole décrit dans les travaux de Nesterenko (Nesterenko *et al.*, 2012). Une solution protéique dans l'eau

déminéralisée (400g) concentrée à 5% w/w est préparée dans un ballon tricol équipé d'un pH-mètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant. Le pH est ajusté à 10 par ajout d'une solution de NaOH 4N. La quantité nécessaire de chlorure de dodécanoyle (C₁₂) est ajoutée goutte à goutte à la solution protéique. Le rapport molaire NH₂ de protéines/C₁₂ utilisé est de 1/0.2, 1/0.5, 1/1 et 1/2. La réaction d'acylation se déroule sous agitation mécanique à 500 tr/min pendant 30min à température ambiante et ensuite pendant 3 heures à 50°C. La valeur du pH est maintenue à 10 tout le long de la réaction par ajout d'une solution de NaOH 4N. En fin de réaction, le pH est ramené à 7 par ajout d'une solution d'HCl 4N puis la solution protéique est lyophilisée. Le taux d'acylation (TA) est déterminé par dosage des fonctions amines par la méthode OPA (Annexe 2).

$$TA (\%) = \frac{(N_0 - N_a)}{N_0} \times 100$$

avec N_0 – nombre de mmol de fonctions amines de protéines natives

N_a – nombre de mmol de fonctions amines de protéines après acylation

IV.1.2.2.2 Succinylation, obtention de SPIS

Le protocole utilisé pour la succinylation de la protéine de soja est adapté de celui décrit pour la succinylation de la protéine de lait dans les travaux de Shilpashree (Shilpashree *et al.*, 2015a). 200g d'une solution protéique à 5% w/w dans de l'eau déminéralisée sont préparés dans un ballon tricol équipé d'un agitateur mécanique et d'un pH-mètre. Le pH est ajusté entre 8 et 8.5 avec une solution de soude 2M. Sous agitation (500 tr/min) et à température ambiante, l'anhydride succinique est ajouté en trois fractions durant 30min. Le rapport molaire NH₂ de protéines/anhydride succinique utilisé est de 1/0.5, 1/0.75, 1/1 et 1/1.5. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à 37°C, 1 heure sous agitation. Durant les 1h30 de réaction, la valeur du pH est maintenue entre 8-8.5 par ajout d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite refroidie à température ambiante. Puis, le pH est abaissé à 3-4 par ajout d'HCl 2M entraînant la précipitation des protéines. Le mélange réactionnel est centrifugé à 5000g, à 20°C, pendant 20min à l'aide d'un appareil 6-16K Sigma Centrifuge (Osteode, Germany). Le surnageant est éliminé et le précipité est repris par 100mL d'eau. Le pH est ajusté à 7 par ajout de NAOH 2M. Le produit de la réaction est lyophilisé (Lyophilisateur Alpha 2-4, Christ Martin).

Le taux de succinylation (TS) est déterminé par dosage des fonctions amines par la méthode OPA (Annexe 2).

$$TS (\%) = \frac{(N_0 - N_S)}{N_0} \times 100$$

avec N_0 – nombre de mmol de fonctions amines de protéines natives

N_S – nombre de mmol de fonctions amines de protéines après succinylation

IV.1.2.3 Procédé de microencapsulation

IV.1.2.3.1 Préparation des solutions protéiques

Les solutions de protéine de soja (SPI, SPA, SPIS) sont préparées dans l'eau à une concentration de 8%, w/w. Le pH de la solution est ajusté à 8 par ajout d'une solution de NaOH 2M. Les solutions sont agitées à l'aide d'un agitateur mécanique (1000 tr/min) à température ambiante pendant 1 heure.

IV.1.2.3.2 Préparation des solutions avec l'ibuprofène

La préparation est réalisée à température ambiante. 20g d'extrait protéique (SPI, SPA, SPIS) sont solubilisés dans 180g d'eau déminéralisée à pH 8 selon le protocole décrit précédemment. A la fin du temps d'agitation de la solution protéique, la quantité nécessaire d'IBU est ajoutée en quatre ajouts sous agitation mécanique. Les rapports protéine/IBU (matière enrobante/matière active) utilisés sont 60/40, 80/20 et 90/10 w/w. Le pH est maintenu à 8 tout au long de l'addition par ajout d'une solution de NaOH 2M. La masse de la solution est ajustée à 250g (concentration 8% w/w en extrait protéique) par ajout d'eau déminéralisée. La solution est maintenue sous agitation mécanique durant 30min, elle est ensuite homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur sous haute pression APV Systems (Albertslund, Danemark) à 50MPa avec 2 passages.

IV.1.2.3.3 Atomisation, préparation des microparticules

Les solutions de protéine (SPI, SPA, SPIS), avec ou sans IBU à différentes concentrations, décrites précédemment sont séchées par atomisation afin d'obtenir des microparticules. 200g de formulation liquide (pesés précisément) sont utilisés pour chaque expérience. L'appareil utilisé pour l'atomisation est le Mini Spray Dryer B- 290 de Büchi (Flawil, Suisse).

Les conditions d'atomisation sont les suivantes : la température d'entrée (T_{inlet}) est de $120\pm 4^{\circ}\text{C}$, la température de sortie (T_{outlet}) de $74\pm 4^{\circ}\text{C}$, le débit de la pompe de 20% (330mL/h), le débit d'air de 470L/h, la pression d'air de 0.635MPa. Les microparticules sont récupérées dans le récipient de collection et dans le cyclone, puis stockées dans un flacon fermé à 4°C et à l'abri de la lumière. Le rendement du procédé d'atomisation est calculé par la relation suivante :

$$\text{RA (\%)} = \frac{m_{m.s.}}{m_{initiale}} \times 100$$

avec RA – rendement du procédé d'atomisation, (%)

$m_{m.s.}$ – masse de matière sèche des microparticules collectées après l'atomisation, (g)

$m_{initiale}$ – masse de matière sèche dans la préparation liquide initiale atomisée (matière enrobante et matière active), (g)

IV.1.2.4 Détermination de l'efficacité de microencapsulation

Un échantillon de 10mg de microparticules est introduit dans une fiole de 50ml avec un mélange acétonitrile/tampon acétate de sodium 0.1M (pH 7) 60:40 (w/w). La solution est agitée pendant 20 min puis filtré à l'aide d'un filtre à seringue de membrane acétate de cellulose (CA) Sigma Aldrich à $0.45\mu\text{m}$. L'IBU solubilisé dans le filtrat est dosé par HPLC (Annexe IV). Chaque échantillon est analysé en triplicat.

La quantité d'ibuprofène dans les microparticules est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage.

L'efficacité de microencapsulation (EME) et le taux de microencapsulation (TME) sont calculés comme suit :

$$\text{EME (\%)} = \frac{\text{IBU}_{\text{exp}}}{\text{IBU}_{\text{théo}}} \times 100$$

$$\text{TME (\%)} = \frac{\text{IBU}_{\text{encapsulé}} \text{ (mg)}}{\text{masse de microparticule (mg)}}$$

avec IBU_{exp} - Ibuprofène mesurée par HPLC (mg/mL)

$\text{IBU}_{\text{théo}}$ – Ibuprofène théorique (mg/mL)

IV.1.2.5 Caractérisation physico-chimiques des extraits protéiques, des solutions et des microparticules

IV.1.2.5.1 Granulométrie par voie sèche

Le diamètre moyen des microparticules obtenues par atomisation est déterminé à l'aide d'un équipement Scirocco 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). Le fonctionnement de cet appareil est basé sur le principe de diffraction multi-angulaire de la lumière rouge du laser à 63nm. Pendant la mesure de la diffraction laser, les particules passent à travers un faisceau laser focalisé. Ces particules diffusent la lumière à un angle inversement proportionnel à leur taille. L'intensité angulaire de la lumière dispersée est alors mesurée par une série de détecteurs photosensibles. La gamme de mesure de l'appareil est comprise entre 0.2 μm et 2000 μm . 200-300mg de microparticules sont introduites dans le récipient de l'appareil et la mesure est effectuée dans les conditions suivantes : l'indice de réfraction utilisé est de 1.52, la pression de l'air de 0.4MPa, le taux de vibration de 70% et la durée de la mesure de 10s (10 000 balayages). A partir de la distribution de taille, le diamètre moyen en volume $D_{4,3}$ des microparticules est déterminé par le logiciel (Malvern).

IV.1.2.5.2 Morphologie par Microscopie électronique à balayage

La morphologie des microparticules est observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO 435 VP de LEO Electron (Cambridge, Royaume-Uni), manipulé à 10kV. Les particules à analyser sont disposées sur un ruban adhésif double-face puis métallisées avec de

l'argent par pulvérisation. Afin de visualiser leur structure interne, les microparticules sont préalablement congelées dans l'azote liquide et broyées à l'aide d'un mortier.

IV.1.2.5.3 Analyse thermogravimétrique

Les analyses thermiques d'IBU, SPI (pure, 90/10, 60/40 et 80/20), SPA (pure, 90/10, 60/40 et 80/20) et SPIS (pure, 90/10, 60/40 et 80/20) ont été effectuées à l'aide d'un analyseur ATG/ETD Q600 de TA Instruments (USA). 9-10mg de l'échantillon analysé sont placés dans un creuset en platine et chauffés de la température ambiante à 600°C avec un gradient de 10°C/min sous flux d'air.

IV.1.2.5.4 Diffraction de rayons X

La cristallinité de l'ibuprofène, SPI, SPA, SPIS, des microparticules (90/10, 80/20 et 60/40) et des mélanges physiques à l'état de poudre, a été évaluée à l'aide d'un diffractomètre aux rayons X (EQUINOX 1000, France). L'analyse est effectuée à température ambiante en utilisant une cible Co à 30mA et 30kV dans la région de $5^\circ \leq 2\theta \leq 40^\circ$ avec un incrément angulaire de $0,02^\circ\text{s}^{-1}$ (Li et al., 2008a).

IV.1.2.6 Cinétiques de libération de l'ibuprofène selon la Pharmacopée Européenne

Les cinétiques de libération d'IBU pour les taux 60/40 et 90/10 de chaque protéine (SPI, SPA et SPS) sont réalisées en cellules à flux Sotax EC6 (Annexe IV) dans les conditions recommandées par la Pharmacopée Européenne 9.5 (Ph. Eur.).

Des fluides gastriques et intestinaux simulés (FGS et FIS) ont été utilisés en circuit fermé (300 ou 100 ml de milieu à pH 1,2 et pH 6,8, respectivement).

Les quantités de microparticules utilisées ont été calculées pour réaliser les essais en « conditions sink », c'est-à-dire avec une concentration maximale d'ibuprofène dans le milieu de dissolution ne dépassant pas 20 à 30% de sa solubilité dans le milieu considéré (voir Tableau 26).

Tableau 26. *Quantité des microparticules employées pour les cinétiques de libération*

Taux protéine / IBU	Masse de microparticules dans le milieu (grammes)		
	pH 1,2	pH 1,2 + pepsine	pH 6,8
90/10	0,02	0,02	0,05
60/40	0,005	0,005	0,0125

Les cellules ont été maintenues à $37\pm 1^\circ\text{C}$ sous un débit constant de 8mL/min. La libération d'IBU a été suivie par prélèvement de 1ml de milieu de dissolution à intervalles réguliers pendant 8h. Le milieu a été remplacé par du milieu frais après chaque prélèvement pour maintenir le volume constant. Les échantillons recueillis ont été analysés par HPLC (Annexe III). Toutes les cinétiques ont été réalisées en triplicat.

La quantité d'ibuprofène dans les microparticules a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage à pH 1.2 en présence de pepsine (concentration comprise entre 0.003mg/mL – 0.02mg/mL) et à pH 6.8 (la concentration était de 0.01 à 0.2mg/mL).

IV.1.2.7 Préparation des comprimés

IV.1.2.7.1 Formulation des mélanges de poudre

Pour les essais préliminaires, différents mélanges de poudres ont été testés, avec une proportion de SPI allant de 10 à 40%, selon le Tableau 27. Dans le tableau la ligne « excipient » désigne l'excipient de charge testé, à savoir l'Avicel PH 102 ou l'Avicel PH 302 (celluloses microcristallines) ou le FlowLac 90 (lactose).

Tableau 27. Formulation des comprimés contenant de la protéine de soja en proportions variables

	SPI 10%	SPI 20%	SPI 30%	SPI 40%
	Masse (g)	Masse (g)	Masse (g)	Masse (g)
SPI non atomisée	10.0	20.0	30.0	40.0
Excipient	88.5	78.5	68.5	58.5
Stéarate de magnésium	1.0	1.0	1.0	1.0
Aerosil R 972	0.5	0.5	0.5	0.5
Masse totale	100.0	100.0	100.0	100.0

Après sélection de la formulation définitive, avec de l'Avicel PH 302, différents comprimés contenant 40% de protéines végétales dont 14% de microsphères SPI, SPA et SPS/ ibuprofène (90/10) ont été préparés (Tableau 28).

Tableau 28. Formulation des comprimés avec les microparticules protéine/IBU (90/10)

	%	Masse (g)
SPI sans atomisation		13,000
	40	
Microparticules		7,000
	58,5	
Avicel pH 302NF		29,250
Stéarate de magnésium	1	0,500
	0,5	
Aerosil		0,250
Total	100	50,000

Les mélanges de poudres sont préparés au Turbula type T2C (WAB, Suisse) pendant 20min.

IV.1.2.7.2 Compression

La préparation des comprimés est réalisée par compression directe à l'aide d'une machine à comprimer alternative KORCH équipée d'une matrice cylindrique et de poinçons plans de diamètre 11mm. 100g de poudre sont introduits dans la trémie de la machine. Pour le réglage de la masse des comprimés, la position du poinçon inférieur est ajustée. La force de compression est ajustée avec le poinçon supérieur. Les comprimés sont pesés et le réglage des deux poinçons finalisé pour obtenir la masse des comprimés souhaitée (environ 0,6g).

IV.1.2.8 Contrôles pharmaco-techniques sur les mélanges de poudre

IV.1.2.8.1 Écoulement

L'essai d'écoulement a pour objectif la détermination de l'aptitude des poudres à s'écouler verticalement. L'essai est réalisé selon les conditions décrits dans la Pharmacopée Européenne 9.5 (Annexe V). L'aptitude à l'écoulement est exprimée en secondes par rapport à 100g d'échantillon et doit être inférieur ou égal à 10s.

IV.1.2.8.2 Masse volumique vrac et masse volumique après tassement

La masse volumique vrac d'une poudre est définie comme « le rapport de la masse d'un échantillon de poudre non tassée au volume qu'il occupe en comprenant la contribution des espaces interparticulaires ». L'essai est réalisé pour un échantillon de 100g selon la méthode 1 proposée par la Pharmacopée Européenne 9.5 (AnnexeVI) à l'aide d'un appareil de tassement (Pharmatest, Allemagne). La masse volumique vrac d'une poudre est déterminée par la mesure du volume occupé par une masse connue de poudre versée dans une éprouvette graduée normée.

La masse volumique après tassement est la valeur de masse volumique vrac accrue lorsque l'on provoque, par voie mécanique, le tassement de l'échantillon de poudre contenu dans un récipient.

On obtient la masse volumique après tassement en provoquant, par voie mécanique, le tassement d'un échantillon de poudre placé dans une éprouvette graduée ou un vase à peser.

Après relevé du volume initial ou de la masse initiale de la poudre, le récipient est soumis à des chocs mécaniques et des lectures de volume ou de masse sont effectuées jusqu'à obtention de résultats sensiblement constants. Les chocs mécaniques sont produits en élevant le récipient puis en le laissant retomber d'une hauteur spécifiée, sous l'effet de son propre poids.

IV.1.2.8.3 Indice de compressibilité et indice de Hausner

Les interactions interparticulaires qui affectent les propriétés de foisonnement d'une poudre conditionnent également ses propriétés d'écoulement, et on peut, en comparant les valeurs de la masse volumique avant (masse volumique vrac) et après tassement, évaluer l'importance relative de ces interactions dans une poudre donnée. Cette comparaison est souvent utilisée pour déterminer l'aptitude à l'écoulement d'une poudre (« coulabilité ») d'après les résultats de l'indice de compressibilité (aussi appelé indice de Carr) ou l'indice de Hausner.

L'indice de Carr et l'indice de Hausner mesurent tous deux l'aptitude d'une poudre à réduire de volume sous l'effet d'un tassement mécanique. Pour évaluer l'aptitude au tassement, on utilise la différence entre le volume après 10 chutes et celui après 500 chutes.

Les formules pour les calculer sont les suivantes:

Aptitude au tassement (mL) = $V_0 - V_{500}$

Indice de compressibilité :

$$100x \frac{V_0 - V_f}{V_0}$$

Indice de Hausner :

$$\frac{V_0}{V_f}$$

avec V_0 = volume apparent avant tassement,

V_f = volume final après tassement (1250 chutes)

V_{500} = volume apparent après 500 chutes

IV.1.2.9 Contrôles pharmaco-techniques sur les comprimés

IV.1.2.9.1 Dimensions

Les dimensions, hauteur et diamètre, de dix comprimés sont mesurées au pied à coulisse digital.

IV.1.2.9.2 Uniformité de masse

Pour chaque formulation dix comprimés sont pesés à l'aide d'une balance analytique Sartorius.

IV.1.2.9.3 Volume spécifique des comprimés

Le volume spécifique des comprimés (V_{sp}) a été calculé comme suit (Caillard and Subirade, 2012) :

$$V_{sp} = \frac{\pi \times h \times r^2}{w}$$

avec w = poids du comprimé(g)

h = hauteur du comprimé (mm)

r =rayon du comprimé (mm)

IV.1.2.9.4 Résistance à la rupture normalisée (RRN)

La résistance à la rupture F des comprimés a été déterminée par compression diamétrale en utilisant un appareil de test de dureté PTB 311 (Pharmatest, Allemagne), dans des conditions définies par la Pharmacopée Européenne 9.5 (AnnexeVII).

La résistance à la rupture a été normalisée par la section transversale (Caillard and Subirade, 2012) :

$$RRN = \frac{F}{d \times h}$$

avec F = résistance à la rupture (N)

d =diamètre (m)

h =hauteur de comprimé (m)

IV.1.2.9.5 Friabilité

Pour réaliser l'essai de friabilité, la Pharmacopée Européenne 9.5 (Annexe VII) recommande de prélever un nombre de comprimés entiers correspondant à une masse très proche de 6,5g. Dans le cas de comprimés de masse unitaire supérieure à 650mg, prélever 10 comprimés entiers. Les comprimés sont pesés avant et après 100 rotations sur le tambour de l'appareil de test de friabilité PTF E (Pharmatest, Allemagne). La perte en masse doit être inférieure à 1%.

IV.1.2.9.6 Désagrégation

L'objectif de cet essai est de déterminer l'aptitude des comprimés à se désagréger dans un certain temps, en milieu liquide sous certaines conditions expérimentales. Selon la Pharmacopée Européenne 9.5, «la désagrégation est complète, lorsque tout résidu, à l'exception de fragments insolubles d'enrobage pouvant subsister sur la grille de l'appareil ou adhérer à la face inférieure du disque, si l'on en a utilisé un, est constitué d'une masse molle ne comportant pas de noyau palpable». La description de l'appareillage et le mode opératoire de la Pharmacopée Européenne 9.5 est décrite dans l'Annexe IX. La réalisation de cet essai est effectuée avec un Disintegration tester Erweka ZT221 (Allemagne). Le protocole modifié, préconisé pour les comprimés gastrorésistants, a été utilisé. Dans ce cas, le temps de désagrégation des comprimés à pH acide doit être d'au moins 1 heure.

IV.1.2.9.7 Essais de dissolution

Les essais de dissolution permettent de déterminer la conformité des formes pharmaceutiques solides orales aux exigences de dissolution. Pour la réalisation de ces analyses, l'appareil à

palette utilisé est décrit en Annexe X. L'appareil utilisé est le Dissolutest AT7 Smart, Sotax (Suisse)

Dans cette partie, les essais de dissolution ont été effectués à pH croissant pour déterminer l'influence du changement du pH sur la libération du principe actif à partir des comprimés. La séquence utilisée est 1h à pH 1,5 suivie de 1h à pH 4,5 puis à pH 7,2. Les essais ont été réalisés en conditions SINK.

Une unité de prise (comprimé) exactement pesée est placée dans chaque bol. Un volume du milieu de dissolution de 1000mL a été utilisé, maintenu à $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ avec une vitesse d'agitation de 60tr/min. A intervalles réguliers (toutes les 15 puis toutes les 30min pendant 8 heures), 5mL sont prélevés et remplacés par du tampon frais au pH correspondant.

La quantité libérée d'ibuprofène a été calculée par la méthode précédemment décrite, i.e. par HPLC (Annexe III) en utilisant une droite d'étalonnage à pH 1,5, 4,5 et 7,2. Chaque mesure a été réalisée en triplicat.

IV.1.2.9.8 Facteurs de différence et de similarité f_1 et f_2

Un modèle simple pour comparer deux profils de dissolution est celui du facteur de différence (f_1) et du facteur de similarité (f_2), ces modèles sont approuvés pour la FDA, l'ICH et le Centre de Recherche et d'Évaluation des Médicaments (Center for Drug Evaluation and Research) (Costa *et al.*, 2003).

Le facteur de différence (f_1) calcule le pourcentage de différence entre deux courbes à chaque point du temps et est une mesure d'erreur relative entre les deux courbes

$$f(1) = \frac{\sum_{t=1}^n R_t - T_t}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100$$

avec n- nombre de points de prélèvements

R_t -dissolution au temps t de la formulation de référence

T_t - dissolution au temps t de la formulation de la forme à tester

Le facteur de similarité (f_2) est une transformation réciproque de la racine carrée logarithmique de la somme des erreurs au carré et est une mesure de la similitude dans le pourcentage de dissolution entre les courbes.

$$f(2) = 50 \log \left\{ \left[\left(1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right) \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Selon les auteurs Costa *et al.*, une courbe est considérée similaire quand f_1 est proche du 0 and f_2 est proche du 100. Les valeurs de f_1 sont jusqu'à 15 (0-15) et f_2 est supérieur à 50 (50-100) (Costa *et al.*, 2003).

Conclusion Générale et Perspectives

L'objectif de ce travail était d'étudier l'intérêt de la protéine de soja en tant que matériau enrobant de principes actifs pharmaceutiques destinés à la voie orale, et plus particulièrement en tant que candidat pour l'élaboration de formes gastrorésistantes. Pour cela nous avons fait le choix de moduler sa pH-sensibilité en la modifiant chimiquement, par acylation ou succinylation, et d'utiliser l'atomisation comme méthode d'encapsulation. L'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien, a été choisi comme molécule modèle du fait de sa faible solubilité (c'est un PA BCS de classe II) nécessitant une amélioration de sa biodisponibilité, et de ses effets indésirables gastriques nécessitant une mise en forme entérique. Ce travail est le fruit d'une première collaboration dans ce domaine entre le LCA et le CIRIMAT (dont sont issues V. Durrieu et S. Girod Fullana, qui ont co-dirigé ces travaux à 50% chacune) et se situe à l'interface entre la chimie des agro-ressources et la pharmacie galénique, avec pour but de valider l'intérêt des protéines végétales en tant que potentiels excipients verts pour de la formulation pharmaceutique.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de valider l'intérêt de la protéine de soja pour l'application pharmaceutique visée. Les modifications chimiques sont apparues particulièrement adaptées pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes, et ont permis de moduler les propriétés de libération d'actif de la protéine de soja, plus particulièrement à pH acide (gastrique).

Les résultats expérimentaux ont en effet permis de :

- Choisir les conditions opératoires optimales permettant d'avoir des taux de modifications chimiques élevés, à savoir :
 - o Un ratio molaire $\text{NH}_2/\text{C}_{12}$ de 1/2 pour un taux d'acylation de 41% ;
 - o Un ratio $\text{NH}_2/\text{anhydride succinique}$ de 1/1,5 pour un taux de succinylation de 93% ;

- Montrer l'impact de ces modifications chimiques sur la solubilité de la protéine de soja : l'acylation permet de diminuer la solubilité de la protéine à pH acide sans modifier son comportement à pH neutre, tandis que la succinylation diminue le point isoélectrique de la protéine, diminuant plus drastiquement sa solubilité à pH acide, et

augmente sa solubilité en pH neutre. Ces modifications chimiques impactent les interactions protéine-protéine et les interactions protéine-principe actif hydrophobe, et de ce fait permettent de moduler les propriétés enrobantes de la protéine de soja ;

- Obtenir des microparticules chargées en IBU reproductibles, de taille de l'ordre de 1 à 9 μ m dans le cas de la protéine de soja acylée SPA, et 4 à 8 μ m dans le cas de la protéine de soja succinylée SPS. Les rendements d'atomisation obtenus, allant de 70 à 87% dans le cas de la SPA, et de 72 à 79% dans le cas de la SPS, sont relativement supérieurs à ceux que l'on peut trouver dans la littérature (Effionora et al., 2016, Wang et al., 2015b) , et très encourageants en vue d'un transfert d'échelle du procédé. Trois taux d'encapsulation de l'IBU (40, 20 et 10% w/w) ont été testés pour les deux modifications chimiques et ont permis d'étudier l'influence des proportions protéine/PA sur l'efficacité d'encapsulation et la morphologie des microparticules obtenues par atomisation. Des efficacités d'encapsulation sensiblement supérieures sont été obtenues dans le cas des protéines modifiées, que ce soit par acylation ou succinylation, par rapport à la protéine non modifiée SPI. Cela est particulièrement visible pour des taux les plus élevés d'IBU, où des efficacités d'encapsulation de 94% et 91% ont été obtenues pour SPA et SPS, respectivement;
- Mettre en évidence les conséquences de cette pH-sensibilité sur le relargage de l'IBU en milieux digestifs gastrique et intestinal (FGS et FIS) simulés. Des cinétiques ralenties à pH acide, et rapides à pH neutre ont été obtenues. Ces cinétiques ont pu être contrôlées par les modifications chimiques des protéines, notamment en ce qui concerne la libération à pH acide ;
- Réaliser de premières formulations de comprimés utilisant des protéines de soja, par compression directe. Il a été possible d'incorporer dans les formulations des microsphères de protéine de soja, modifiée chimiquement ou non, et chargée en ibuprofène, et d'obtenir des cinétiques de libération d'IBU retardées et prolongées. Malgré la présence de protéine de soja non modifiée et non atomisée dans les formulations, il a été possible de mettre en évidence un effet significatif de la présence des microsphères de protéine de soja succinylée. Ces microsphères contribuent notamment à une libération prolongée de l'IBU à partir des comprimés.

Les résultats obtenus en termes de libération d'actif ont mis en lumière le rôle des interactions protéine-protéine, protéine-principe actif et protéine-enzymes, et c'est dans l'exploration multi-échelle de ces interactions et de leurs conséquences que se situent les expérimentations qui permettraient idéalement de compléter les résultats obtenus (cf. la conclusion du chapitre 3 où ces éléments sont développés).

Dans le cadre d'une application en voie orale, l'étape ultérieure de ces travaux serait de réaliser des essais en système digestif artificiel, pour reproduire des conditions plus proches de celles du tractus digestif humain, non seulement en terme de pH, mais aussi d'enzymes (type, quantité) et de péristaltisme (Wen and Park, 2011, Hsein et al., 2017b). Ces essais permettraient de se rapprocher d'une corrélation *in vitro* – *in vivo* pour valider définitivement l'intérêt des formulations mises au point dans ce travail de thèse.

Les résultats obtenus ouvrent de nombreuses voies de recherche et de développement concernant l'intérêt des protéines de soja et plus largement des protéines végétales pour des applications pharmaceutiques, notamment pour la voie orale.

Concernant l'intérêt des protéines de soja, les résultats que nous avons obtenus montrent qu'elles sont particulièrement intéressantes pour la mise en place de cinétiques de libération d'actif différées ou programmées. Il existe de nombreux polymères pour formuler ce type de microparticules, mais ce sont majoritairement des polymères synthétiques, principalement des dérivés du poly(méthylméthacrylate) (PMMA), poly(acide méthacrylique) (PMAA), du poly(acide acrylique) en mélange ou couplés à d'autres polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG). Ces polymères soit gonflent, soit se dissolvent ou encore se dégradent une fois atteint un site particulier de l'organisme. Certains polymères sont sensibles au milieu enzymatique et seront dégradés uniquement en présence d'enzymes capables de les hydrolyser. C'est le cas de certains polysaccharides (amylose, chitosane, dextrans, pectine...). (Fattal *et al.*, 2007). Les protéines végétales proposent une alternative verte aux polymères synthétiques, et présentent des propriétés complémentaires de celles des polysaccharides. Moins hydrophiles, elles peuvent être particulièrement intéressantes pour des principes actifs peu solubles dans l'eau (Renard and Reddy, 2007, Vandamme *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle les protéines animales sont les protéines les plus utilisées dans le domaine pharmaceutique. Cependant, les protéines animales présentent certains inconvénients, principalement le risque de contamination (encéphalopathie spongiforme bovine) ainsi que des restrictions d'utilisation alimentaires (régimes végétariens) et culturelles (liées à la viande de porc). Les protéines végétales peuvent se substituer à ces dernières car elles présentent l'avantage d'être peu coûteuses, de ne pas présenter de risque sanitaire et d'être accessibles en grande quantité. Le risque allergique qu'elles présentent peut être modulé par le choix de l'espèce végétale, et apparaît moindre que celui engendré par les protéines animales. Étonnamment, le nombre d'études dont elles ont fait l'objet pour des applications pharmaceutiques en voie orale est encore limité ; c'est un champ exploratoire en devenir, avec de nombreuses potentialités. Les agro-ressources représentent une source d'excipients « verts », domaine pour lequel l'industrie pharmaceutique est en forte demande, dont la fonctionnalité reste encore à optimiser. Nos résultats démontrent qu'elle peut l'être par des modifications chimiques propres, en conditions douces, et par le choix du procédé de mise en forme. L'association de ces deux éléments en fait l'originalité.

Ainsi, à la lueur de nos résultats, la mise en forme microparticulaire des protéines de soja par atomisation présente de nombreux avantages :

- elle permet d'encapsuler aisément, en une seule étape, un principe actif hydrophobe, l'IBU. Le séchage flash, de l'ordre de quelques ms, permet de respecter le PA et pourrait être adapté à d'autres principes actifs hydrophobes fragiles (ne supportant pas la durée et la température nécessaire pour un pelliculage gastrorésistant);
- elle est environnementalement intéressante car rapide, donc peu énergivore, et réalisée en solvant aqueux. Elle est de ce fait moins coûteuse. L'atomisation est une technique déjà largement utilisée au niveau industriel, y compris dans le domaine des excipients pharmaceutiques ;
- elle permet de modifier les caractéristiques de la poudre (sa densité, son écoulement) et par là même sa comprimabilité, i.e. son aptitude à permettre la réalisation de comprimés. L'évaluation des propriétés pharmaceutiques des protéines de soja, modifiées ou non, atomisées constitue une des perspectives de nos travaux ;
- elle permet de développer une grande surface de contact permettant de limiter les phénomènes irritatifs au niveau des muqueuses (notamment la muqueuse gastrique) ;

- elle peut permettre des adaptations de posologie et pourrait par exemple être administrée en pédiatrique par sonde ;
- enfin, les microsphères peuvent constituer la première étape d'obtention d'une forme gastrorésistante, en les incorporant ensuite dans une gélule (capsule dure) ou dans une forme comprimé.

La dernière partie de ce travail a permis de valider cette dernière hypothèse par la réalisation de formes gastrorésistantes sur le modèle des comprimés MUPS. Bien qu'il s'agisse d'un travail exploratoire, les résultats de l'étude démontrent que les protéines de soja, associées à un procédé de mise en forme multi-particulaire couplé à de la compression directe, peuvent constituer une alternative biosourcée, respectueuse de l'environnement (manipulation en solvant aqueux, temps de séchage et étapes de compression réduits) et sûre à l'enrobage utilisé dans les formes gastrorésistantes traditionnelles.

Cette première tentative de mise au point d'une forme galénique innovante en utilisant des protéines de soja ouvre de nombreuses perspectives, et pas uniquement au niveau de la voie orale. La possibilité de moduler la pH-sensibilité des protéines, par exemple, ouvre la porte à de nombreuses autres applications dans le domaine biomédical pour les protéines de soja, et les protéines végétales en général, complémentaires de celles déjà plus connues et référencées de la zéine (Paliwal and Palakurthi, 2014).

Références bibliographiques

- ABBAS, S., WEI, C. D., HAYAT, K. & XIAOMING, Z. 2012. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review. *Food Reviews International*, 28, 343-374.
- ABERKANE, L., ROUDAUT, G. & SAUREL, R. 2014. Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1505-1517.
- ABRAHAM, P., INDIRANI, K. & DESIGAMANI, K. 2005. Nitro-arginine methyl ester, a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase reduces ibuprofen-induced gastric mucosal injury in the rat. *Digestive diseases and sciences*, 50, 1632-1640.
- ACHOURI, A. & ZHANG, W. 2001. Effect of succinylation on the physicochemical properties of soy protein hydrolysate. *Food research international*, 34, 507-514.
- ACHOURI, A., ZHANG, W. & SHIYING, X. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Research International*, 31, 617-623.
- AGNIHOTRI, N., MISHRA, R., GODA, C. & ARORA, M. 2012. Microencapsulation—a novel approach in drug delivery: a review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2, 1-20.
- AKINTAYO, E. T., OSHODI, A. A. & ESUOSO, K. O. 1999. Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 66, 51-56.
- AMERI, M. & MAA, Y.-F. 2006. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Technology*, 24, 763-768.
- AMES, J. M. 1992. The Maillard reaction. *Biochemistry of food proteins*. Springer.
- ANASTAS, P. T. & ZIMMERMAN, J. B. 2003. Peer reviewed: design through the 12 principles of green engineering. ACS Publications.
- ANAYA CASTRO, M. A., ALRIC, I., BROUILLET, F., PEYDECASTAING, J., FULLANA, S. G. & DURRIEU, V. 2017. Soy Protein Microparticles for Enhanced Oral Ibuprofen Delivery: Preparation, Characterization, and In Vitro Release Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 1-9.
- ANDREANI, L., CERCENÁ, R., RAMOS, B. G. Z. & SOLDI, V. 2009. Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 524-531.
- ANSM 2017. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé. Glossaire - B. France: Publié au: [http://ansm.sante.fr/Glossaire/\(filter\)/B](http://ansm.sante.fr/Glossaire/(filter)/B).
- AUGUSTIN, M. A. & HEMAR, Y. 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical society reviews*, 38, 902-912.
- AUGUSTIN, M. A., SANGUANSRI, L. & BODE, O. 2006. Maillard Reaction Products as Encapsulants for Fish Oil Powders. *Journal of Food Science*, 71, E25-E32.
- AURIEMMA, G., DEL GAUDIO, P., BARBA, A. A., D'AMORE, M. & AQUINO, R. P. 2011. A combined technique based on prilling and microwave assisted treatments for the production of ketoprofen controlled release dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 196-205.
- AURIEMMA, G., MENCHERINI, T., RUSSO, P., STIGLIANI, M., AQUINO, R. P. & DEL GAUDIO, P. 2013. Prilling for the development of multi-particulate colon drug delivery systems: Pectin vs. pectin-alginate beads. *Carbohydrate Polymers*, 92, 367-373.
- AVIVI, S. & GEDANKEN, A. 2007. Are sonochemically prepared α -amylase protein microspheres biologically active? *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 1-5.

- AVRAMENKO, N. A., CHANG, C., LOW, N. H. & NICKERSON, M. T. 2016. Encapsulation of flaxseed oil within native and modified lentil protein-based microcapsules. *Food Research International*, 81, 17-24.
- AVRAMENKO, N. A., LOW, N. H. & NICKERSON, M. T. 2013. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Research International*, 51, 162-169.
- BAJAJ, P. R., TANG, J. & SABLANI, S. S. 2015. Pea Protein Isolates: Novel Wall Materials for Microencapsulating Flaxseed Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 2418-2428.
- BALA, R., PAWAR, P., KHANNA, S. & ARORA, S. 2013. Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3, 67-76.
- BAMDAD, F., SUN, X., GUAN, L. L. & CHEN, L. 2015. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 29-36.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. 2009. Amino Acids, Peptides, Proteins. *Food chemistry*.
- BENITA, S. 2006. *Microencapsulation : methods and industrial applications*, New York, Taylor & Francis.
- BI, Y. X., SUNADA, H., YONEZAWA, Y. & DANJO, K. 1999. Evaluation of Rapidly Disintegrating Tablets Prepared by a Direct Compression Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 571-581.
- BIETZ, J. A. 1970. Comparison of peptides from wheat gliadin and glutenin. *Cereal chemistry*, v. 47, pp. 381-392-1970 v.47 no.4.
- BOH, B. 2007. Developements et applications industrielles des microcapsules. *Microencapsulation: des sciences aux technologies*. Paris: Lavoisier, 9-22.
- BOLTIN, D. & NIV, Y. 2014. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28, 981-994.
- BOSCHINI, F., DELAVAL, V., TRAINA, K., VANDEWALLE, N. & LUMAY, G. 2015. Linking flowability and granulometry of lactose powders. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 312-320.
- BOSELDMANN, S. & WILLIAMS III, R. O. 2012. Route-specific challenges in the delivery of poorly water-soluble drugs. *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*. Springer.
- BRUSCHI, M. L., CARDOSO, M. L. C., LUCCHESI, M. B. & GREMIÃO, M. P. D. 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45-55.
- BUSHRA, R., SHOAIB, M. H., ASLAM, N., HASHMAT, D. & REHMAN, M. 2008. Formulation development and optimization of ibuprofen tablets by direct compression method. *Pak. J. Pharm. Sci*, 21, 113-120.
- CAILLARD, R., BLAIS, J.-S., AKINOCCHO, G. & JACQUES, W. 2016. Characterization of a food-based enteric coating for capsules and its compatibility with an alternative sealing method. *International Journal of Pharmaceutics*, 499, 321-329.
- CAILLARD, R., BOUTIN, Y. & SUBIRADE, M. 2011. Characterization of succinylated β -lactoglobulin and its application as the excipient in novel delayed release tablets. *International Dairy Journal*, 21, 27-33.
- CAILLARD, R., GUILLET-NICOLAS, R., KLEITZ, F. & SUBIRADE, M. 2012. Tableability of whey protein isolates. *International Dairy Journal*, 27, 92-98.
- CAILLARD, R., PETIT, A. & SUBIRADE, M. 2009. Design and evaluation of succinylated soy protein tablets as delayed drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 414-420.

- CAILLARD, R. & SUBIRADE, M. 2011. Quantification of the compactibility of several protein isolates: Relationship between isolate physical–chemical properties and compaction properties. *Food Research International*, 44, 917-924.
- CAILLARD, R. & SUBIRADE, M. 2012. Protein based tablets as reversible gelling systems for delayed release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 437, 130-136.
- CAN KARACA, A., LOW, N. H. & NICKERSON, M. T. 2015. Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 42, 5-12.
- CAN KARACA, A., NICKERSON, M. T. & LOW, N. H. 2011. Lentil and chickpea protein-stabilized emulsions: Optimization of emulsion formulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 13203-13211.
- CARLIN, B., LI, J. & FELTON, L. A. 2008. Pseudolatex dispersions for controlled drug delivery. *DRUGS AND THE PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 176, 1.
- CARRERAS, N., ACUÑA, V., MARTÍ, M. & LIS, M. J. 2013. Drug release system of ibuprofen in PCL-microspheres. *Colloid and Polymer Science*, 291, 157-165.
- CATAK, S., MONARD, G., AVIYENTE, V. & RUIZ-LOPEZ, M. F. 2006. Reaction mechanism of deamidation of asparaginyl residues in peptides: Effect of solvent molecules. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110, 8354-8365.
- CHABANON, G., CHEVALOT, I., FRAMBOISIER, X., CHENU, S. & MARC, I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42, 1419-1428.
- CHANDIRA, M., BHOWMIK, D., YADAV, R., JAYAKAR, B. & KUMAR, S. 2012. Formulation and Evaluation The Oral Tablets Ibuprofen. *The Pharma Innovation*, 1, 32-43.
- CHEN, H. & LANGER, R. 1998. Oral particulate delivery: status and future trends. *Advanced drug delivery reviews*, 34, 339-350.
- CHEN, J.-L., CHIANG, C.-H. & YEH, M.-K. 2002. The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *Journal of microencapsulation*, 19, 333-346.
- CHEN, L., H BRARD, G. R., BEYSSAC, E., DENIS, S. & SUBIRADE, M. 2010. In Vitro Study of the Release Properties of Soy–Zein Protein Microspheres with a Dynamic Artificial Digestive System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9861-9867.
- CHEN, L., REMONDETTO, G., ROUABHIA, M. & SUBIRADE, M. 2008. Kinetics of the breakdown of cross-linked soy protein films for drug delivery. *Biomaterials*, 29, 3750-3756.
- CHEN, L. & SUBIRADE, M. 2009. Elaboration and Characterization of Soy/Zein Protein Microspheres for Controlled Nutraceutical Delivery. *Biomacromolecules*, 10, 3327-3334.
- CHEN, S., GUO, F., DENG, T., ZHU, S., LIU, W., ZHONG, H., YU, H., LUO, R. & DENG, Z. 2017. Eudragit S100-coated chitosan nanoparticles co-loading tat for enhanced oral colon absorption of insulin. *AAPS PharmSciTech*, 18, 1277-1287.
- CHENG, C. J. & JONES, O. G. 2017. Stabilizing zein nanoparticle dispersions with ι-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 69, 28-35.
- CHOI, K.-O., RYU, J., KWAK, H.-S. & KO, S. 2010. Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with Maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin. *Food Science and Biotechnology*, 19, 957-965.
- CHOONARA, B. F., CHOONARA, Y. E., KUMAR, P., BIJUKUMAR, D., DU TOIT, L. C. & PILLAY, V. 2014. A review of advanced oral drug delivery technologies

- facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnology Advances*, 32, 1269-1282.
- CHURCH, F. C., SWAISGOOD, H. E., PORTER, D. H. & CATIGNANI, G. L. 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins I. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- CODEX ALIMENTARIUS 2008. Codex General Standard for Food Additives. *Codex STAN*, 192-1995.
- COSTA, A. M. M., NUNES, J. C., LIMA, B. N. B., PEDROSA, C., CALADO, V., TORRES, A. G. & PIERUCCI, A. P. T. R. 2015. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. *Food Chemistry*, 168, 157-166.
- COSTA, F. O., SOUSA, J. J. S., PAIS, A. A. C. C. & FORMOSINHO, S. J. 2003. Comparison of dissolution profiles of Ibuprofen pellets. *Journal of Controlled Release*, 89, 199-212.
- CZARNOCKA, J. K. & ALHNAN, M. A. 2015. Gastro-resistant characteristics of GRAS-grade enteric coatings for pharmaceutical and nutraceutical products. *International journal of pharmaceutics*, 486, 167-174.
- DAEIHAMED, M., DADASHZADEH, S., HAERI, A. & FAGHIH AKHLAGHI, M. 2017. Potential of Liposomes for Enhancement of Oral Drug Absorption. *Current Drug Delivery*, 14, 289-303.
- DAMODARAN, S. 2000. Aminoácidos, péptidos y proteínas. *Fennema, OR, Química de los alimentos, Acribia, Zaragoza*, 384.
- DARRYL, L. 2010. Glossary of Genetic Terms. *National Human Genome Research Institute*.
- DAVIDOV-PARDO, G., JOYE, I. J. & MCCLEMENTS, D. J. 2015. Chapter Nine-Food-Grade Protein-Based Nanoparticles and Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 98, 293-325.
- DAVIES, P. 2004. Oral solid dosage forms. *Pharmaceutical preformulation and formulation. Boca Raton: Interpharm/CRC*, 379-458.
- DE AZEVEDO BITTENCOURT, L., PEDROSA, C., DE SOUSA, V., TRINDADE PIERUCCI, A. & CITELLI, M. 2013. Pea Protein Provides a Promising Matrix for Microencapsulating Iron. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 333-339.
- DE CONTO, L. C., GROSSO, C. R. F. & GONÇALVES, L. A. G. 2013. Chemometry as applied to the production of omega-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum Arabic. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 218-224.
- DE KRUIF, C. G., WEINBRECK, F. & DE VRIES, R. 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340-349.
- DE KRUIF, J. K., FASLER-KAN, E., VARUM, F., BRAVO, R. & KUENTZ, M. 2014. On Prilling of Hydrophilic Microgels in Lipid Dispersions Using Mono-N-Carboxymethyl Chitosan for Oral Biologicals Delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103, 3675-3687.
- DEL GAUDIO, P., COLOMBO, P., COLOMBO, G., RUSSO, P. & SONVICO, F. 2005. Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. *International journal of pharmaceutics*, 302, 1-9.
- DENG, X. X., CHEN, Z., HUANG, Q., FU, X. & TANG, C. H. 2014. Spray-drying microencapsulation of β -carotene by soy protein isolate and/or OSA-modified starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40399.
- DEVIRIM, B. & CANEFE, K. 2006. Preparation and evaluation of modified release ibuprofen microspheres with acrylic polymers (Eudragit) by quasi emulsion solvent diffusion method: effect of variables. *Acta Poloniae Pharm Drug Res*, 63, 521-4.

- DI MARTINO, P., JOIRIS, E. & MARTELLI, S. 2004. Particle interaction of lubricated or unlubricated binary mixtures according to their particle size and densification mechanism. *Il Farmaco*, 59, 747-758.
- DONG, W. & BODMEIER, R. 2006. Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 326, 128-138.
- DONG, X.-Y., GUO, L.-L., WEI, F., LI, J.-F., JIANG, M.-L., LI, G.-M., ZHAO, Y.-D. & CHEN, H. 2011. Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1488-1498.
- DRUSCH, S., BERG, S., SCAMPICCHIO, M., SERFERT, Y., SOMOZA, V., MANNINO, S. & SCHWARZ, K. 2009. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. *Food Hydrocolloids*, 23, 942-948.
- DU, X. & HE, J. 2010. Regulation role of ibuprofen toward the morphology of porous silica nanospheres during its in situ encapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345, 269-277.
- DUARTE, I., TEMTEM, M., GIL, M. & GASPAR, F. 2011. Overcoming poor bioavailability through amorphous solid dispersions. *Ind Pharm*, 30, 4-6.
- DUCEL, V., RICHARD, J., POPINEAU, Y. & BOURY, F. 2005. Rheological Interfacial Properties of Plant Protein–Arabic Gum Coacervates at the Oil–Water Interface. *Biomacromolecules*, 6, 790-796.
- DUCEL, V., RICHARD, J., SAULNIER, P., POPINEAU, Y. & BOURY, F. 2004. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232, 239-247.
- DUNLAP, C. A. & CÔTÉ, G. L. 2005. β -Lactoglobulin–Dextran Conjugates: Effect of Polysaccharide Size on Emulsion Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 419-423.
- EFFIONORA, A., LUTFI, A. & SARI, S. K. 2016. O-025-Succinylated soybean protein as novel excipient for matrix sustained release microspheres. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 72-73.
- ELMER, C., KARACA, A. C., LOW, N. H. & NICKERSON, M. T. 2011. Complex coacervation in pea protein isolate–chitosan mixtures. *Food Research International*, 44, 1441-1446.
- ELZOGHBY, A. O., HELMY, M. W., SAMY, W. M. & ELGINDY, N. A. 2013. Novel ionically crosslinked casein nanoparticles for flutamide delivery: formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 1721-1732.
- FAHIER, J. 2016. *Polymeric controlled release film coatings*. Université du Droit et de la Santé-Lille II.
- FATTAL, E., TSAPIS, N. & AMÉLIE, B. 2007. Chapitre 13: Microtechnologies pour la libération contrôlée des molécules fragiles. In: VANDAMME, T. (ed.) *Microencapsulation : des sciences aux technologies*. France: Editions Tec & Doc.
- FAVARO-TRINDADE, C. S., SANTANA, A. S., MONTERREY-QUINTERO, E. S., TRINDADE, M. A. & NETTO, F. M. 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24, 336-340.
- FENNEMA, O. R. 1993. *Química de los alimentos*, Zaragoza, Acribia.
- FINLEY, J. 1975. Deamidated gluten: a potential fortifier for fruit juices. *Journal of Food Science*, 40, 1283-1284.

- FUTAMI, J., MAEDA, T., KITAZOE, M., NUKUI, E., TADA, H., SENO, M., KOSAKA, M. & YAMADA, H. 2001. Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups. *Biochemistry*, 40, 7518-7524.
- GAIGNAUX, A., RÉEFF, J., SIEPMANN, F., SIEPMANN, J., DE VRIESE, C., GOOLE, J. & AMIGHI, K. 2012. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *International journal of pharmaceutics*, 437, 20-28.
- GASPAR, A. L. C. & DE GÓES-FAVONI, S. P. 2015. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chemistry*, 171, 315-322.
- GEORGETTI, S. R., CASAGRANDE, R., SOUZA, C. R. F., OLIVEIRA, W. P. & FONSECA, M. J. V. 2008. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1521-1527.
- GERRARD, J. A. & BROWN, P. K. 2002. Protein cross-linking in food: mechanisms, consequences, applications. *International Congress Series*, 1245, 211-215.
- GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A. & SAUREL, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- GHARSALLAOUI, A., SAUREL, R., CHAMBIN, O., CASES, E., VOILLEY, A. & CAYOT, P. 2010. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 122, 447-454.
- GHARSALLAOUI, A., SAUREL, R., CHAMBIN, O. & VOILLEY, A. 2012. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2211-2221.
- GONNISSEN, Y., VERHOEVEN, E., PEETERS, E., REMON, J. P. & VERVAET, C. 2008. Coprocessing via spray drying as a formulation platform to improve the compactability of various drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 320-334.
- GONZÁLEZ-FERRERO, C., IRACHE, J. & GONZÁLEZ-NAVARRO, C. 2018. Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance. *Food Chemistry*, 239, 879-888.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, S. & VEREIJKEN, J. M. 2007. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173-2191.
- GOODNO, C. C., SWAISGOOD, H. E. & CATIGNANI, G. L. 1981. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Analytical Biochemistry*, 115, 203-211.
- GRUENER, L. & ISMOND, M. 1997. Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the canola 12S globulin. *Food chemistry*, 60, 513-520.
- GUJRAL, H. S. & ROSELL, C. M. 2004. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 39, 225-230.
- GUNASEKARAN, S., KO, S. & XIAO, L. 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83, 31-40.
- GUNASEKARAN, S., XIAO, L. & OULD ELEYA, M. 2006. Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 2470-2476.
- GUPTA, A. & DEY, B. 2013. Microencapsulation for controlled drug delivery: a comprehensive review. *Sunsari Technical College Journal*, 1, 7.

- HABEEB, A. F. S. A., CASSIDY, H. G. & SINGER, S. J. 1958. Molecular structural effects produced in proteins by reaction with succinic anhydride. *Biochimica et Biophysica Acta*, 29, 587-593.
- HADZIEVA, J., MLADENOVSKA, K., CRCAREVSKA, M. S., DODOV, M. G., DIMCHEVSKA, S., GEŠKOVSKI, N., GROZDANOV, A., POPOVSKI, E., PETRUŠEVSKI, G. & CHACHOROVSKA, M. 2017. Lactobacillus casei Encapsulated in Soy Protein Isolate and Alginate Microparticles Prepared by Spray Drying. *Food Technology and Biotechnology*, 55, 173.
- HAMADA, J. S. & SWANSON, B. 1994. Deamidation of food proteins to improve functionality. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34, 283-292.
- HASSAN, I. 1997. *L'amylose réticulé comme matrice pour la libération contrôlée de médicaments. Aspects structuraux*. Mémoire de Maîtrise en Chimie, Université du Québec à Montréal.
- HAWKEY, C. J. 2000. Management of gastroduodenal ulcers caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 14, 173-192.
- HECK, T., FACCIO, G., RICHTER, M. & THÖNY-MEYER, L. 2013. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 461-475.
- HEINER, A. P. & TELEMAN, O. 1997. Interface between monoclinic crystalline cellulose and water: breakdown of the odd/even duality. *Langmuir*, 13, 511-518.
- HEINZEN, C., MARISON, I., BERGER, A. & VON STOCKAR, U. 2002. Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules. *Landbauforschung Völkenrode, SH241*, 19-25.
- HIGGINS, J. D., GILMOR, T. P., MARTELLUCCI, S. A., BRUCE, R. D. & BRITAIN, H. G. 2001. Ibuprofen. *Analytical profiles of drug substances and excipients*, 27, 265-300.
- HSEIN, H., GARRAIT, G., MUMIN, M. A., BEYSSAC, E. & HOFFART, V. 2017a. Atomization of denatured whey proteins as a novel and simple way to improve oral drug delivery system properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 801-809.
- HSEIN, H., GARRAIT, G., TAMANI, F., BEYSSAC, E. & HOFFART, V. 2017b. Denatured Whey Protein Powder as a New Matrix Excipient: Design and Evaluation of Mucoadhesive Tablets for Sustained Drug Release Applications. *Pharmaceutical research*, 34, 365-377.
- HUANG, G.-Q., SUN, Y.-T., XIAO, J.-X. & YANG, J. 2012. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135, 534-539.
- IBANOGLU, E. & ERÇELEBI, E. A. 2007. Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. *Food Chemistry*, 101, 626-633.
- IFEDUBA, E. A. & AKOH, C. C. 2016. Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in Maillard reaction-modified complex coacervates. *Food Chemistry*, 199, 524-532.
- IGLESIAS, T., LÓPEZ DE CERAIN, A., IRACHE, J. M., MARTÍN-ARBELLA, N., WILCOX, M., PEARSON, J. & AZQUETA, A. 2017. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 517, 67-79.
- INTERNATIONAL, A. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. *Official methods of analysis of AOAC International.*, Volume II.
- JAIN, S. K., GUPTA, Y., JAIN, A., SAXENA, A. R., KHARE, P. & JAIN, A. 2008. Mannosylated gelatin nanoparticles bearing an anti-HIV drug didanosine for site-specific delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4, 41-48.

- JIANG, P., LIU, H.-F., ZHAO, X.-H. & DING, Q. 2017. Physicochemical properties of soybean protein isolate affected by the cross-linking with horseradish peroxidase, glucose oxidase and glucose. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 1196-1202.
- JIANG, S., GONG, X., ZHAO, X. & ZU, Y. 2015. Preparation, characterization, and antitumor activities of folate-decorated docetaxel-loaded human serum albumin nanoparticles. *Drug Delivery*, 22, 206-213.
- JIVRAJ, M., MARTINI, L. G. & THOMSON, C. M. 2000. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3, 58-63.
- JOSHI, M., ADHIKARI, B., ALDRED, P., PANOZZO, J. F., KASAPIS, S. & BARROW, C. J. 2012. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, 134, 1343-1353.
- JU, Z. Y., HETTIARACHCHY, N. S. & RATH, N. 2001. Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*, 66, 229-232.
- JUN-XIA, X., HAI-YAN, Y. & JIAN, Y. 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125, 1267-1272.
- JYOTHI, S., SEETHADEVI, A., PRABHA, K. S., MUTHUPRASANNA, P. & PAVITRA, P. 2012. Microencapsulation: a review. *Int J Pharm Bio Sci*, 3, 509-31.
- KARACA, A. C., NICKERSON, M. & LOW, N. H. 2013. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food chemistry*, 139, 448-457.
- KIICK-FISCHER, K. L. & TIRRELL, D. A. 1998. Controlling absorbency in gelatin networks: Preparation and characterization of alkylated, crosslinked gelatin. *Journal of applied polymer science*, 68, 281-292.
- KLAUSNER, E. A., LAVY, E., FRIEDMAN, M. & HOFFMAN, A. 2003. Expandable gastroretentive dosage forms. *Journal of controlled release*, 90, 143-162.
- KUMAR, R., NAGARWAL, R. C., DHANAWAT, M. & PANDIT, J. K. 2011. In-vitro and in-vivo study of indomethacin loaded gelatin nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology*, 7, 325-333.
- KUNUGI, S. & TANAKA, N. 2002. Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595, 329-344.
- KURAIISHI, C., YAMAZAKI, K. & SUSU, Y. 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17, 221-246.
- KUWATA, K., SHASTRY, R., CHENG, H., HOSHINO, M., BATT, C. A., GOTO, Y. & RODER, H. 2001. Structural and kinetic characterization of early folding events in β -lactoglobulin. *Nature Structural Biology*, 8, 151.
- LAMMEL, A. S., HU, X., PARK, S.-H., KAPLAN, D. L. & SCHEIBEL, T. R. 2010. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, 31, 4583-4591.
- LAMSAL, B. P., JUNG, S. & JOHNSON, L. A. 2007. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1215-1223.
- LAROQUE, D., INISAN, C., BERGER, C., VOULAND, É., DUFOSSÉ, L. & GUÉRARD, F. 2008. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry*, 111, 1032-1042.

- LAWRENCE, X. Y., AMIDON, G. L., POLLI, J. E., ZHAO, H., MEHTA, M. U., CONNER, D. P., SHAH, V. P., LESKO, L. J., CHEN, M.-L. & LEE, V. H. 2002. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical research*, 19, 921-925.
- LAZKO, J., POPINEAU, Y. & LEGRAND, J. 2004. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37, 1-8.
- LEBLANC, P.-P. 1997. *Traité de biopharmacie et pharmacocinétique*, Paris, Editions Vigot.
- LEE, E. J., KHAN, S. A., PARK, J. K. & LIM, K.-H. 2012. Studies on the characteristics of drug-loaded gelatin nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 297-307.
- LI, D. X., OH, Y.-K., LIM, S.-J., KIM, J. O., YANG, H. J., SUNG, J. H., YONG, C. S. & CHOI, H.-G. 2008a. Novel gelatin microcapsule with bioavailability enhancement of ibuprofen using spray-drying technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 355, 277-284.
- LI, M., ROUAUD, O. & PONCELET, D. 2008b. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, 26-39.
- LI, X.-R. & TANG, C.-H. 2013. Influence of glycation on microencapsulating properties of soy protein isolate–lactose blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2715-2722.
- LIAO, L., LIU, T.-X., ZHAO, M.-M., CUI, C., YUAN, B.-E., TANG, S. & YANG, F. 2010. Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid. *Food Chemistry*, 123, 123-130.
- LIAO, L., LUO, Y., ZHAO, M. & WANG, Q. 2012. Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 305-314.
- LIU, F., CHEN, Z. & TANG, C.-H. 2014. Microencapsulation properties of protein isolates from three selected Phaseolus legumes in comparison with soy protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 74-82.
- LIU, Y., LI, X., ZHOU, X., YU, J., WANG, F. & WANG, J. 2011a. Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2205-2210.
- LIU, Y., WANG, X., LIU, Y. & DI, X. 2017. Thermosensitive In Situ Gel Based on Solid Dispersion for Rectal Delivery of Ibuprofen. *AAPS PharmSciTech*, 1-10.
- LIU, Y., ZHAO, G., REN, J., ZHAO, M. & YANG, B. 2011b. Effect of denaturation during extraction on the conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 375-380.
- MA, Y. & COOMBES, A. G. A. 2014. Designing colon-specific delivery systems for anticancer drug-loaded nanoparticles: An evaluation of alginate carriers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102, 3167-3176.
- MADERUELO, C., ZARZUELO, A. & LANAO, J. M. 2011. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of controlled release*, 154, 2-19.
- MALTAIS, A., REMONDETTO, G. E. & SUBIRADE, M. 2009. Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. *Food Hydrocolloids*, 23, 1647-1653.
- MALTAIS, A., REMONDETTO, G. E. & SUBIRADE, M. 2010. Tableted soy protein cold-set hydrogels as carriers of nutraceutical substances. *Food Hydrocolloids*, 24, 518-524.

- MARAMBE, P. W. M. L. H. K., SHAND, P. J. & WANASUNDARA, J. P. D. 2008. An In-vitro Investigation of Selected Biological Activities of Hydrolysed Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 1155-1164.
- MARTINEZ, K. D., BAEZA, R. I., MILLÁN, F. & PILOSO, A. M. R. 2005. Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids*, 19, 361-369.
- MARTINS, S. I., JONGEN, W. M. & VAN BOEKEL, M. A. 2000. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364-373.
- MATEMU, A. O., KAYAHARA, H., MURASAWA, H., KATAYAMA, S. & NAKAMURA, S. 2011. Improved emulsifying properties of soy proteins by acylation with saturated fatty acids. *Food Chemistry*, 124, 596-602.
- MATHIOWITZ, E., BERNSTEIN, H., MORREL, E. & SCHWALLER, K. 1993. Method for producing protein microspheres. Google Patents No. 5,271,961.
- MAUGUET, M. C., LEGRAND, J., BRUJES, L., CARNELLE, G., LARRE, C. & POPINEAU, Y. 2002. Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *Journal of Microencapsulation*, 19, 377-384.
- MEHTA, A. M. 2008. Processing and equipment considerations for aqueous coatings. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 176, 67.
- MEHTA, S., KAUR, G. & VERMA, A. 2011. Fabrication of plant protein microspheres for encapsulation, stabilization and in vitro release of multiple anti-tuberculosis drugs. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375, 219-230.
- MENDANHA, D. V., ORTIZ, S. E. M., FAVARO-TRINDADE, C. S., MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E. S. & THOMAZINI, M. 2009. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42, 1099-1104.
- MIRMOGHATAIE, L., KADIVAR, M. & SHAHEDI, M. 2009. Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate. *Food Chemistry*, 114, 127-131.
- MOLINA ORTIZ, S. E., MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E. S., TRINDADE, M. A., SANTANA, A. S. & FAVARO-TRINDADE, C. S. 2009. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 919-923.
- MONDOR, M., IPPERSIEL, D., LAMARCHE, F. & BOYE, J. I. 2004. Production of Soy Protein Concentrates Using a Combination of Electroacidification and Ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6991-6996.
- MURUGESAN, R. & ORSAT, V. 2012. Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients—A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 3-14.
- NAGPAL, M., MAHESHWARI, D. K., RAKHA, P., DUREJA, H., GOYAL, S. & DHINGRA, G. 2012. Formulation Development and Evaluation of Alginate Microspheres of Ibuprofen. *Journal of Young Pharmacists : JYP*, 4, 13-16.
- NAKAI, S. & MODLER, H. W. 1996. *Food proteins: properties and characterization*, John Wiley & Sons.
- NESTERENKO, A. 2012. *Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation*.
- NESTERENKO, A., ALRIC, I., SILVESTRE, F. & DURRIEU, V. 2012. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48, 387-396.

- NESTERENKO, A., ALRIC, I., SILVESTRE, F. & DURRIEU, V. 2013a. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- NESTERENKO, A., ALRIC, I., SILVESTRE, F. & DURRIEU, V. 2014a. Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein. *Food Hydrocolloids*, 38, 172-179.
- NESTERENKO, A., ALRIC, I., VIOLLEAU, F., SILVESTRE, F. & DURRIEU, V. 2013b. A new way of valorizing biomaterials: The use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation. *Food Research International*, 53, 115-124.
- NESTERENKO, A., ALRIC, I., VIOLLEAU, F., SILVESTRE, F. & DURRIEU, V. 2014b. The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. *Food Hydrocolloids*, 41, 95-102.
- NICKLAS, M., SCHATTON, W., HEINEMANN, S., HANKE, T. & KREUTER, J. 2009. Preparation and characterization of marine sponge collagen nanoparticles and employment for the transdermal delivery of 17β -estradiol-hemihydrate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35, 1035-1042.
- NIELSEN, P. M., PETERSEN, D. & DAMBMANN, C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 642-646.
- NIETO-NIETO, T. V., WANG, Y. X., OZIMEK, L. & CHEN, L. 2014. Effects of partial hydrolysis on structure and gelling properties of oat globular proteins. *Food Research International*, 55, 418-425.
- NIEUWELINK, J. & NIEUWENHUIS, R. 2002. *Soya and other leguminous crops*, Wageningen, Netherlands, Agromisa Foundation.
- NORI, M. P., FAVARO-TRINDADE, C. S., MATIAS DE ALENCAR, S., THOMAZINI, M., DE CAMARGO BALIEIRO, J. C. & CONTRERAS CASTILLO, C. J. 2011. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 429-435.
- O'DONNELL, K. P. & WILLIAMS III, R. O. 2012. Optimizing the formulation of poorly water-soluble drugs. *Formulating poorly water soluble drugs*. Springer.
- OGAJI, I. J., NEP, E. I. & AUDU-PETER, J. D. 2012. Advances in natural polymers as pharmaceutical excipients. *Pharmaceutical Analytical Acta*, Vol. 3, 1-16.
- OGAWA, N., HIRAMATSU, T., SUZUKI, R., OKAMOTO, R., SHIBAGAKI, K., FUJITA, K., TAKAHASHI, C., KAWASHIMA, Y. & YAMAMOTO, H. 2018. Improvement in the water solubility of drugs with a solid dispersion system by spray drying and hot-melt extrusion with using the amphiphilic polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer and d-mannitol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111, 205-214.
- OKADA, H. 1997. One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28, 43-70.
- ORLIAC, O. 2002. *Valorisation des protéines de tournesol: étude de leur comportement thermique, rhéologique et de leur réactivité chimique, application à la fabrication de nouveaux matériaux biodégradables*. Toulouse, INPT.
- OZARDE, Y., SARVI, S., POLSHETTIWAR, S. & KUCHEKAR, B. 2012. Multiple-Unit-Pellet System (MUPS): A Novel Approach for Drug Delivery. *Drug Invention Today*, 4.
- PACKHAUSER, C., SEIDEL, N., SCHNIEDERS, J., KISSEL, T. & MARETSCHKEK, S. 2005. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition*. Informa Healthcare.

- PALIWAL, R. & PALAKURTHI, S. 2014. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 189, 108-122.
- PALMIERI, G. F., MARTELL, S., LAURI, D. & WEHRLE, P. 1996. Gelatin-Acacia Complex Coacervation as a Method for Ketoprofen Microencapsulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 22, 951-957.
- PARK, S.-J. & KIM, S.-H. 2004. Preparation and characterization of biodegradable poly (l-lactide)/poly (ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique. *Journal of colloid and interface science*, 271, 336-341.
- PASTOR-CAVADA, E., JUAN, R., PASTOR, J. E., ALAIZ, M. & VIOQUE, J. 2010. Protein isolates from two Mediterranean legumes: Lathyrus clymenum and Lathyrus annuus. Chemical composition, functional properties and protein characterisation. *Food Chemistry*, 122, 533-538.
- PATEL, A. R., HEUSSEN, P. C. M., HAZEKAMP, J., DROST, E. & VELIKOV, K. P. 2012. Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry*, 133, 423-429.
- PATEL, B. B., PATEL, J. K., CHAKRABORTY, S. & SHUKLA, D. 2015. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23, 352-365.
- PAULO, F. & SANTOS, L. 2017. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1327-1340.
- PENALVA, R., ESPARZA, I., AGÜEROS, M., GONZALEZ-NAVARRO, C. J., GONZALEZ-FERRERO, C. & IRACHE, J. M. 2015. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, 44, 399-406.
- PEREIRA CAMELO, S. R. 2015. *Encapsulation de molécules hydrophobes par des structures bi-gels générées par prilling: relation structure-propriétés*. Ecole nationale des Mines d'Albi-Carmaux.
- PEREIRA, H. V. R., SARAIVA, K. P., CARVALHO, L. M. J., ANDRADE, L. R., PEDROSA, C. & PIERUCCI, A. P. T. R. 2009. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Research International*, 42, 115-121.
- PEREIRA SOUZA, A. C., DEYSE GURAK, P. & DAMASCENO FERREIRA MARCZAK, L. 2017. Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 186-194.
- PHARES, R. E. & SPERANDIO, G. 1964a. Coating pharmaceuticals by coacervation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 53, 515-518.
- PHARES, R. E. & SPERANDIO, G. 1964b. Preparation of a phase diagram for coacervation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 53, 518-521.
- PIERUCCI, A., ANDRADE, L., BAPTISTA, E., VOLPATO, N. & ROCHA-LEÃO, M. 2006. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, 23, 654-662.
- PIERUCCI, A., ANDRADE, L., FARINA, M., PEDROSA, C. & ROCHA-LEÃO, M. 2007. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *Journal of Microencapsulation*, 24, 201-213.
- POLLI, J. E., YU, L. X., COOK, J. A., AMIDON, G. L., BORCHARDT, R. T., BURNSIDE, B. A., BURTON, P. S., CHEN, M. L., CONNER, D. P. & FAUSTINO, P. J. 2004. Summary workshop report: biopharmaceutics classification system—implementation challenges and extension opportunities. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93, 1375-1381.

- PONCELET, D. & DREFFIER, C. 2007. Les méthodes de microencapsulation de A à Z (ou presque). *Microencapsulation des Sciences Aux Technologies*. Paris: Lavoisier, 23-34.
- PORTER, S., SACKETT, G. & LIU, L. 2017. Development, optimization, and scale-up of process parameters: pan coating. *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Elsevier.
- POULIN, J.-F., CAILLARD, R. & SUBIRADE, M. 2011. β -Lactoglobulin tablets as a suitable vehicle for protection and intestinal delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Pharmaceutics*, 405, 47-54.
- POUTON, C. W. 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 278-287.
- QIU, C., HU, X., LI, L., YANG, X., ZHAO, M. & REN, J. 2017. Effect of transglutaminase cross-linking on the conformational and emulsifying properties of peanut arachin and conarachin fractions. *European Food Research and Technology*, 243, 913-920.
- QUISPE-CONDORI, S., SALDAÑA, M. D. A. & TEMELLI, F. 2011. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1880-1887.
- RAEI, M., SHAHIDI, F., FARHOODI, M., JAFARI, S. M. & RAFE, A. 2017. Application of whey protein-pectin nano-complex carriers for loading of lactoferrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 281-291.
- RAJABINEJAD, H., PATRUCCO, A., CARINGELLA, R., MONTARSOLO, A., ZOCCOLA, M. & POZZO, P. D. 2018. Preparation of keratin-based microcapsules for encapsulation of hydrophilic molecules. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 527-532.
- RASCÓN, M. P., BERISTAIN, C. I., GARCÍA, H. S. & SALGADO, M. A. 2011. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 549-557.
- RASENACK, N. & MÜLLER, B. W. 2002. Crystal habit and tableting behavior. *International Journal of Pharmaceutics*, 244, 45-57.
- RAYMUNDO, A., GOUVEIA, L., BATISTA, A. P., EMPIS, J. & SOUSA, I. 2005. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Research International*, 38, 961-965.
- RÉ, M.-I. 2006. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Drying Technology*, 24, 433-446.
- REDDY, N. & YANG, Y. 2011. Potential of plant proteins for medical applications. *Trends in biotechnology*, 29, 490-498.
- REN, Q., DENG, C., MENG, L., CHEN, Y., CHEN, L., SHA, X. & FANG, X. 2014. In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation of the Effect of Saturated Fat Acid Chain Length on the Transdermal Behavior of Ibuprofen-Loaded Microemulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 1680-1691.
- RENARD, D. & REDDY, T. 2007. *Polymères d'origine biologique pour la microencapsulation*, Lavoisier: Paris, France.
- ROCHA, G. A., FÁVARO-TRINDADE, C. S. & GROSSO, C. R. F. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 37-42.
- RODRIGUES, I. M., COELHO, J. F. & CARVALHO, M. G. V. 2012. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109, 337-346.

- RONDEL, C., PORTET, B., ALRIC, I., MOULOUNGUI, Z., BLANCO, J.-F. & SILVESTRE, F. 2011. Green Production of Anionic Surfactant Obtained from Pea Protein. *Journal of Surfactants and Detergents*, 14, 535-544.
- ROSENBERG, M., ROSENBERG, Y. & FRENKEL, L. 2016. Microencapsulation of model oil in wall matrices consisting of SPI and maltodextrins. *AIMS Agriculture and Food*, 1, 33-51.
- RÖSSLER, B., KREUTER, J. & SCHERER, D. 1995. Collagen microparticles: Preparation and properties. *Journal of Microencapsulation*, 12, 49-57.
- RUAN, G. & FENG, S.-S. 2003. Preparation and characterization of poly (lactic acid)–poly (ethylene glycol)–poly (lactic acid)(PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials*, 24, 5037-5044.
- SALGADO, P. R., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MAURI, A. N. & MONTERO, M. P. 2013. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33, 74-84.
- SÁNCHEZ-VIOQUE, R., BAGGER, C. L., LARRÉ, C. & GUÉGUEN, J. 2004. Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 271, 220-226.
- SEBAK, S., MIRZAEI, M., MALHOTRA, M., KULAMARVA, A. & PRAKASH, S. 2010. Human serum albumin nanoparticles as an efficient nospapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis. *International journal of nanomedicine*, 5, 525.
- SHAMSARA, O., JAFARI, S. M. & MUHIDINOV, Z. K. 2017. Development of double layered emulsion droplets with pectin/ β -lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes. *Journal of Molecular Liquids*, 243, 144-150.
- SHARIF, H. R., WILLIAMS, P. A., SHARIF, M. K., ABBAS, S., MAJEED, H., MASAMBA, K. G., SAFDAR, W. & ZHONG, F. 2017. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants – A review. *Food Hydrocolloids*, in press.
- SHILPASHREE, B. G., ARORA, S., CHAWLA, P. & TOMAR, S. K. 2015a. Effect of succinylation on physicochemical and functional properties of milk protein concentrate. *Food Research International*, 72, 223-230.
- SHILPASHREE, B. G., ARORA, S., CHAWLA, P., VAKKALAGADDA, R. & SHARMA, A. 2015b. Succinylation of sodium caseinate and its effect on physicochemical and functional properties of protein. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1270-1277.
- SHILPASHREE, B. G., ARORA, S., SHARMA, V., BAJAJ, R. K. & TOMAR, S. K. 2016. Preparation of iron bound succinylated milk protein concentrate and evaluation of its stability. *Food Chemistry*, 196, 800-807.
- SHUKLA, R. & CHERYAN, M. 2001. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171-192.
- SILVA, V. M., VIEIRA, G. S. & HUBINGER, M. D. 2014. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61, 132-143.
- SINGH, B. P., VIJ, S. & HATI, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- SMITH, J. & HONG-SHUM, L. 2011. *Food additives data book*, Oxford, UK, John Wiley & Sons.
- SOMERO, G. N. 1995. Proteins and Temperature. *Annual Review of Physiology*, 57, 43-68.

- SONG, F., TANG, D.-L., WANG, X.-L. & WANG, Y.-Z. 2011. Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*, 12, 3369-3380.
- STEVENSON, C. L. 2009. Advances in peptide pharmaceuticals. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10, 122-137.
- SUBIA, B. & KUNDU, S. 2012. Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers. *Nanotechnology*, 24, 035103.
- SUN, S., SONG, Y. & ZHENG, Q. 2009. Rheological behavior of heat-induced wheat gliadin gel. *Food Hydrocolloids*, 23, 1054-1056.
- SUPPAVORASATIT, I., DE MEJIA, E. G. & CADWALLADER, K. R. 2011. Optimization of the Enzymatic Deamidation of Soy Protein by Protein-Glutaminase and Its Effect on the Functional Properties of the Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11621-11628.
- TAHERI QAZVINI, N. & ZINATLOO, S. 2011. Synthesis and characterization of gelatin nanoparticles using CDI/NHS as a non-toxic cross-linking system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22, 63-69.
- TAMILVANAN, S. & SA, B. 2006. In vitro and in vivo evaluation of single-unit commercial conventional tablet and sustained-release capsules compared with multiple-unit polystyrene microparticle dosage forms of ibuprofen. *AAPS PharmSciTech*, 7, E126-E134.
- TAMM, F., HERBST, S., BRODKORB, A. & DRUSCH, S. 2016. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 58, 204-214.
- TANG, C.-H. & LI, X.-R. 2013a. Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*, 52, 419-428.
- TANG, C.-H. & LI, X.-R. 2013b. Microencapsulation properties of soy protein isolate: Influence of preheating and/or blending with lactose. *Journal of Food Engineering*, 117, 281-290.
- TANG, Z.-X. & LIANG, J.-Y. 2017. Use of Soy Protein-Based Carriers for Encapsulating Bioactive Ingredients. *Soy Protein-Based Blends, Composites and Nanocomposites*, 231-249.
- TARHINI, M., GREIGE-GERGES, H. & ELAISSARI, A. 2017. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *International journal of pharmaceuticals*.
- TENG, Z., LI, Y., NIU, Y., XU, Y., YU, L. & WANG, Q. 2014. Cationic β -lactoglobulin nanoparticles as a bioavailability enhancer: Comparison between ethylenediamine and polyethyleneimine as cationizers. *Food Chemistry*, 159, 333-342.
- TENG, Z., LUO, Y. & WANG, Q. 2012. Nanoparticles Synthesized from Soy Protein: Preparation, Characterization, and Application for Nutraceutical Encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2712-2720.
- TERASHITA, K. & IMAMURA, K. 2002. Preparation of antipyretic analgesic by direct compression and its evaluation. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50, 1542-1549.
- THIMMA, R. & TAMMISHETTI, S. 2003. Study of complex coacervation of gelatin with sodium carboxymethyl guar gum: microencapsulation of clove oil and sulphamethoxazole. *Journal of microencapsulation*, 20, 203-210.
- THOORENS, G., KRIER, F., LECLERCQ, B., CARLIN, B. & EVRARD, B. 2014. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 473, 64-72.

- TOMARO-DUCHESNEAU, C., SAHA, S., MALHOTRA, M., KAHOU, I. & PRAKASH, S. 2012. Microencapsulation for the therapeutic delivery of drugs, live mammalian and bacterial cells, and other biopharmaceutics: current status and future directions. *Journal of pharmaceuticals*, 2013.
- TRUONG-LE, V., LOVALENTI, P. M. & ABDUL-FATTAH, A. M. 2015. Stabilization challenges and formulation strategies associated with oral biologic drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 93, 95-108.
- TURKOGLU, M., SAHIN, I. & SAN, T. 2005. Evaluation of Hexagonal Boron Nitride as a New Tablet Lubricant. *Pharmaceutical Development and Technology*, 10, 381-388.
- VAN VEEN, B., BOLHUIS, G. K., WU, Y. S., ZUURMAN, K. & FRIJLINK, H. W. 2005. Compaction mechanism and tablet strength of unlubricated and lubricated (silicified) microcrystalline cellulose. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 133-138.
- VANDAMME, T. F., PONCELET, D. & SUBRA-PATERNAULT, P. 2007. *Microencapsulation : des sciences aux technologies*, Paris, Editions Tec & Doc.
- VASCONCELOS, T., SARMENTO, B. & COSTA, P. 2007. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug discovery today*, 12, 1068-1075.
- VERVAECK, A., MONTEYNE, T., SAERENS, L., DE BEER, T., REMON, J. P. & VERVAET, C. 2014. Prilling as manufacturing technique for multiparticulate lipid/PEG fixed-dose combinations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, 472-482.
- VERVAECK, A., SAERENS, L., DE GEEST, B. G., DE BEER, T., CARLEER, R., ADRIAENSENS, P., REMON, J. P. & VERVAET, C. 2013. Prilling of fatty acids as a continuous process for the development of controlled release multiparticulate dosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 587-596.
- VICENNATI, P., GIULIANO, A., ORTAGGI, G. & MASOTTI, A. 2008. Polyethylenimine in medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry*, 15, 2826-2839.
- VIDAL, N. L. G. & ALEGRE, M. E. G. 2013. UV analytical method suitability for investigation of BCS class 2 biowaivers: ibuprofen case. *Dissolution Technologies*, 20, 44-48.
- WAN, L. S. C., HENG, P. W. S. & CHIA, C. G. H. 1991. Preparation of coated particles using a spray drying process with an aqueous system. *International Journal of Pharmaceutics*, 77, 183-191.
- WANG, J.-S., ZHAO, M.-M., YANG, X.-Q., JIANG, Y.-M. & CHUN, C. 2007. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. *Food Hydrocolloids*, 21, 174-179.
- WANG, R., TIAN, Z. & CHEN, L. 2011. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International*, 44, 2735-2741.
- WANG, S., GUO, S. & CHENG, L. 2008a. Disodium norcantharidate loaded poly (ϵ -caprolactone) microspheres: I. Preparation and evaluation. *International journal of pharmaceutics*, 350, 130-137.
- WANG, X.-S., TANG, C.-H., LI, B.-S., YANG, X.-Q., LI, L. & MA, C.-Y. 2008b. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 22, 560-567.
- WANG, Z., JU, X., HE, R., YUAN, J. & ALUKO, R. E. 2015a. Effect of high pressure treatment on rapeseed protein microparticle properties and gastrointestinal release behavior of the encapsulated peptides. *Food Research International*, 77, 549-555.

- WANG, Z., JU, X., HE, R., YUAN, J. & WANG, L. 2015b. The effect of rapeseed protein structural modification on microstructural properties of peptide microcapsules. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1305-1318.
- WATKINSON, A., BRAIN, K. & WALTERS, K. 1993. The penetration of ibuprofen through human skin in vitro: vehicle, enhancer and pH effects. *Prediction of percutaneous penetration*, 3, 335-341.
- WEHRLÉ, P. 2012. *Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique*, Maloine.
- WEN, H. & PARK, K. 2011. *Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice*, John Wiley & Sons.
- WIDODO, R. T. & HASSAN, A. 2015. Compression and mechanical properties of directly compressible pregelatinized sago starches. *Powder Technology*, 269, 15-21.
- WOOD, D. M., MONAGHAN, J., STREETE, P., JONES, A. L. & DARGAN, P. I. 2006. Fatality after deliberate ingestion of sustained-release ibuprofen: a case report. *Critical Care*, 10, R44.
- WRIGHT, H. T. 1991. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 26, 1-52.
- WRIGHT, J. C. & HOFFMAN, A. S. 2012. Historical Overview of Long Acting Injections and Implants. In: WRIGHT, J. C. & BURGESS, D. J. (eds.) *Long Acting Injections and Implants*. Boston, MA: Springer US.
- WU, T., DAI, S., CONG, X., LIU, R. & ZHANG, M. 2017. Succinylated Soy Protein Film Coating Extended the Shelf Life of Apple Fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e13024-n/a.
- XIAO, D., DAVIDSON, P. M. & ZHONG, Q. 2011. Spray-dried zein capsules with coencapsulated nisin and thymol as antimicrobial delivery system for enhanced antilisterial properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 7393-7404.
- XIAO, Z., LIU, W., ZHU, G., ZHOU, R. & NIU, Y. 2014. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 1482-1494.
- XU, F., SUN, L.-X., TAN, Z.-C., LIANG, J.-G. & LI, R.-L. 2004. Thermodynamic study of ibuprofen by adiabatic calorimetry and thermal analysis. *Thermochimica acta*, 412, 33-57.
- XU, H. & ZHANG, G. 2014. Slow digestion property of microencapsulated normal corn starch. *Journal of Cereal Science*, 60, 99-104.
- XUE, F., LI, C., LIU, Y., ZHU, X., PAN, S. & WANG, L. 2013a. Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *Journal of Food Engineering*, 119, 439-445.
- XUE, F., LI, C., ZHU, X., WANG, L. & PAN, S. 2013b. Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through Maillard reaction. *Food Research International*, 51, 490-495.
- YANG, L., ZHANG, B., YI, J., LIANG, J., LIU, Y. & ZHANG, L.-M. 2013. Preparation, characterization, and properties of amylose-ibuprofen inclusion complexes. *Starch - Stärke*, 65, 593-602.
- YAZDANIAN, M., BRIGGS, K., JANKOVSKY, C. & HAWI, A. 2004. The "High Solubility" Definition of the Current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System May Be Too Strict for Acidic Drugs. *Pharmaceutical Research*, 21, 293-299.

- YEW, S.-E., LIM, T.-J., LEW, L.-C., BHAT, R., MAT-EASA, A. & LIONG, M.-T. 2011. Development of a Probiotic Delivery System from Agrowastes, Soy Protein Isolate, and Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 76, H108-H115.
- YI, J., LAM, T. I., YOKOYAMA, W., CHENG, L. W. & ZHONG, F. 2014. Cellular Uptake of β -Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization–Evaporation Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1096-1104.
- YIN, S.-W., TANG, C.-H., CAO, J.-S., HU, E.-K., WEN, Q.-B. & YANG, X.-Q. 2008. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 106, 1004-1013.
- YIN, S.-W., TANG, C.-H., WEN, Q.-B. & YANG, X.-Q. 2009. Effects of Acylation on the Functional Properties and In Vitro Trypsin Digestibility of Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein Isolate. *Journal of Food Science*, 74, E488-E494.
- YIN, S.-W., TANG, C.-H., WEN, Q.-B., YANG, X.-Q. & YUAN, D.-B. 2010. The relationships between physicochemical properties and conformational features of succinylated and acetylated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International*, 43, 730-738.
- YUAN, Y., KONG, Z.-Y., SUN, Y.-E., ZENG, Q.-Z. & YANG, X.-Q. 2017. Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 171-179.
- ZHANG, J., LEE, T. C. & HO, C. T. 1993. Thermal deamidation of proteins in a restricted water environment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41, 1840-1843.
- ZHANG, Y., CHAN, H. F. & LEONG, K. W. 2013. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 104-120.
- ZHAO, C.-B., ZHANG, H., XU, X.-Y., CAO, Y., ZHENG, M.-Z., LIU, J.-S. & WU, F. 2017. Effect of acetylation and succinylation on physicochemical properties and structural characteristics of oat protein isolate. *Process Biochemistry*, 57, 117-123.
- ZHAO, G., LIU, Y., ZHAO, M., REN, J. & YANG, B. 2011. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 127, 1438-1443.
- ZHAO, X. & HOU, Y. 2009. Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates, *imag. African Journal of Biotechnology*, 8.
- ZHAO, X., ZHANG, X., LIU, H., ZHANG, G. & AO, Q. 2018. Functional, nutritional and flavor characteristic of soybean proteins obtained through reverse micelles. *Food Hydrocolloids*, 74, 358-366.
- ZHENG, H.-G., YANG, X.-Q., TANG, C.-H., LI, L. & AHMAD, I. 2008. Preparation of soluble soybean protein aggregates (SSPA) from insoluble soybean protein concentrates (SPC) and its functional properties. *Food Research International*, 41, 154-164.
- ZHENG, H., ZHOU, Z., CHEN, Y., HUANG, J. & XIONG, F. 2007. pH-sensitive alginate/soy protein microspheres as drug transporter. *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 1034-1041.
- ZHONG, Q. & JIN, M. 2009. Nanoscale structures of spray-dried zein microcapsules and in vitro release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 3886-3894.
- ZIAEE, A., ALBADARIN, A. B., PADRELA, L., FAUCHER, A., O'REILLY, E. & WALKER, G. 2017. Spray drying ternary amorphous solid dispersions of ibuprofen – An investigation into critical formulation and processing parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 120, 43-51.

- ZOHURIAAN-MEHR, M. J., POURJAVADI, A., SALIMI, H. & KURDTABAR, M. 2009. Protein- and homo poly(amino acid)-based hydrogels with super-swelling properties. *Polymers for Advanced Technologies*, 20, 655-671.
- ZVONAR, A., KRISTL, J., KERČ, J. & GRABNAR, P. A. 2009. High celecoxib-loaded nanoparticles prepared by a vibrating nozzle device. *Journal of microencapsulation*, 26, 748-759.

Annexes

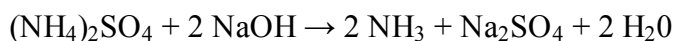
Annexe I. Dosage des protéines par la méthode Kjeldahl

L'analyse par la méthode Kjeldahl permet de déterminer la teneur en protéines d'un échantillon par le dosage de l'azote contenu dans celui-ci. L'analyse s'effectue en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la minéralisation des protéines (0,2 – 0,3g de matière sèche selon la teneur en protéine) est effectuée pour transformer l'azote organique des protéines en azote minéral. Cette réaction s'effectue à l'aide d'un bloc de minéralisation Tecator Kjelttec 2020, à 400°C pendant 90 minutes, en présence de 12,5mL d'acide sulfurique concentré à 95% et d'un mélange de catalyseurs ($K_2SO_4 + CuSO_4$).

Minéralisation avec l'acide sulfurique:



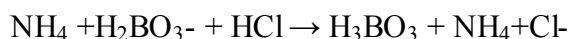
Après refroidissement des tubes de minéralisation, la préparation à la titration de l'azote minéralisé est nécessaire. Après avoir installé les tubes dans le passeur Kjelttec™ 8420 couplé avec lui, l'analyseur Kjelttec™ 8400 délivre de l'eau distillée puis de la soude à 40% dans le tube pour transformer les ions ammoniums en ammoniaque.



La distillation du contenu du tube permet d'entraîner à la vapeur l'ammoniac produit par l'ajout de soude, que l'on piège dans une solution d'acide borique à 1% colorée par un mélange indicateur (vert de bromocrésol et rouge de méthyle).



Pour déterminer la teneur en azote total dans la matière organique, l'ammoniac est titré par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1N grâce au virage d'un mélange d'indicateurs colorés (rouge de méthyle et vert de bromocrésol) dans une solution d'acide borique à 4%. Le volume d'acide chlorhydrique utilisé pour la titration est proportionnel à la quantité d'azote dans l'échantillon.



Par convention, la teneur en protéines de l'échantillon est obtenue en multipliant la teneur en azote total par un facteur de conversion empirique. Ce coefficient (6,25 pour les matières

d'origine végétale) prend en compte la masse molaire moyenne des acides aminés composant les protéines à quantifier. La teneur en protéines est alors calculée par la relation suivante :

$$\text{Protéines (\%)} = \frac{M_n \times C \times (V_1 - V_0)}{m_{\text{initiale}}} \times 6,25 \times 100$$

avec M_n – masse molaire de l'azote, 14,007g/mol ;

C – concentration de la solution d'acide chlorhydrique, mol/L ;

V_0 – volume d'acide chlorhydrique utilisé pour la titration du blanc, mL ;

V_1 – volume d'acide chlorhydrique utilisé pour la titration de l'échantillon, mL ;

m – masse de l'échantillon, mg.

Annexe II. Dosage des fonctions amines par la méthode OPA

La méthode OPA (ortho-phthaldialdéhyde) (Church *et al.*, 1983, Goodno *et al.*, 1981) est utilisée pour le dosage des groupes α et ϵ aminés dans les molécules à fonctions amines (acides aminés, peptides et protéines). Grâce à la réaction entre le groupement amine, le réactif OPA et le DTT (1,4-Dithiothréitol), le composé isoindole est formé (Figure 48). Cette molécule absorbe fortement à 340 nm, ce qui permet de quantifier les groupes amines libres de l'échantillon analysé, par spectrométrie UV. Dans ce travail le β -mercaptoéthanol utilisé par Church *et al.*, est remplacé par le DTT, un réactif plus acceptable pour l'environnement (Nielsen *et al.*, 2001).

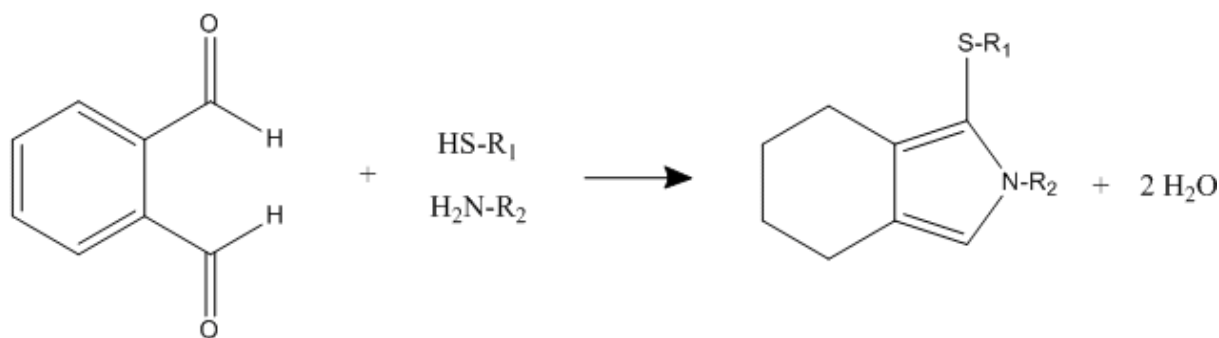


Figure 48. La réaction OPA. L'OPA réagit avec les groupes amino primaires et un composé SH (dithiothréitol, DTT) pour former un composé qui absorbera la lumière à 340nm (Nielsen *et al.*, 2001).

Le réactif de la méthode OPA est préparé le jour de l'analyse. Dans une fiole de 200mL, les composés suivants sont mélangés: 100mL de tétraborate de sodium (0,1M), 10mL de solution de dodécyle sulfate de sodium (20% w/w), 160mg d'OPA dissous dans 4mL de méthanol, 170mg DTT 1,4-Dithiothréitol, l'ensemble est complété à 200mL par de l'eau déminéralisée. Le réactif est couvert par du papier aluminium pour le protéger de la lumière, pendant 2 heures avant l'analyse.

50-500mg de l'échantillon à analyser sont dissous par ultrasons dans 10mL d'un tampon de tétraborate de sodium 0,0125M et de dodécyle sulfate de sodium à 2% w/w (pH 9,4). Si la solubilité de l'extrait protéique est faible, la solution est agitée pendant 10 minutes dans un bain chauffé à 70°C. Les solutions de L-leucine (0,1mM à 1mM), dans le même tampon, sont

utilisées pour la réalisation de la droite de calibration (Figure 49). Cette droite est tracée pour chaque série d'analyses.

2mL de réactif OPA et 1mL de solution d'échantillon sont introduits dans un tube en verre, mélangés rapidement à l'aide d'un agitateur Vortex (Heidolph, Burladingen, Allemagne) et incubés pendant 2min à température ambiante. Puis, la densité optique de ce mélange est mesurée à 340nm à l'aide d'un Spectrometer UV (1800 SHIMADZU, Koyoto, Japan).

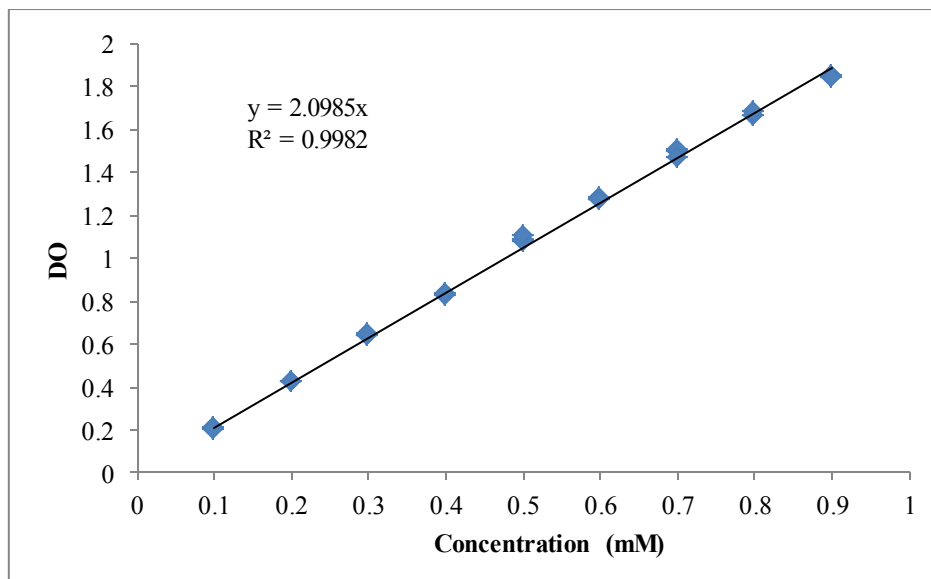


Figure 49. Droite d'étalonnage de L-Leucine

Annexe III. Méthode de dosage de l'Ibuprofène par HPLC

Afin de déterminer la concentration en ibuprofène, des analyses chromatographiques (HPLC) en phase inverse sont réalisées. Le système se compose d'une pompe quaternaire Dionex P680, d'un auto-échantillonneur Dionex ASI-100, d'un compartiment à colonne thermostaté Thermo Scientific UltiMate 3000 et d'un détecteur Thermo Scientific Ultimate 3000 UV-DAD. Après mise au point de la méthode, la longueur retenue pour l'acquisition de l'ensemble des chromatogrammes est fixée à 222nm. La colonne utilisée est une Gemini 5 μ m C18, 250 x 4.6mm² équipée d'une pré-colonne de 10 x 3mm contenant le même sorbant. Les analyses sont réalisées en mode isocratique en présence d'une phase mobile constituée d'un mélange de tampon acétate de sodium 0,1M (pH 7) et d'acétonitrile à 60:40 (w/w). La température du four à 20°C et un volume injecté de 20 μ L.

Dosage par étalonnage externe

A partir d'une solution-mère d'ibuprofène préparé dans le mélange utilisé comme phase mobile (mélange d'acétate de sodium 0,1 M (pH 7) et d'acétonitrile 60:40 (w/w)), une gamme de concentrations 0,05 – 0,9mg/mL est préparée (Figure 50) afin de doser l'ibuprofène dans les microparticules après atomisation.

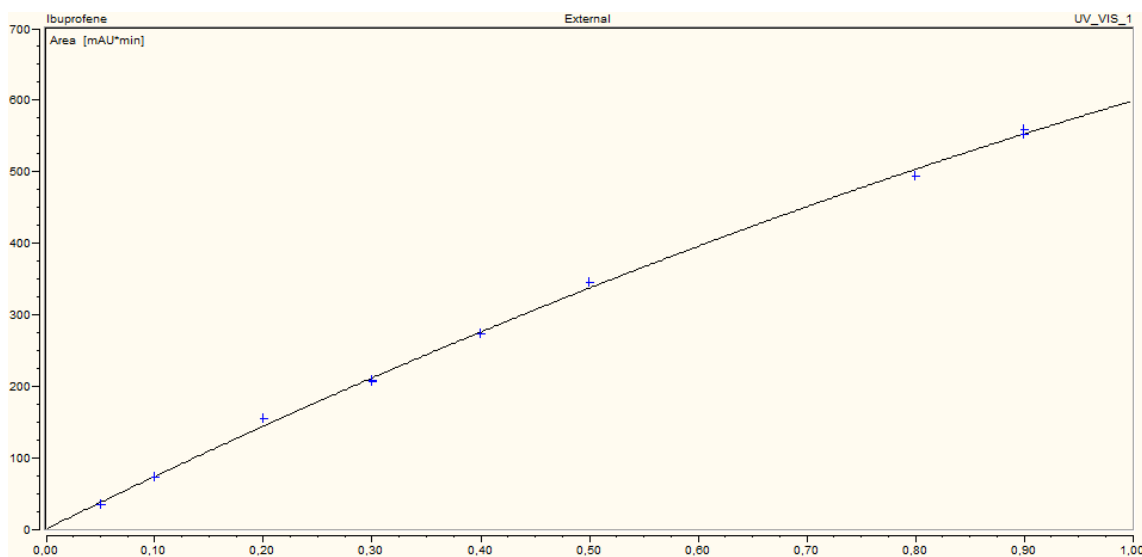


Figure 50. Droite d'étalonnage de l'Ibuprofène dans d'acétate de sodium 0,1M (pH 7) et d'acétonitrile 60:40 (w/w) à 222nm.

Un deuxième étalonnage est également réalisé mais cette fois dans le fluide gastrique simulé (FGS) à pH 1.2 avec 0.32% de pepsine (w/v) pour le dosage des cinétiques à ce pH. La gamme de concentrations 0.0005 – 0.02mg/mL est préparée (Figure 51).

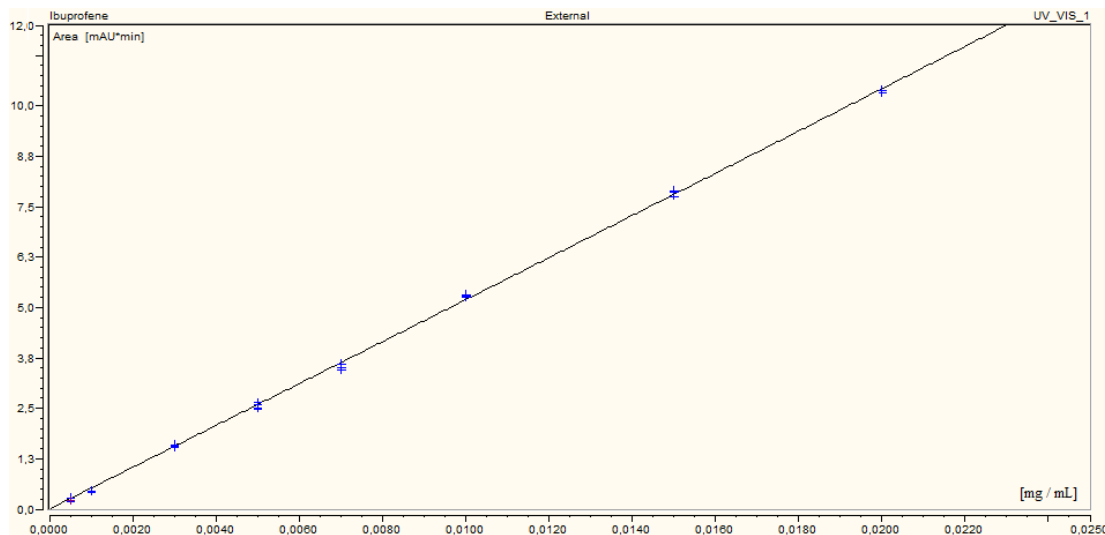


Figure 51. Droite d'étalonnage de l'Ibuprofène dans FGS avec 0,32% de pepsine (w/v) à pH 1,2 à 222nm.

Enfin, une troisième calibration est mise en place en introduisant l'ibuprofène dans le fluide intestinal simulé (FIS) à pH 6.8. La gamme de concentrations 0.003 – 0.2mg/mL est préparée (Figure 52).

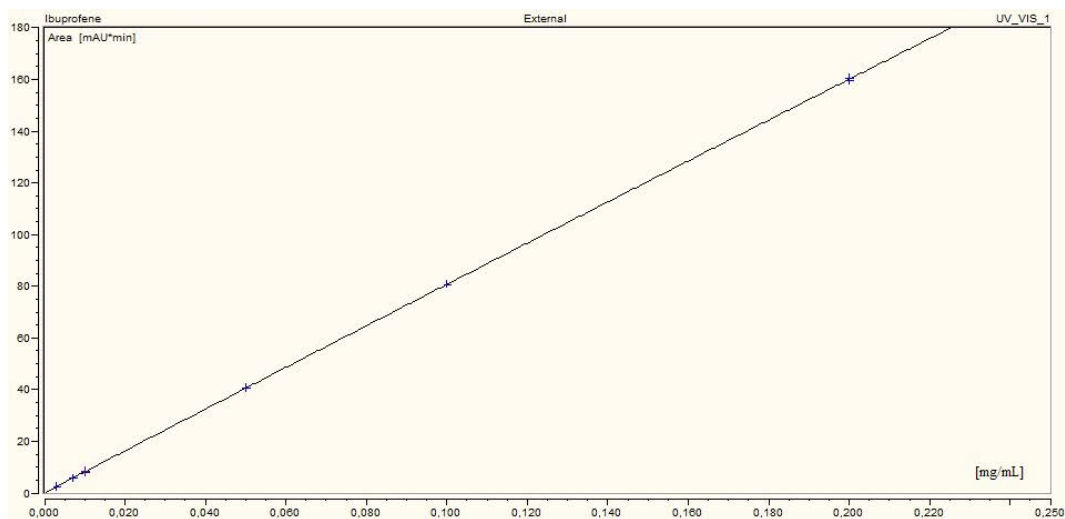


Figure 52. Droite d'étalonnage de l'Ibuprofène dans FIS à pH 6,8 à 222nm.

Annexe IV. Principe et schéma des cellules à flux continu (SotaxCE6)

Les cinétiques de libération ont été effectuées en utilisant des cellules à flux continu (CFC) et l'appareil Dissotest CE6 Sotax (Figure 53). La Figure 54 présente un schéma d'une cellule spécifique pour l'évaluation de vecteur sous forme de poudre dans un système en circuit fermé, telle qu'utilisée dans les essais de dissolution des microparticules dans les conditions préconisées par la Pharmacopée Européenne Edition 9.5.

Les cellules à poudre ont été préparées en plaçant une perle rubis de 5mm dans le fond de chaque cellule et en remplissant la partie conique des cellules avec 1g des billes de verre de 1mm. Ensuite un filtre en fibres de verre Whatmann GF/D avec une porosité de $2,7\mu\text{m}$ est placé entre deux tamis métalliques. Les échantillons sont introduits sur le tamis et sont pesés directement dans les cellules pour connaître la masse exacte d'échantillon utilisé. Un second filtre GF/F avec une porosité de $0,7\mu\text{m}$ et un tamis métallique (maille $0,4\text{mm}$) sont ajoutés. L'utilisation des filtres aux 2 extrémités des cellules à poudre permet de s'assurer que les échantillons resteront confinés dans ces dernières.

Chaque cellule est ensuite placée dans son support et la pompe péristaltique lancée pour réaliser les essais en circuit fermé, à débit et température contrôlés.

Deux milieux de dissolution ont été utilisés (pH 1,2 ou pH 6,8), pour simuler les conditions gastriques ou intestinales. La quantité de microparticules utilisée pour chaque essai répond aux conditions SINK, en relation avec la solubilité de l'ibuprofène dans le milieu considéré. Les essais ont été réalisés à 37°C au débit de $8\text{mL}/\text{min}$.

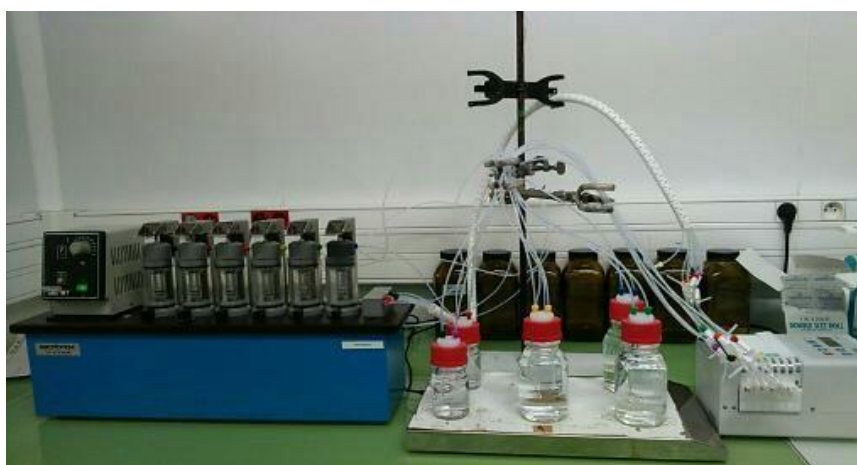


Figure 53. DISSOTEST CE6 SOTAX

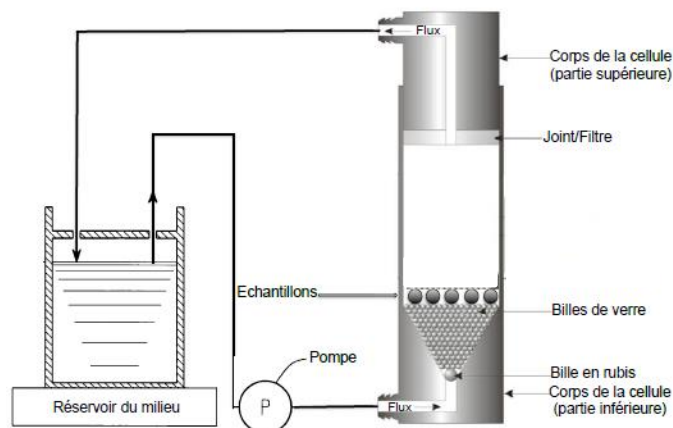


Figure 54. Schéma d'une cellule à flux continue en circuit fermé utilisé dans les essais de dissolution (Pereira Camelo, 2015).

Les milieux de dissolution ont été préparés selon Ph. Eur. 9.5: fluide gastrique simulé (FGS) à pH 1,2 avec 0,32% de pepsine (w/v) et du fluide intestinal simulé (FIS) à pH 6,8.

Préparation du FGS pH 1,2 avec 0,32% de pepsine: Dissoudre 2g de NaCl et 3,2g de poudre de pepsine dans l'eau, ajouter 80mL de HCl 1M et compléter à 1000mL avec de l'eau ultra-pure (Chen *et al.*, 2008).

Préparation du FIS pH 6,8: Préparer 250mL de KH_2PO_4 0,2 M, ajouter 112mL de NaOH 0,2M, puis compléter à 1000mL avec de l'eau ultra-pure.

Annexe V. Écoulement des poudres

D'après la Pharmacopée Européenne 9.5:

L'essai d'écoulement est destiné à déterminer, dans des conditions définies, l'aptitude des solides divisés (poudres, granulés...) à s'écouler verticalement.

Appareillage

Selon les propriétés d'écoulement du produit à examiner, des entonnoirs avec et sans tige, d'angles et de diamètres d'orifice différents sont utilisés (voir Figure 55 et Figure 56). L'entonnoir est maintenu verticalement par un dispositif approprié. L'ensemble doit être protégé des vibrations.

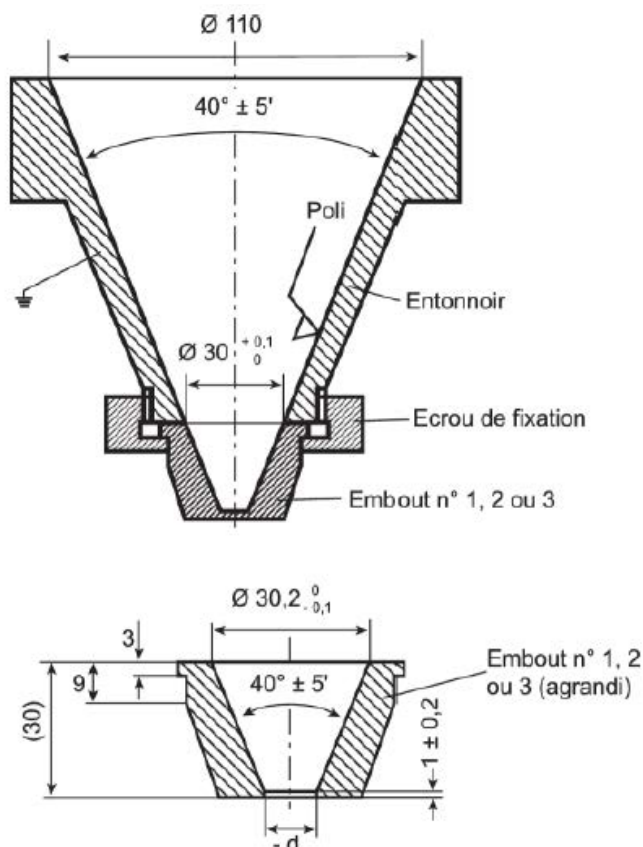


Figure 55. Dimensions en millimètres

Mode opératoire

Dans l'entonnoir sec, dont l'orifice d'écoulement a été préalablement obturé à l'aide d'un moyen approprié, introduisez sans tasser une prise d'essai pesée avec une précision de 0,5

pour cent. La quantité de l'échantillon dépend de son volume apparent et de l'appareil utilisé. Libérez l'orifice de l'entonnoir et mesurez le temps d'écoulement de la totalité de l'échantillon. Effectuez trois déterminations.

Expression des résultats

L'aptitude à l'écoulement est exprimée en secondes et en dixièmes de secondes, par rapport à 100g d'échantillon.

Les résultats dépendent des conditions de conservation du produit à examiner.

Le résultat peut être exprimé par :

- la moyenne de ces déterminations, à condition qu'aucune des valeurs individuelles ne s'écarte de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne,
- les deux valeurs extrêmes, si les valeurs individuelles s'écartent de plus de 10 pour cent de la valeur moyenne,
- sous forme de graphique (masse en fonction du temps d'écoulement),
- un temps infini si la totalité de l'échantillon ne s'écoule pas.

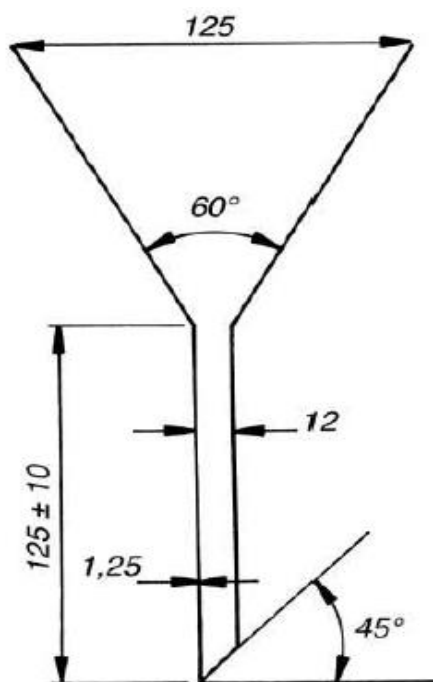


Figure 56. Dimensions en millimètres

Annexe VI. Masse volumique vrac et masse volumique après tassement

D'après la Pharmacopée Européenne 9.5:

Méthode 1: éprouvette graduée

Appareillage.

L'appareil comporte :

- une éprouvette graduée de 250mL (permettant la lecture à 2mL près) ayant une masse de $220 \pm 44\text{g}$,
- un appareil de tassement capable de produire, par minute, soit nominalement 250 ± 15 chutes d'une hauteur de $3 \pm 0,2$ mm, soit nominalement 300 ± 15 chutes d'une hauteur de 14 ± 2 mm. La masse du support de l'éprouvette, avec son dispositif de fixation, est de $450 \pm 10\text{g}$.

Mode opératoire pour la masse volumique vrac :

Prélevez une quantité de poudre suffisante pour effectuer l'essai et passez-la si nécessaire sur un tamis à ouverture de maille au moins égale à 1,0mm pour désagréger les agglomérats pouvant s'être formés au repos; cette opération doit être effectuée avec précaution afin de ne pas modifier la nature de la substance. Dans une éprouvette graduée sèche de 250mL (Figure 57), permettant la lecture à 2mL près, introduisez, avec précaution et sans tasser, une masse m d'environ 100g de cet échantillon, pesée à 0,1 pour cent près. Si nécessaire, nivelez la poudre avec précaution, sans la tasser, puis lisez le volume apparent non tassé V_0 à la plus proche graduation. Calculez la masse volumique vrac m/V_0 exprimée en grammes par millilitre. En règle générale, il est souhaitable de procéder à plusieurs répétitions pour déterminer la masse volumique vrac.

Si la masse volumique de la poudre est trop faible ou trop élevée, de telle sorte que l'échantillon a un volume apparent non tassé supérieur à 250mL ou inférieur à 150mL, il n'est pas possible d'utiliser un échantillon de 100g.

Par conséquent, un échantillon de masse différente doit être prélevé de telle sorte que son volume apparent non tassé soit compris entre 150mL et 250mL (volume apparent supérieur ou

égal à 60 pour cent du volume total de l'éprouvette). La masse de l'échantillon est alors spécifiée dans l'expression des résultats.

Pour les prises d'essai de volume apparent compris entre 50mL et 100mL, une éprouvette de 100mL permettant la lecture à 1mL près peut être utilisée; le volume de l'éprouvette est alors spécifié dans l'expression des résultats.

Mode opératoire pour la masse volumique après tassement :

Procédez comme décrit ci-dessus pour la détermination du volume apparent V_0 . Fixez l'éprouvette sur son support. Effectuez, sur le même échantillon, 10 chutes, 500 chutes, puis 1250 chutes, et lisez à la plus proche graduation les volumes correspondants V_{10} , V_{500} et V_{1250} . Si la différence entre V_{500} et V_{1250} est inférieure ou égale à 2mL, V_{1250} est le volume après tassement (ou volume tassé). Si la différence entre V_{500} et V_{1250} est supérieure à 2mL, répétez le tassement par incréments de, par exemple, 1250 chutes jusqu'à obtention d'une différence inférieure ou égale à 2mL entre 2 mesures successives. Un nombre moins élevé de chutes peut convenir pour certaines poudres, sous réserve de validation. Calculez la masse volumique après tassement m/V_f exprimée en grammes par millilitre, V_f étant le volume final après tassement. En règle générale, il est souhaitable de procéder à plusieurs répétitions pour déterminer la masse volumique après tassement. Spécifiez la hauteur de chute avec les résultats.

S'il n'est pas possible d'utiliser un échantillon de 100g, réduisez la prise d'essai et utilisez une éprouvette appropriée de 100mL, permettant la lecture à 1mL près, pesant 130 ± 16 g et montée sur un support pesant 240 ± 12 g. Si la différence entre V_{500} et V_{1250} est inférieure ou égale à 1mL, V_{1250} est le volume après tassement (ou volume tassé). Si la différence entre V_{500} et V_{1250} est supérieure à 1mL, répétez le tassement par incréments de, par exemple, 1250 chutes jusqu'à obtention d'une différence inférieure ou égale à 1mL entre 2 mesures successives. Spécifiez les conditions d'essai modifiées avec les résultats.

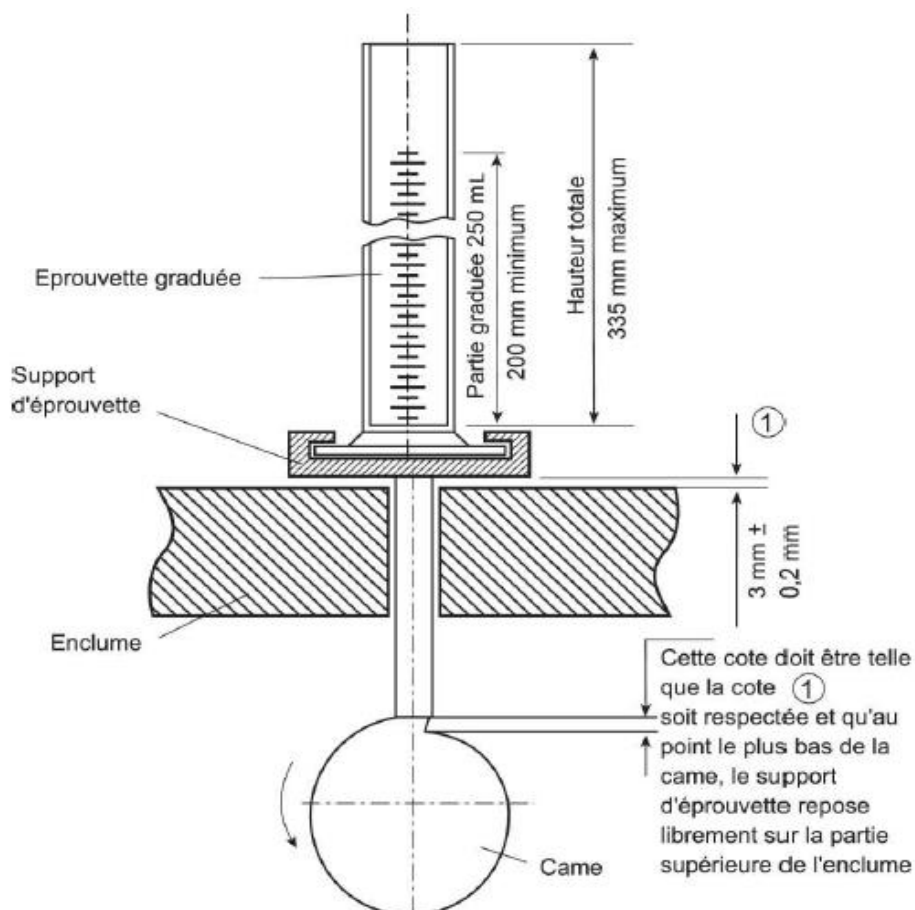


Figure 57. Dispositif de tassement d'un échantillon de poudre (Ph. Eur. 9.5)

L'échelle d'aptitude à l'écoulement généralement acceptée pour l'indice de compressibilité et l'indice de Hausner est présentée dans le Tableau 29.

Tableau 29. Echelle d'aptitude à l'écoulement (Ph. Eur. 9.5)

Indice de compressibilité (pour cent)	Aptitude à l'écoulement	Indice de Hausner
1 - 10	Excellente	1,00 - 1,11
11 - 15	Bonne	1,12 - 1,18
16 - 20	Assez bonne	1,19 - 1,25
21 - 25	Passable	1,26 - 1,34
26 - 31	Médiocre	1,35 - 1,45
32 - 37	Très médiocre	1,46 - 1,59
> 38	Extrêmement médiocre	> 1,60

Annexe VII. Résistance à la rupture des comprimés

D'après la Pharmacopée Européenne 9.5:

Cet essai est destiné à déterminer, dans des conditions définies, la résistance à la rupture des comprimés, mesurée par la force nécessaire pour provoquer leur rupture par écrasement.

Appareillage

L'appareil est constitué de 2 mâchoires se faisant face, l'une se déplaçant vers l'autre. La surface plane des mâchoires est perpendiculaire au sens du déplacement. La surface d'écrasement des mâchoires est plane et plus grande que la zone de contact avec le comprimé. L'appareil est étalonné à l'aide d'un système précis à 1 newton près.

Mode opératoire

Placez le comprimé entre les mâchoires en tenant compte, le cas échéant, de sa forme, de la barre de cassure et de la gravure; pour chaque détermination, orientez le comprimé de la même façon par rapport à la direction d'application de la force. Effectuez la mesure sur 10 comprimés, en prenant soin d'éliminer tout débris de comprimés avant chaque détermination. Ce procédé ne s'applique pas lorsqu'un appareil entièrement automatisé est utilisé.

Expression des résultats

Exprimez les résultats en donnant la valeur moyenne, les valeurs minimales et maximales des forces mesurées, toutes exprimées en newtons.

Indiquez le type d'appareil et, le cas échéant, l'orientation des comprimés.

Annexe VIII. Friabilité des comprimés non enrobés

D'après la Pharmacopée Européenne 9.5:

La procédure d'essai décrite dans ce chapitre est généralement applicable à la plupart des comprimés obtenus par compression. La mesure de la friabilité complète d'autres mesures de résistance mécanique, par exemple celle de la résistance à la rupture.

Utilisez un tambour d'un diamètre intérieur de 283-291mm et d'une profondeur de 36-40mm, en polymère synthétique transparent à surfaces intérieures polies, et produisant le moins possible d'électricité statique (Figure 58). L'une des faces du tambour est amovible. A chaque rotation, les comprimés sont projetés du centre du tambour vers la paroi extérieure, par une pale curviligne de rayon intérieur de 75,5-85,5mm. Le diamètre extérieur de l'anneau central est de 24,5-25,5mm. Le tambour est monté sur l'axe horizontal d'un dispositif d'entraînement dont la vitesse de rotation est de 25 ± 1 tr/min. Par conséquent, à chaque rotation, les comprimés roulent ou glissent et tombent sur la paroi ou les uns sur les autres.

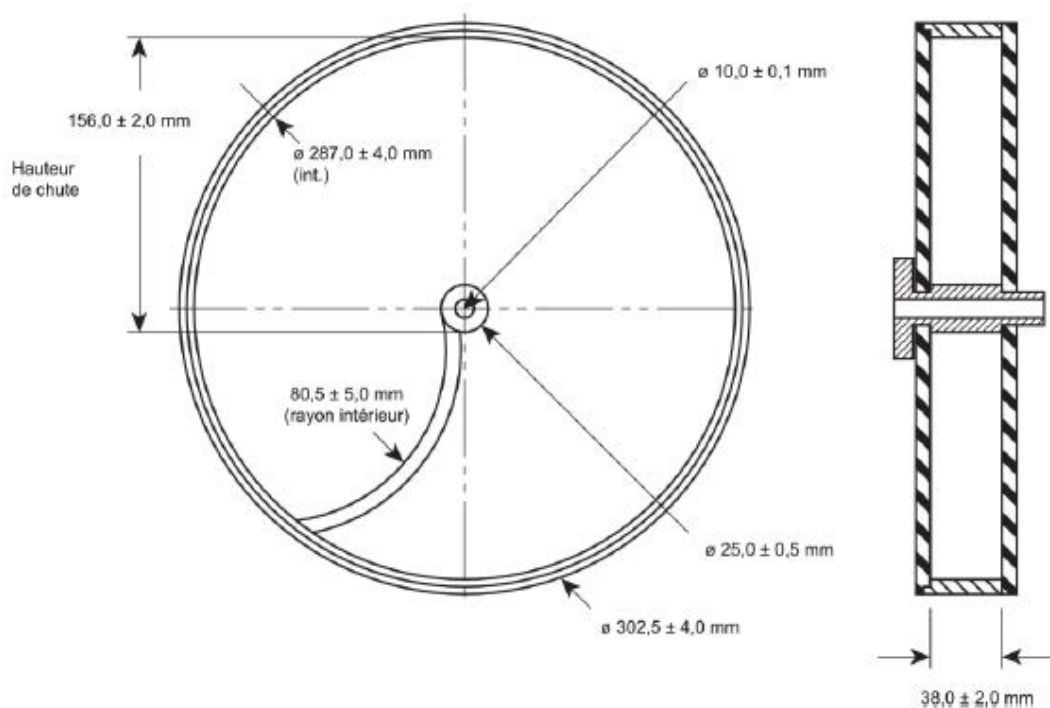


Figure 58. Appareil de détermination de la friabilité des comprimés

Annexe IX. Désagrégation des comprimés et des capsules

D'après la Pharmacopée Européenne 9.5 :

Essai A- Comprimés et capsules de dimensions normales.

Appareillage.

L'appareillage se compose d'un panier porte-tubes, d'un vase cylindrique bas de 1 L destiné à contenir le liquide d'immersion, d'une hauteur de 149 ± 11 mm et d'un diamètre intérieur de 106 ± 9 mm, d'un système thermostatique permettant de maintenir le liquide à une température comprise entre $35-39^{\circ}\text{C}$, et d'un dispositif servant à imprimer au porte-tubes, dans le liquide d'immersion, un mouvement vertical alternatif de fréquence constante comprise entre 29-32 cycles par minute de montée-descente et d'amplitude de 55 ± 2 mm. Le volume de liquide introduit dans le vase est ajusté pour que le treillis métallique soit, en haut de course, à au moins 15 mm de la surface du liquide et, en bas de course, à au moins 25 mm du fond du vase. A aucun moment le haut du panier ne doit être submergé. Les temps de montée et de descente sont égaux, et le changement de sens s'effectue selon une transition progressive plutôt qu'une inversion brutale. Le porte-tubes suit un mouvement vertical suivant son axe, sans mouvement horizontal appréciable ni déviation significative par rapport à la verticale.

Ensemble mobile. Le râtelier porte 6 tubes transparents ouverts aux 2 extrémités. Chacun possède une longueur de $77,5 \pm 2,5$ mm, un diamètre intérieur de $21,85 \pm 1,15$ mm, et une paroi de $1,9 \pm 0,9$ mm d'épaisseur. Les tubes sont maintenus en position verticale par 2 plaques, de 90 ± 2 mm de diamètre et $6,75 \pm 1,75$ mm d'épaisseur, percées chacune de 6 trous de 24 ± 2 mm de diamètre, régulièrement espacés et équidistants du centre de la plaque. Sous la plaque inférieure est fixé un treillis métallique en fils d'acier inoxydable de $0,615 \pm 0,045$ mm de diamètre, à tissage simple et mailles carrées de $2,0 \pm 0,2$ mm d'ouverture. Les différentes parties de l'ensemble sont assemblées et maintenues de façon rigide par 3 boulons traversant les 2 plaques. Un dispositif adéquat permet de suspendre l'ensemble au mécanisme moteur par un point situé sur l'axe du porte-tubes.

La configuration de l'appareil peut présenter des variations de détail, sous réserve que les spécifications dimensionnelles des tubes et du treillis métallique soient respectées. Les dimensions sont conformes aux spécifications présentées Figure 59.

Disques. L'utilisation de disques n'est admise que lorsqu'elle est explicitement spécifiée ou autorisée. Chaque tube est alors pourvu d'un disque cylindrique de $9,5 \pm 0,15$ mm d'épaisseur et $20,7 \pm 0,15$ mm de diamètre, constitué d'une matière plastique transparente appropriée possédant une densité de 1,18-1,20. Chaque disque est percé sur toute son épaisseur de 5 trous tubulaires parallèles de $2 \pm 0,1$ mm de diamètre, dont l'un est centré sur l'axe du cylindre et les autres, situés à $6 \pm 0,2$ mm de l'axe, sur des droites imaginaires perpendiculaires à l'axe et parallèles entre elles. La surface latérale des disques comporte 4 encoches trapézoïdales identiques, sensiblement perpendiculaires aux 2 bases du cylindre ; ces encoches ont la forme d'un trapèze symétrique dont les 2 côtés parallèles coïncident avec les bases du cylindre et sont parallèles à une droite imaginaire reliant les centres de 2 trous adjacents situés à 6 mm de l'axe. Le côté du trapèze qui est visible sur la face inférieure du cylindre a une longueur de $1,6 \pm 0,1$ mm et l'arête inférieure est en retrait de 1,5 mm à 1,8 mm de la circonférence du cylindre. Le côté du trapèze qui est visible sur la face supérieure du cylindre a une longueur de $9,4 \pm 0,2$ mm, et son centre est en retrait de $2,6 \pm 0,1$ mm de la circonférence du cylindre. Toutes les surfaces du disque sont lisses.

Si l'emploi de disques est prescrit, placez un disque dans chaque tube puis faites fonctionner l'appareil comme indiqué sous Mode opératoire. Les disques sont conformes aux spécifications dimensionnelles présentées L'usage de disques modifiés en vue d'une détection automatique est permis dans les cas où l'usage de disques est spécifié ou autorisé. Ces disques doivent satisfaire aux exigences de densité et de dimensions indiquées dans ce chapitre.

Mode opératoire

Placez 1 unité de la préparation à examiner dans chacun des 6 tubes du râtelier (Figure 59), puis ajoutez un disque si l'emploi de disques est prescrit. Faites fonctionner l'appareil en utilisant, comme liquide d'immersion, le milieu spécifié maintenu à 37 ± 2 °C. Au temps indiqué, remontez le porte-tubes hors du liquide et examinez l'état des unités soumises à l'essai. Toutes les unités sont complètement désagrégées. Si 1 ou 2 d'entre elles ne sont pas désagrégées, répétez l'essai sur 12 unités supplémentaires. Les exigences de l'essai sont satisfaites si au moins 16 des 18 unités soumises à l'essai sont désagrégées.

Dans le cas des comprimés gastrorésistants, le mode opératoire est modifié comme suit :

Utilisez l'acide chlorhydrique 0,1 M comme milieu liquide. Faites fonctionner l'appareil pendant 2h, sauf exception justifiée et autorisée, sans ajouter de disque. Examinez l'état des comprimés. La durée de résistance en milieu acide varie selon la formulation du comprimé à

examiner. Elle est typiquement de 2h à 3h et n'est jamais inférieure à 1h même compte tenu des dérogations autorisées. Aucun des comprimés ne présente de signes de désagrégation ou de craquelures pouvant amener une perte de matière, à l'exclusion du détachement éventuel de fragments de l'enrobage. Remplacez la solution acide par de la solution tampon phosphate pH 6,8 R et introduisez un disque dans chacun des tubes. Faites fonctionner l'appareil pendant 60min, puis examinez l'état des échantillons. Si les comprimés ne satisfont pas à l'essai en raison de l'adhérence au disque, les résultats sont non valides. Répétez l'essai sur 6 autres comprimés en omettant les disques.

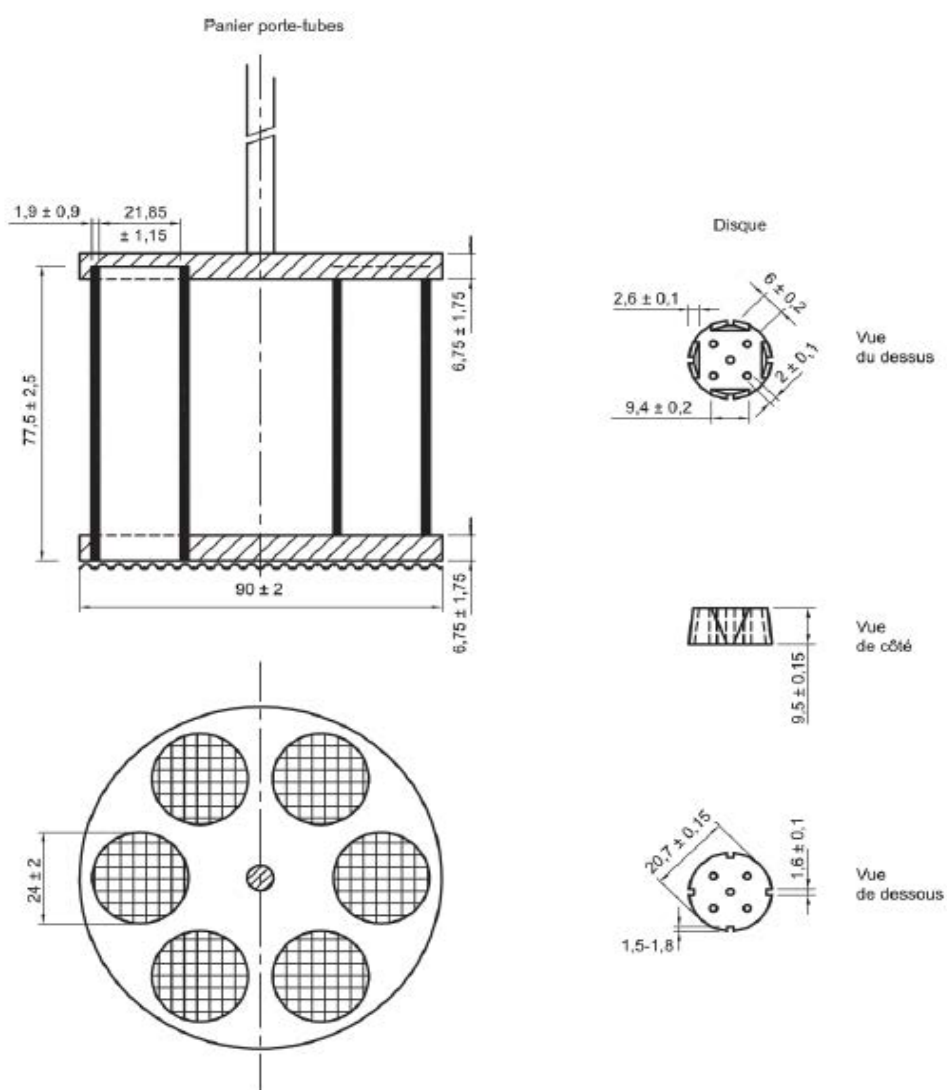


Figure 59. Appareil de désagrégation A. Dimensions en millimètres

Annexe X. Essai de dissolution des formes solides

D'après la Pharmacopée Européenne 9.5 :

Appareil 2 (appareil à palette). L'appareil présente la même configuration que l'appareil 1, sauf que l'élément agitateur est ici une palette constituée d'une pale et d'une tige. La tige est positionnée de telle sorte que son axe ne s'écarte en aucun point de plus de 2mm de l'axe vertical du récipient et que sa rotation soit uniforme et sans oscillation significative susceptible d'affecter les résultats. La pale est insérée sur la tige de façon que leurs axes coïncident et que la surface inférieure de la pale soit exactement de niveau avec l'extrémité de la tige. La palette est conforme aux spécifications de la Figure 60. Une distance de 25 ± 2 mm est maintenue pendant l'essai entre le bord inférieur de la pale et le fond du récipient. La pale et la tige sont en métal ou autre matériau rigide et inerte approprié, et forment un tout. Un système approprié en 2 parties détachables peut toutefois être utilisé à condition que les 2 pièces restent solidement assemblées pendant l'essai. La pale et la tige peuvent être recouvertes d'un placage approprié permettant de les rendre inertes. On laisse la préparation tomber au fond du récipient avant de mettre la palette en rotation. Certaines préparations ayant tendance à surnager peuvent être lestées avec un matériau non réactif, par exemple quelques tours d'hélice d'un fil métallique. D'autres dispositifs peuvent également être utilisés sous réserve de validation.

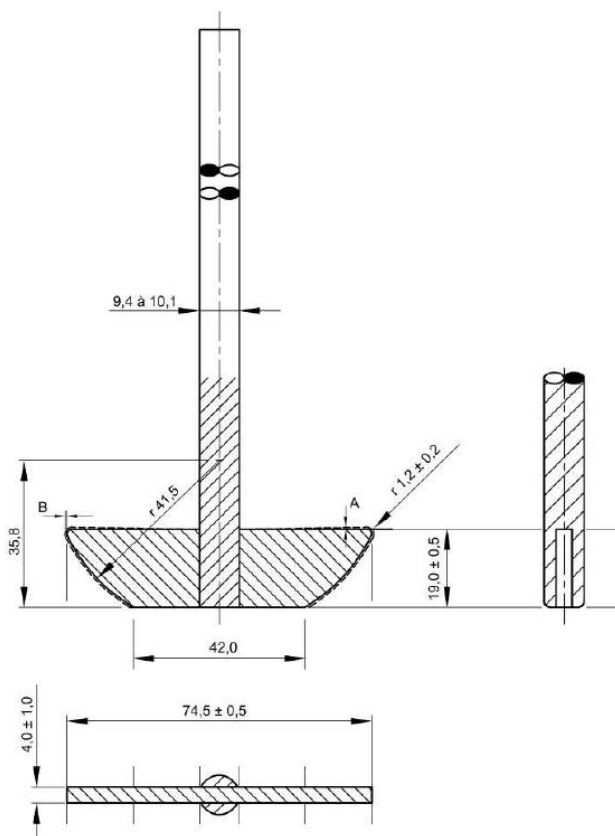


Figure 60. Appareil 2, à palette. Dimensions en millimètres (Les dimensions A et B ne varient pas de plus de 0,5 mm lorsque la palette tourne sur son axe central. Sauf indication contraire, les tolérances sont de $\pm 1,0\text{mm}$).

Dans le cas des essais effectués à pH croissant, l'une des séquences du Tableau 30 peut être utilisée:

Tableau 30. Séquences d'accroissement du pH possibles pour les tampons utilisés lors des essais de dissolution de formes destinées à la voie orale

Temps (h)	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	5 - 6	6 - 7	7
pH	1,0							
pH	1,2	6,8						
pH	1,2	2,5	4,5	7,0		7,5		
pH	1,5	4,5			7,2			

La séquence des variations de pH suivie a été la dernière ligne. La méthode pour obtenir ces variations de pH consisté en l'addition comme décrit ci-après, à une solution initiale de pH 1,5, d'une dose d'un mélange en poudre contenant tris (hydroxyméthyl) aminométhane et de l'acétate de sodium anhydride, de façon à obtenir un pH de 4,5, puis d'une seconde dose de façon à obtenir un pH de 7,2 (Ph. Eur. 9.5):

-Solution chlorhydrique pH 1,5: dissoudre 2g de chlorure de sodium dans de l'eau, ajouter 31,6mL d'acide chlorhydrique 1M et compléter à 1000mL avec l'eau.

-Solution tampon pH 4,5: mélanger 2,28g de tris (hydroxyméthyl) aminométhane et 1,77g d'acétate de sodium anhydride ; dissoudre ce mélange dans la solution chlorhydrique pH 1,5 décrite ci-dessus.

-Solution tampon pH 7,2 : mélanger 2,28g de tris (hydroxyméthyl) aminométhane et 1,77g d'acétate de sodium anhydride ; dissoudre ce mélange dans la solution chlorhydrique pH 4,5 décrite ci-dessus.

Annexe XI. Analyse statistique

Afin de déterminer d'éventuelles différences significatives entre les données expérimentales, celles-ci sont traitées par analyse de variance ANOVA. La variance d'un paramètre choisi est étudiée pour les différents échantillons. Quand la probabilité P est inférieure à 0,05 (seuil de confiance du résultat de 5 %), il existe une différence significative entre les valeurs analysées. Dans ce cas, un test de comparaison multiple des valeurs est réalisé par le test de Tukey à l'aide de logiciel Minitab17.

Annexe XII. Article publié dans AAPS PharmSciTech

AAPS PharmSciTech (© 2017)
DOI: 10.1208/s12249-017-0928-5



Research Article

Soy Protein Microparticles for Enhanced Oral Ibuprofen Delivery: Preparation, Characterization, and *In Vitro* Release Evaluation

Maria Antonieta Anaya Castro,^{1,2} Isabelle Alric,¹ Fabien Brouillet,² Jérôme Peydecastaing,¹ Sophie Girod Fullana,² and Vanessa Durrieu^{1,3,4}

Received 11 September 2017; accepted 25 November 2017

Abstract. The objective of this work was to evaluate soy protein isolate (SPI) and acylated soy protein (SPA) as spray-drying encapsulation carriers for oral pharmaceutical applications. SPI acylation was performed by the Schotten–Baumann reaction. SPA, with an acylation rate of 41%, displayed a decrease in solubility in acidic conditions, whereas its solubility was unaffected by basic conditions. The drug encapsulation capacities of both SPI and SPA were tested with ibuprofen (IBU) as a model poorly soluble drug. IBU-SPI and IBU-SPA particles were obtained by spray-drying under eco-friendly conditions. Yields of 70 to 87% and microencapsulation efficiencies exceeding 80% were attained for an IBU content of 20 to 40% *w/w*, confirming the excellent microencapsulation properties of SPI and the suitability of the chemical modification. The *in vitro* release kinetics of IBU were studied in simulated gastrointestinal conditions (pH 1.2 and pH 6.8, 37°C). pH-sensitive release patterns were observed, with an optimized low rate of release in simulated gastric fluid for SPA formulations, and a rapid and complete release in simulated intestinal fluid for both formulations, due to the optimal pattern of pH-dependent solubility for SPA and the molecular dispersion of IBU in soy protein. These results demonstrate that SPI and SPA are relevant for the development of pH-sensitive drug delivery systems for the oral route.

KEY WORDS: vegetal protein; microencapsulation; oral route; modified release; pH sensitivity.

INTRODUCTION

The oral route is the predominant and preferred drug delivery route, due to several advantages relating to physiological factors, patient compliance and economical production methods (1). Research into innovative drug delivery systems for this route has increased over the last 20 years, largely driven by the growing need for novel drug delivery systems to deal with the many newly developed chemical entities with low solubility or poor permeation characteristics, and the need to improve the delivery of existing drugs (2,3). The development of pH-sensitive formulations is a particularly relevant strategy for protecting both the gastric mucosa and the active pharmaceutical ingredient (API), controlling the delivery of the API to the gastrointestinal tract and as an attractive alternative to coating (better safety

and fewer processing steps). Microencapsulation is one of the most effective methods for drug delivery systems, as it makes it possible to keep the API in an appropriate form in the desired therapeutic range of concentrations, and to optimize drug release (4). Spray-drying is a particularly appropriate technique for microencapsulation. It is the most widely used drying technology in the production of biopharmaceutical formulations, with excellent properties, and it can be used at the industrial scale, as a one-step microencapsulation process (5,6).

The development of effective green or environmentally friendly excipients is a key challenge in pharmaceutical development that has triggered considerable interest in natural polymers, due to their relative abundance, low cost, and biodegradable and eco-friendly profiles (7). Proteins are a biodegradable and biocompatible option with pertinent functional properties for use as encapsulating materials for APIs. Animal proteins have been investigated for several years and have been found to have good solubility characteristics, over a large pH range, and to be flexible; they therefore have good encapsulating properties (8), including for pharmaceutical applications (9,10).

However, given the increasing numbers of vegetarians and people avoiding dietary lactose, together with the need to prevent potential health problems due to contamination (*e.g.*,

¹Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, Toulouse, France.

²CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Faculté de Pharmacie, Toulouse, France.

³LCA, INP-ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31030, Toulouse, France.

⁴To whom correspondence should be addressed. (e-mail: vanessa.durrieu@ensiacet.fr)

bovine spongiform encephalopathy), plant proteins appear to be a more appropriate alternative (11–13), although their potential for use in pharmaceutical applications has yet to be explored. Given its low cost, emulsifying properties, gelling capacity, nutritional and technological properties, soy protein isolate (SPI) is one of the most frequently studied plant proteins and is already widely used as a carrier for food and nutraceutical applications (14–18). However, only a few studies have focused on the use of SPI for API encapsulation and pharmaceutical applications, and even fewer have considered chemical modifications to the protein to modulate its functional properties (19).

In this study, we compared soy protein isolate (SPI) and chemically modified soy protein (acylated, SPA), as spray-drying encapsulation carriers for oral pharmaceutical applications. Acylation, by grafting fatty chains onto the free amino groups of the protein, should modulate its pH sensitivity, significantly decreasing its solubility in acid media, thereby reducing drug release in the stomach, and improving bioavailability and absorption in the intestine. Indeed, the attachment of hydrocarbon chains may modify the charge and structural properties of water-soluble proteins, increasing their hydrophobicity and improving protein affinity for hydrophobic drugs and microencapsulation efficiency (20).

Ibuprofen, a BCS (Biopharmaceutical Classification System) class II molecule, was chosen as the model hydrophobic drug for this study. Ibuprofen (IBU) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) widely used as an analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic agent, with poor solubility in water (21–23). The oral administration of IBU can lead to gastrointestinal side effects, such as gastric erosion, peptic ulcer, and bleeding (24,25). Therefore, there is a need for innovative formulations providing better gastric protection and more rapid release of ibuprofen in the intestine.

The first part of this study involved the acylation of SPI to modulate its pH sensitivity and the characterization of the acylated soy protein (SPA) generated. We then assessed the potential of SPI and SPA for drug encapsulation by spray-drying, for various ibuprofen/protein ratios. Spray-drying conditions were optimized so as to generate ibuprofen-soy protein dried particles in a single step. The microparticles obtained were characterized on the basis of their shape (SEM observations), size (laser granulometry), microencapsulation rate, and efficiency. The *in vitro* release kinetics of IBU were determined in simulated gastrointestinal conditions, at pH 1.2 and pH 6.8 and 37°C. The encapsulated IBU was studied by X-ray diffraction (XRD) and thermogravimetric analysis (TGA).

MATERIALS AND METHODS

Materials

SPI (90% pure) was purchased from Solae Belgium NV (Ieper, Belgium). Ibuprofen (100% pure) was purchased from BASF Corporation (USA). NaOH, 37% HCl, dodecanoyl chloride, acetonitrile (HPLC grade), and pepsin porcine gastric mucosa tested according to European Pharmacopeia 9.2 (Ph. Eur.) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

SPI Characterization

The proximate composition of SPI was determined, including moisture, ash, protein, and lipid contents. Moisture and ash contents were obtained with the standard AOAC methods (26). Ash content was determined gravimetrically, by incineration at 550°C, and moisture content was determined by drying samples to a constant weight at 105°C. Protein content was determined by the Kjeldahl method ($N \times 6.25$) (27) and lipid content by conventional Soxhlet extraction in cyclohexane for 6 h. Total carbohydrate content was determined by subtracting the sum of the moisture, ash, protein, and lipid contents from the total mass (27). Proximate analysis was carried out in triplicate.

The amino acid profile of SPI was determined on a Biochrom 30 amino acid analyzer (Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France).

Acylation of Soy Proteins

Acylated soy protein isolate (SPA) was prepared by the Schotten–Baumann reaction (Fig. 1), as described by Nesterenko *et al.* (28). Dodecanoyl chloride (C_{12}) chains were grafted onto the free terminal amine or lysine groups of SPI. This reaction was performed in water and was catalyzed by sodium hydroxide (pH 10), at 50°C for 180 min, with a NH_2/C_{12} molar ratio of 1/2. The product was lyophilized and stored at 4°C.

The acylation rate (%) was evaluated by determining the number of functional amine groups by the OPA method (29).

Protein Solubility Profile

Protein solubility profile was determined as described by Zheng *et al.* (30). Protein samples (SPI and SPA) were prepared in deionized water (3% w/w) and the pH of the mixture was adjusted to 1.0–10.0 with 4 M NaOH or 4 M HCl, as appropriate. Each sample was stirred for 1 h at 37°C and centrifuged at 10000×g for 15 min (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Germany). The soluble protein content in the supernatant was determined by the Kjeldahl method (triplicate). Protein solubility (S) was calculated as follows:

$$S (\%) = \frac{\text{protein weight in the supernatant}}{\text{total protein weight in solution}} \times 100$$

Microencapsulation Process

Preparation of Protein/Ibuprofen Solutions

Various ratios of SPI or SPA to IBU were tested: 90/10, 80/20, and 60/40. The solutions were prepared as follows: the protein (acylated or not) was dissolved in deionized water (8% w/w) at room temperature, with magnetic stirring. The pH was then adjusted to 8 (with 2 M NaOH) to dissolve ibuprofen, with magnetic stirring for 30 min. The solutions were also stirred mechanically at 500 rpm for 30 min. High-pressure homogenization was carried out with an APV Systems homogenizer (Albertslund, Denmark), at

SPI Microparticles for Oral Ibuprofen Delivery

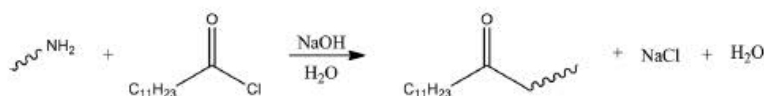


Fig. 1. Acylation *via* Schotten–Baumann reaction

50 MPa with double circulation, and to enhance both the stability of the solution and the encapsulation properties of the proteins (31).

Spray-Drying

A Mini Spray Drier B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland) was used to spray 200 mL of solution under the following conditions: inlet air temperature $120 \pm 4^\circ\text{C}$ and outlet air temperature $74 \pm 4^\circ\text{C}$, drying air flow rate of 470 L/h, liquid feed flow rate of 0.33 L/h, and 100% aspiration. Microparticles were collected and stored at 4°C .

Spray-drying yield (%) was calculated as follows:

$$\text{Spray-drying yield (\%)} = M_p / M_{\text{SP+IBU}} \times 100$$

where M_p is the mass of collected powder and $M_{\text{SP+IBU}}$ is the initial mass of solid content in the solution, including soy protein (acylated or not) and ibuprofen.

HPLC Analysis

Ibuprofen concentration was measured with a HPLC system equipped with a reverse-phase column (Phenomenex Gemini® 5 μm C18 110 Å, 250×4.6 mm) and a precolumn filled with the same phase. The system consists of a Dionex P680 quaternary pump, a Dionex ASI-100 autosampler, an UltiMate 3000 thermostat-controlled column compartment and a Thermo Scientific Ultimate 3000 UV-DAD detector. UV detection was performed at 222 nm. The mobile phase was a 60:40 (*w/w*) mixture of 0.1 M sodium acetate (pH 7) and acetonitrile.

The microparticles (10 mg) were dissolved in 50 mL of mobile phase and sonicated for 10 min, then magnetically stirred for 20 min. All samples were passed through cellulose acetate (CA) filters with 0.45 μm pores and analyzed, in triplicate, by HPLC.

The amount of ibuprofen in the microparticles was determined from a calibration curve (ibuprofen concentration range 0.05–1 mg/mL, in the mobile phase). For the *in vitro* release study, two different ibuprofen calibration curves were used to determine the amount of ibuprofen, depending on pH: pH 1.2 with pepsin (ibuprofen concentration range 0.0005–0.02 mg/mL) and pH 6.8 (ibuprofen concentration range 0.003–0.2 mg/mL).

Microencapsulation Efficiency and Microencapsulation Rate

Microencapsulation efficiency (MEE) and microencapsulation rate (MER) were calculated as follows:

$$\text{MEE} = \text{IBU}_{\text{exp}} / \text{IBU}_{\text{theo}} \times 100$$

where IBU_{exp} is the amount of ibuprofen in microparticles, determined by HPLC, and IBU_{theo} is the amount of ibuprofen theoretically introduced in the initial solutions.

$$\text{MER} = m_{\text{IBU}} / m_m \times 100$$

where m_{IBU} is the estimated mass of ibuprofen in the microparticles and m_m is the mass of the analyzed microparticle sample.

Microparticle Characterization

Microparticle Size Distribution

Microparticle volume diameters ($D_{4,3}$) were determined by laser diffractometry with a Sirocco 2000 apparatus (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), using a refractive index of 1.52 and a dispersion air pressure of 4 bars.

Morphology

The morphology (internal and external) of the microparticles was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) with a LEO435VP scanning electron microscope (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) operating at 10 kV. The microparticles were deposited on conductive double-faced adhesive tape and sputter-coated with silver.

In Vitro Release Kinetics

Drug release experiments were conducted with models SPI/IBU (90/10) and SPA (90/10). The studies were performed under sink conditions, in flow-through cells (Sotax CE6), as recommended by the European Pharmacopeia 9.2 (Ph. Eur.). Simulated gastrointestinal fluids (SGF and SIF) were used in the closed system (300 or 100 mL of dissolution media, at pH 1.2 to simulate gastric conditions and pH 6.8 to simulate conditions in the intestine). The dissolution media were prepared as recommended by Ph. Eur.: simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2, with 0.32% pepsin (*w/v*), and simulated intestinal fluid (SIF) at pH 6.8. The cells were maintained at 37°C , under a constant flow rate of 8 mL/min. Drug release was followed by sampling 1 mL ($n=3$) of the medium, at predefined time intervals, for up to 2 h. After each sampling, 1 mL of pure medium was added in order to maintain sink conditions. The amount of drug released at each time point was determined by the HPLC-UV method described above.

X-ray Diffraction

The powder crystallinity of ibuprofen, SPI, SPA, microparticles, and physical mixtures was assessed by X-ray powder diffraction (EQUINOX 1000, France) at room temperature with a Co target at 30 mA and 30 kV, in the region of $5^\circ \leq 2\theta \leq 40^\circ$, with an angular increment of $0.02^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ (32).

Thermogravimetric Analysis

TGA of ibuprofen, and ibuprofen/protein physical mixtures and microparticles was carried out with an ATG/ETD Q600 from TA Instruments (Newcastle, USA) at a linear heating rate of 10°C/min, under air flow, from 20 to 600°C.

Statistical Analysis

All analyses were carried out in triplicate and the data collected were analyzed by one-way ANOVA with a confidence level of 0.95 and Tukey-Kramer multiple mean comparisons in the MINITAB Release 17 statistical package (Minitab Inc., USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Before chemical modification and evaluation, the composition of SPI was determined, to check that acylation was feasible.

SPI Composition

SPI was found to consist predominantly of protein (87.6%), but it also contained 0.4% lipids, 5.3% ash, 1.4% carbohydrates, and 5.4% moisture. Its amino acid composition (Fig. 2) was determined. The protein chains consisted essentially of 17 amino acids, with two amino acids, glutamic acid (17.8%), and aspartic acid (11.6%), predominating, a feature characteristic of plant proteins (15). The high levels of carboxyl groups in these plant proteins should confer good solubility in basic conditions. SPI also contained relatively high levels of lysine (6.3%), within the normal range for the proteins of leguminous plants (33). The amino group of lysine can take part in various chemical reactions involving the formation of amino bonds. SPI is, therefore, particularly suitable for chemical modifications, such as acylation.

SPI Acylation

SPI was acylated with dodecanoyl chloride, a cheap, biosourced reagent, which has been shown to improve the encapsulation properties of SPI more effectively than

octanoyl and hexadecanoyl chlorides (28). A $\text{NH}_2/\text{C}_{12}$ molar ratio of 1/2 was used to obtain a sufficiently high acylation ratio (41%).

The attachment of alkyl chains should increase the surface hydrophobicity of the protein chains, and greater amphiphilicity induced should have an impact on protein solubility and protein/drug interactions. The efficiency of this chemical modification was checked by comparing SPI and SPA solubility profiles.

SPI and SPA pH Solubility Profiles

The pH solubility profiles of SPI and SPA were compared (Fig. 3). The pH sensitivity of proteins is determined by the presence of acidic and basic groups in their amino acid chains, which groups can accept or release protons, depending on the pH of the medium (34). The solubility curve of SPI was U-shaped, like those of most plant proteins. Both proteins had a minimal solubility around pH 4–5, corresponding to their isoelectric point. At lower pH values, the protonation of amino groups increased SPI solubility, whereas acylation, which decreased the number of available lysine cationic ammonium groups, prevented this phenomenon (35). At pH values above 6, the carboxylic groups of glutamic and aspartic acids were in their sodium carboxylate form, increasing the solubility of both proteins. In basic conditions (pH 8–10), the solubility profiles of the two proteins were similar, with about 60% solubility, sufficient for effective microencapsulation (28), although SPA appeared to be slightly less soluble than SPI, probably due to the presence of lipophilic fatty chains.

These results demonstrate the efficacy of the chemical strategy developed: acylation greatly decreases protein solubility in acidic conditions, without significantly modifying the maximal solubility in basic conditions.

Both SPI and SPA have been tested as potential carriers for encapsulating IBU *via* spray-drying, in optimized experimental conditions (28).

Microencapsulation Results

The properties of loaded spray-dried microparticles are presented in Table I.

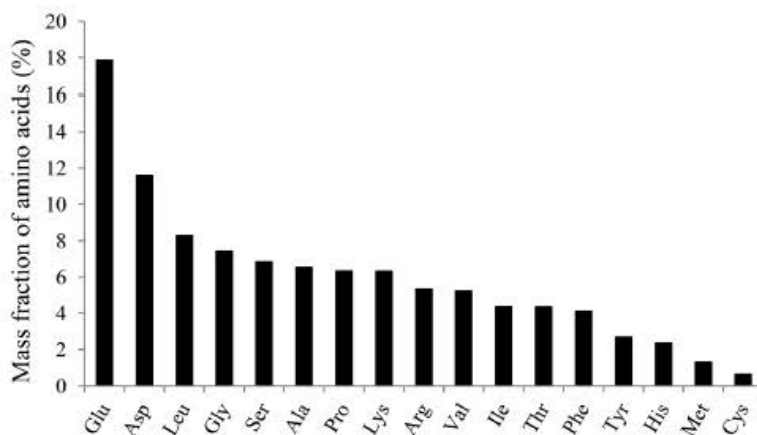


Fig. 2. Amino acid composition of soy protein isolate

SPI Microparticles for Oral Ibuprofen Delivery

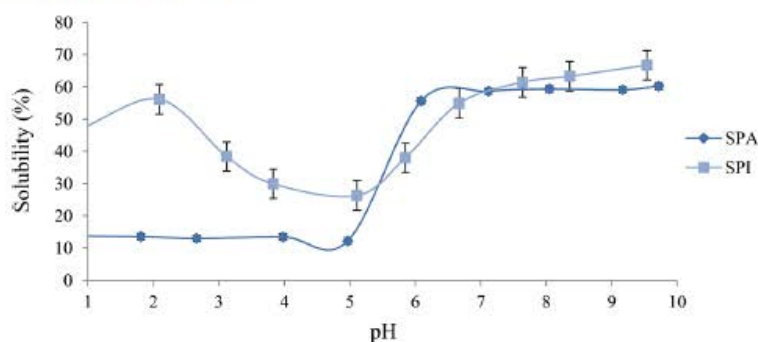


Fig. 3. Solubility profiles of SPI and SPA at 3% w/w and 37°C

Spray-drying yields of 70 to 87% were obtained. These values are higher than those previously reported for microencapsulation with plant proteins, ranging from 50 to 70% (28,36). The spray-drying yields obtained in this study, reaching a maximum of 80%, even for high ibuprofen ratios, are very promising in terms of the industrial feasibility of this process.

High MEE values (systematically greater than 80%) were obtained for both proteins and for all soy protein/IBU ratios, confirming the excellent microencapsulation properties of SPI and the suitability of the chemical modification based on acylation. However, SPI- and SPA-loaded microparticles behaved differently.

For SPI-loaded microparticles, an increase in the proportion of IBU (SPI/IBU ratio changing from 90/10 to 60/40) leads to a decrease in MEE from 92 to 82%. Similar results were reported in several previous studies on SPI (37,38), and on other natural polymers, such as modified starch (39). In these studies, the decrease in MEE was explained principally by an increase in total solid content. In this study, increase in the proportion of ibuprofen also resulted in a higher total solid content. However, the decrease in MEE may also be related to the hydrophobicity of ibuprofen, preventing effective protection by SPI when the protein/IBU ratio was too low (high amount of IBU).

By contrast, MEE increased with decreasing SPA/IBU ratio, reaching 94% for SPA microparticles with a SPA/IBU ratio of 60/40. The grafting of hydrophobic hydrocarbon

chains onto the protein probably enhanced the affinity of the acylated proteins for the hydrophobic core, even for high ibuprofen contents. Previous studies reported similar results (36,40), for various plant proteins, from soy, sunflower, and rapeseed, for example, confirming the suitability of acylation for improving the encapsulation properties of plant proteins.

Microparticle moisture content was between 1.4 and 3.7%, ensuring microbiological stability (41). The SPI-loaded microparticles had a higher moisture content than the SPA-loaded microparticles, due to the greater hygroscopy of unmodified proteins. Similarly, highly loaded microparticles had a lower moisture content, due their higher content of ibuprofen, a hydrophobic drug.

Microparticles were between 3.5 and 5.8 μm in diameter, except for the SPI 60/40 sample, for which some aggregates were observed, making it difficult to determine the size of the microparticles correctly. These values are consistent with those expected for spray-dried microspheres (31).

Morphology

The morphology of the microparticles was observed by SEM. Some representative micrographs are displayed in Fig. 4. The powder consisted of spherical particles with a smooth surface, without fissures or cracks, which protected the ibuprofen well. An uneven shrinkage of the microparticles was observed, and such shrinkage is generally

Table I. Properties of Loaded Spray-Dried Microparticles

Soy protein/ibuprofen (% w/w)	Spray-drying yield (%)	MEE (%) ^a	MER (%) ^a	Microparticle size ($D_{4,3}$) Mm	Moisture content of microparticles (%)
SPI	80	–	–	5.0 \pm 0.1 ^{bc}	5.1 \pm 0.1 ^a
SPA	ND	–	–	4.2 \pm 0.1 ^{bc}	3.5 \pm 0.3 ^b
SPI 90/10	82	92.6 \pm 9.3 ^a	9.3 \pm 0.9 ^d	3.5 \pm 0.2 ^c	3.7 \pm 0.1 ^b
SPI 80/20	87	84.1 \pm 3.6 ^a	16.8 \pm 0.7 ^c	4.4 \pm 0.3 ^{bc}	2.3 \pm 0.1 ^e
SPI 60/40	80	81.9 \pm 2.8 ^a	32.6 \pm 1.1 ^b	19.1 \pm 2.0 ^a	3.2 \pm 0.1 ^c
SPA 90/10	70	87.4 \pm 3.7 ^a	8.7 \pm 0.4 ^d	4.3 \pm 0.1 ^{bc}	3.7 \pm 0.1 ^b
SPA 80/20	81	86.6 \pm 4.5 ^a	17.3 \pm 0.9 ^c	4.5 \pm 0.1 ^{bc}	2.8 \pm 0.1 ^d
SPA 60/40	87	93.9 \pm 10.2 ^a	37.6 \pm 4.1 ^a	5.8 \pm 0.1 ^b	1.4 \pm 0.1 ^f

Superscripts with the same letters in the same column were not significantly different $P > 0.5$ (Tukey-Kramer multiple mean comparisons)

ND not determined

^aDetermined by HPLC

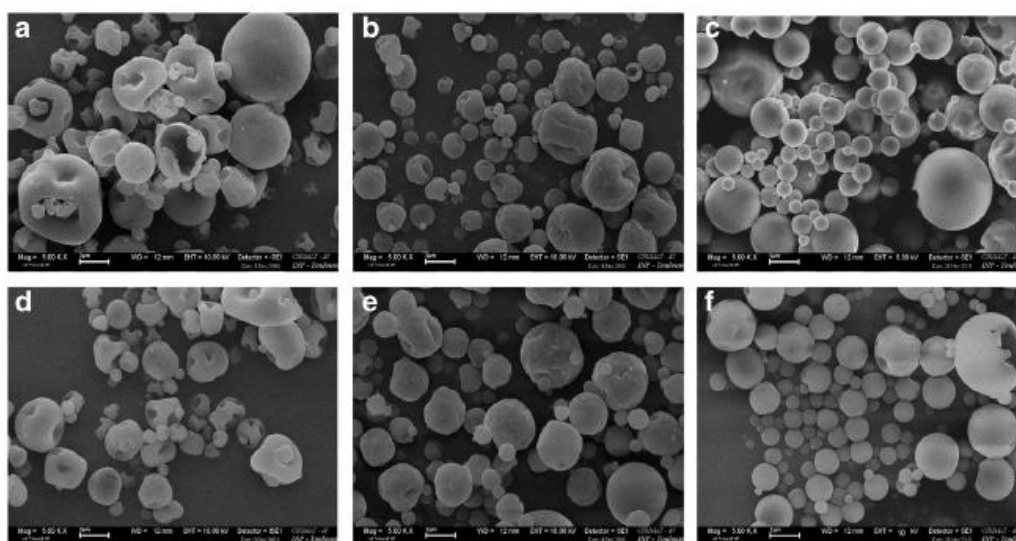


Fig. 4. Scanning electron micrographs of microparticles. a SPI microparticles. b SPI/IBU 80/20. c SPI/IBU 60/40. d SPA. e SPA/IBU 80/20. f SPA/IBU 60/40. Magnification of $\times 5000$, scale bars $2 \mu\text{m}$

associated with the drying and/or cooling step(s) (37). The external structure had wrinkled surface, typical of spray-dried microparticles with a high protein content (42), but no significant differences according to the protein or ibuprofen/protein ratio were observed. The internal structure revealed no evident porosity in the matrices, but thinner shells were observed for highly loaded microparticles (60/40 protein/IBU ratio). Moreover, no free drug crystals were observed even for high IBU encapsulation rates.

The size of the microspheres, from 1 to $9 \mu\text{m}$, confirmed the values obtained by laser granulometry.

In Vitro Release Studies

IBU, a BCS (Biopharmaceutical Classification System) class II molecule, was chosen as the model drug for encapsulation in SPI and SPA microparticles. The absorption of BCS class II drugs (characterized by low solubility in water and high permeation) can be significantly improved by optimizing the formulation so as to ensure that the drug

remains solubilized at the absorption site (43). This study investigated whether SPI and SPA could be used to improve the delivery of this poorly soluble drug with gastric side-effects.

The effect of encapsulation in SPI and SPA microparticles on the solubility of ibuprofen was assessed in dissolution studies performed *in vitro* in sink conditions, with SPI and SPA microparticles loaded with various amounts of IBU (from 10 to 40%) in USP buffers at pH 1.2 or 6.8 USP, for 2 h at 37°C . The dissolution profiles of IBU in two ibuprofen-loaded preparations, SPI 90/10 and SPA 90/10, are presented in Fig. 5. IBU release kinetics varied considerably with the pH of the medium.

In acidic conditions (*i.e.*, in simulated gastric fluid (SGF)) in the presence of a gastric enzyme (pepsin), a slow release profile was obtained for the IBU encapsulated in microparticles of SPA or SPI, with 28.0 ± 4.3 and $42.8 \pm 4.4\%$ IBU release, respectively, within the first hour. Significantly less IBU was released from the SPA 90/10 formulation than from the SPI 90/10 formulation ($p < 0.05$).

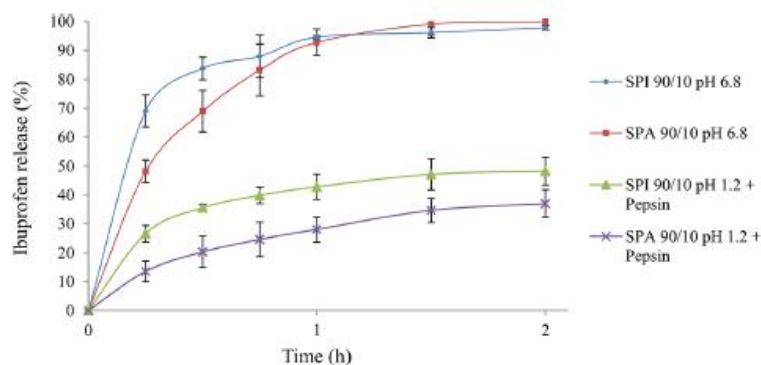


Fig. 5. Ibuprofen release kinetics with SPI and SPA (at 90/10 ratio) in simulated gastric fluid (SGF) at pH 1.2 with pepsin and simulated intestinal fluid at pH 6.8 (SIF)

SPI Microparticles for Oral Ibuprofen Delivery

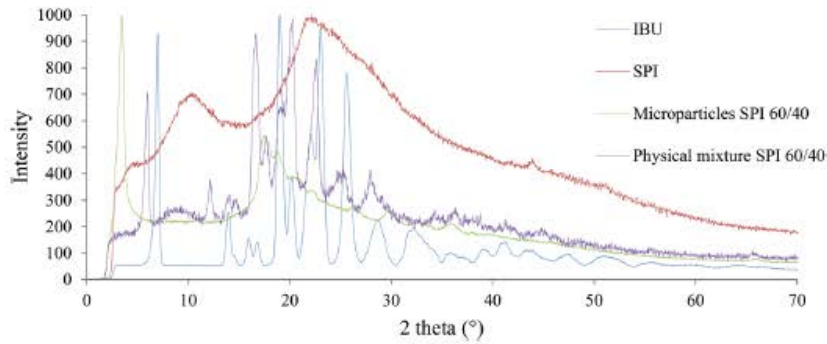


Fig. 6. DR-X patterns of ibuprofen, SPI, microparticles, and physical mixture of SPI/IBU 60/40

These results may be considered to reflect the pH sensitivity of SPI and SPA. Based on solubility data, pH had a significant effect on drug release from IBU-loaded SPI and SPA microspheres. Below the isoelectric point of SPI and SPA (pH=4.5–5), the conformation of the protein chain resulted in a compact, shrunken structure and low release rate. This effect was particularly marked for SPA, which insolubility in acidic conditions was enhanced by acylation. In such conditions, the observed release was probably due to drug diffusion, as already reported for whey proteins (44). However, the observed release levels were higher than expected in SGF, as release was evaluated in the presence of pepsin, a proteolytic enzyme. In this context, the release mechanism involved a combination of diffusion and erosion, for which the rate of release depends on protein content (data not shown). This phenomenon was limited in our case, as pepsin preferentially cleaves the peptide bonds of aromatic amino acids (histidine, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine) (34), of which there are very few in SPI, as shown in Fig. 2. The pH sensitivity of SPI and SPA made it possible to obtain pH-sensitive profiles of IBU release kinetics compatible with the oral administration of this drug.

In neutral conditions (*i.e.*, in simulated intestinal fluid (SIF) without enzymes), the release rates were faster, with almost 100% of the IBU released within 90 min for both SPA and SPI (99.1 ± 3.9 and $96.1 \pm 1.8\%$, respectively). At pH 6.8, the 90/10 ratio curves for SPA and SPI were similar, with a release of at least 50% of the encapsulated IBU within the

first 30 min. These results for SIF may be partly explained by the solubility of SPI and SPA, and, thus, the dissolution of particles at pH 6.8, but remain surprising for a poorly soluble crystalline drug as IBU.

We decided to explore the interactions of IBU with SPI and SPA, which may have a major influence on drug solubility or thermal stability, and, consequently, on drug delivery performance and bioavailability.

The possible interaction between the drug (IBU) and the carrier (SPI and SPA) was investigated, with a view to explaining the results for dissolution in SIF, by characterizing the prepared microparticles, ibuprofen alone, and physical mixtures, by XRD and TGA. An absence of characteristic peaks/transitions of the drug after processing or a shifting of those peaks, on the XRD pattern or the TGA thermogram, indicates changes in the characteristics of the drug or the possibility of drug-carrier interactions (45).

X-ray Diffraction

The X-ray diffraction patterns of IBU were compared with those of IBU-SPI or IBU-SPA physical mixtures and microparticles, for each protein/IBU ratio tested. The X-ray diffraction patterns of IBU, SPI, and of the 60/40 SPI/IBU physical mixture and microparticles are presented in Fig. 6. The powder X-ray diffractogram of IBU has sharp peaks at diffraction angles $2\theta = 6^\circ$, 16° , 17° , 19° , 20° , and 22° , showing a typical crystalline pattern (23). SPI powder was semicrystalline, with two major peaks (32).

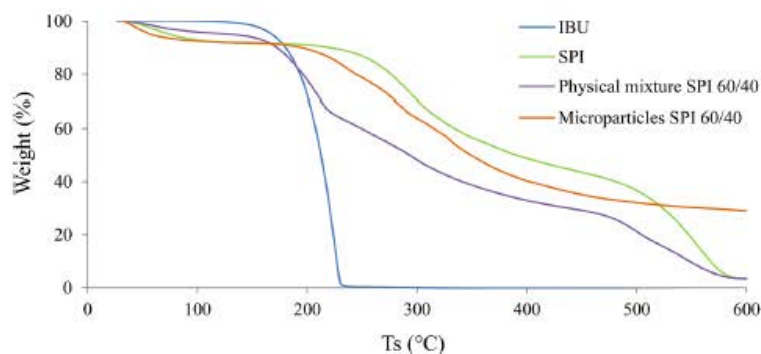


Fig. 7. TGA curves of IBU, SPI, physical mixture, and microparticles of SPI/IBU 60/40

All the major characteristic crystalline peaks of IBU were also observed in the physical mixture, but were barely detectable in microparticles, suggesting that the IBU was present in an amorphous state in the microparticles. Similar results were reported for IBU encapsulation with gelatin by spray-drying (32) or riboflavin encapsulation with soy/zein protein (15). Our results suggest that the combination of soy protein and spray-drying led to a change in the crystallinity state of IBU, from a crystalline to an amorphous form. Similar behavior was observed for SPA, confirming that acylation has no impact on the encapsulation properties of soy protein at neutral pH.

Spray-drying is one of the most widely used solvent evaporation procedures in the production of solid dispersions and it often produces amorphous materials (46,47). The amorphous solid state has the advantage of greater solubility and, therefore, faster dissolution rates than crystalline material, as no energy is required to break up the crystal lattice during the dissolution process (48). This, together with the solubility of SPI and SPA at neutral pH, may account for the better dissolution of encapsulated IBU in SIF. This change in crystalline state should increase the oral bioavailability of IBU, by facilitating rapid absorption in the intestine (45).

Thermal Analysis

In addition to XRD, we also performed TGA studies. TG mass loss curves were generated for IBU, SPI, and SPI/IBU physical mixtures and microparticles with a 60/40 ratio of protein to IBU (Fig. 7). Similar behavior was observed for both proteins and for higher protein/IBU ratios. Ibuprofen degradation occurred at about 170°C, with complete decomposition at 230°C. Protein degradation did not start until 210°C for SPA, and 250°C for SPI, with mass loss maximal (up to 70%) between 220 and 450°C, as generally observed for plant proteins (28,36).

The small loss of mass observed at around 100°C on all curves (other than that for IBU alone) can be attributed to the evaporation of the residual water molecules present in plant proteins (SPI and SPA).

A comparison of the curves for physical mixtures and microparticles demonstrated the efficacy of IBU protection by spray-drying encapsulation. Indeed, thermal degradation began at 170–175°C for physical mixtures, but not until 220°C for microparticles, confirming the improvement in the thermal stability of IBU conferred by this microencapsulation process.

CONCLUSION

The results presented here demonstrate the suitability of SPI and SPA as encapsulating materials for API by spray-drying, particularly for delayed release oral applications. Their advantages include pH sensitivity, the possibility of incorporating high proportions of drug (up to 40%), and excellent encapsulation efficiencies (greater than 80%). The acetylation of SPI considerably decreases its sensitivity to enzymes and acidity and, thus, greatly decreases drug release in acidic conditions (simulated gastric fluid). Furthermore, an amorphous molecular dispersion of IBU was obtained, improving the thermal stability of the drug and resulting in its rapid dissolution at neutral pH (simulated intestinal fluid).

Thus, SPI and SPA are promising excipients for the development of hydrophobic drug delivery systems for the oral route.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Mexican Council of Science CONACYT for providing financial support, Yannick Thebault and Cédric Charvillat from CIRIMAT for SEM and XRD analyses, and Christine Rey-Rouch from LGC for TGA analyses.

REFERENCES

- Chen S, Guo F, Deng T, Zhu S, Liu W, Zhong H, *et al.* Eudragit S100-coated chitosan nanoparticles co-loading tat for enhanced oral colon absorption of insulin. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(4):1277–87. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0594-z>.
- Bosselmann S, Williams RO III. Route-specific challenges in the delivery of poorly water-soluble drugs. *Formulating poorly water soluble drugs.* Berlin: Springer; 2012. p. 1–26.
- O'Donnell KP, Williams RO III. Optimizing the formulation of poorly water-soluble drugs. *Formulating poorly water soluble drugs.* Berlin: Springer; 2012. p. 27–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1144-4_2.
- Mehta S, Kaur G, Verma A. Fabrication of plant protein microspheres for encapsulation, stabilization and in vitro release of multiple anti-tuberculosis drugs. *Colloids Surf A.* 2011;375(1):219–30. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.014>.
- Georgetti SR, Casagrande R, Souza CRF, Oliveira WP, Fonseca MJV. Spray drying of the soybean extract effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 2008;41(8):1521–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.001>.
- Ameri M, Maa Y-F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Dry Technol.* 2006;24(6):763–8. <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>.
- Ogaji JJ, Nep EI, Audu-Peter JD. Advances in natural polymers as pharmaceutical excipients. *Pharm Analytical Acta.* 2012;3(1):1–16.
- Can Karaca A, Low NH, Nickerson MT. Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods. *Trends Food Sci Technol.* 2015;42(1):5–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.002>.
- Bruschi ML, Cardoso MLC, Lucchesi MB, Gremião MPD. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *Int J Pharm.* 2003;264(1–2):45–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00386-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00386-7).
- Hsein H, Garrat G, Mumin MA, Beyssac E, Hoffart V. Atomization of denatured whey proteins as a novel and simple way to improve oral drug delivery system properties. *Int J Biol Macromol.* 2017;105(Pt 1):801–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.114>.
- Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Ind Crop Prod.* 2013;42(0):469–79. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>.
- Reddy N, Yang Y. Potential of plant proteins for medical applications. *Trends Biotechnol.* 2011;29(10):490–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.003>.
- Tang C-H, Li X-R. Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Res Int.* 2013;52(1):419–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.010>.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int.* 2007;40(9):1107–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

SPI Microparticles for Oral Ibuprofen Delivery

15. Chen L, Subirade M. Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules*. 2009;10(12):3327–34. <https://doi.org/10.1021/bm900989y>.
16. González-Ferrero C, Irache J, González-Navarro C. Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance. *Food Chem*. 2018;239:879–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.022>.
17. Hadzieva J, Mladenovska K, Crcarevska MS, Dodov MG, Dimchevska S, Geškovski N, et al. *Lactobacillus casei* encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying. *Food Technol Biotechnol*. 2017;55(2):173–86. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4991>.
18. Tang Z-X, Liang J-Y. Use of soy protein-based carriers for encapsulating bioactive ingredients. *Soy protein-based blends, composites and nanocomposites*. Hoboken: Wiley; 2017. p. 231–49.
19. Caillard R, Petit A, Subirade M. Design and evaluation of succinylated soy protein tablets as delayed drug delivery systems. *Int J Biol Macromol*. 2009;45(4):414–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.06.013>.
20. Lazko J, Popineau Y, Legrand J. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids Surf B*. 2004;37(1–2):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.06.004>.
21. Abraham P, Indirani K, Desigamani K. Nitro-arginine methyl ester, a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase reduces ibuprofen-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci*. 2005;50(9):1632–40. <https://doi.org/10.1007/s10620-005-2908-y>.
22. Wood DM, Monaghan J, Streete P, Jones AL, Dargan PL. Fatality after deliberate ingestion of sustained-release ibuprofen: a case report. *Crit Care*. 2006;10(2):R44. <https://doi.org/10.1186/cc4850>.
23. Liu Y, Wang X, Liu Y, Di X. Thermosensitive in situ gel based on solid dispersion for rectal delivery of ibuprofen. *AAPS PharmSciTech*. 2017; <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0839-5>.
24. Yang L, Zhang B, Yi J, Liang J, Liu Y, Zhang L-M. Preparation, characterization, and properties of amylose-ibuprofen inclusion complexes. *Starch - Stärke*. 2013;65(7–8):593–602. <https://doi.org/10.1002/star.201200161>.
25. Tamilvanan S, Sa B. In vitro and in vivo evaluation of single-unit commercial conventional tablet and sustained-release capsules compared with multiple-unit polystyrene microparticle dosage forms of ibuprofen. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(3):E126–E34. <https://doi.org/10.1208/pt070372>.
26. International A. Official methods of analysis of AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 1995;Volume II.
27. Yew S-E, Lim T-J, Lew L-C, Bhat R, Mat-Easa A, Liong M-T. Development of a probiotic delivery system from agrowastes, soy protein isolate, and microbial transglutaminase. *J Food Sci*. 2011;76(3):H108–H115. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02107.x>.
28. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -tocopherol microparticle preparation. *Food Res Int*. 2012;48(2):387–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.023>.
29. Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins I. *J Dairy Sci*. 1983;66(6):1219–27. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2).
30. Zheng H-G, Yang X-Q, Tang C-H, Li L, Ahmad I. Preparation of soluble soybean protein aggregates (SSPA) from insoluble soybean protein concentrates (SPC) and its functional properties. *Food Res Int*. 2008;41(2):154–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.013>.
31. Sharif HR, Williams PA, Sharif MK, Abbas S, Majeed H, Masamba KG, et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants—a review. *Food Hydrocoll*. 2017; <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.002>.
32. Li DX, Oh Y-K, Lim S-J, Kim JO, Yang HJ, Sung JH, et al. Novel gelatin microcapsule with bioavailability enhancement of ibuprofen using spray-drying technique. *Int J Pharm*. 2008;355(1–2):277–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.020>.
33. Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci*. 2001;66(5):642–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>.
34. Maltais A, Remondetto GE, Subirade M. Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. *Food Hydrocoll*. 2009;23(7):1647–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.006>.
35. Gruener L, Ismond M. Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the canola 12S globulin. *Food Chem*. 1997;60(4):513–20. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00016-2).
36. Wang Z, Ju X, He R, Yuan J, Wang L. The effect of rapeseed protein structural modification on microstructural properties of peptide microcapsules. *Food Bioprocess Technol*. 2015;8(6):1305–18. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1472-5>.
37. Deng XX, Chen Z, Huang Q, Fu X, Tang CH. Spray-drying microencapsulation of β -carotene by soy protein isolate and/or OSA-modified starch. *J Appl Polym Sci*. 2014;131(12):40399.
38. Tang C-H, Li X-R. Microencapsulation properties of soy protein isolate: influence of preheating and/or blending with lactose. *J Food Eng*. 2013;117(3):281–90. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.018>.
39. Rocha GA, Fávoro-Trindade CS, Grosso CRF. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food Bioprod Process*. 2012;90(1):37–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.001>.
40. Nesterenko A, Alric I, Violleau F, Silvestre F, Durrieu V. The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. *Food Hydrocoll*. 2014;41(0):95–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.017>.
41. Mendanha DV, Ortiz SEM, Favaro-Trindade CS, Mauri A, Monterrey-Quintero ES, Thomazini M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Res Int*. 2009;42(8):1099–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>.
42. Liu F, Chen Z, Tang C-H. Microencapsulation properties of protein isolates from three selected *Phaseolus* legumes in comparison with soy protein isolate. *LWT-Food Sci Technol*. 2014;55(1):74–82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.008>.
43. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci*. 2006;29(3–4):278–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.016>.
44. Hsein H, Garrait G, Tamani F, Beyssac E, Hoffart V. Denatured whey protein powder as a new matrix excipient: design and evaluation of mucoadhesive tablets for sustained drug release applications. *Pharm Res*. 2017;34(2):365–77. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2067-1>.
45. Zheng H, Zhou Z, Chen Y, Huang J, Xiong F. pH-sensitive alginate/soy protein microspheres as drug transporter. *J Appl Polym Sci*. 2007;106(2):1034–41. <https://doi.org/10.1002/app.26725>.
46. Patel BB, Patel JK, Chakraborty S, Shukla D. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharm J*. 2015;23(4):352–65.
47. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today*. 2007;12(23):1068–75. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.09.005>.
48. Duarte I, Temtem M, Gil M, Gaspar F. Overcoming poor bioavailability through amorphous solid dispersions. *Ind Pharm*. 2011;30:4–6.

Annexe XIII. Publications et communications scientifiques**Communications orales internationales**

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, S. Girod Fullana, V. Durrieu. Modified soy protein microparticles of ibuprofen for oral controlled delivery, **12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries** (Gand, Belgique, Mai 2016).

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, S. Girod Fullana, V. Durrieu. Modified soy protein as encapsulate excipient in pharmaceutical applications, **253rd ACS National Meeting** (San Francisco, California, Avril 2017).

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, S. Girod Fullana, V. Durrieu. Design and evaluation of modified soy protein microparticles for oral controlled drug delivery, **International Symposium on Green Chemistry 2017** (La Rochelle, France, Mai 2017).

Communications internationales par affiche avec comité de lecture

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, S. Girod Fullana, V. Durrieu. Design and evaluation of modified soy protein microparticles for oral controlled delivery of hydrophobic drugs, **10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology** (Glasgow, Écosse, Avril 2016).

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, S. Girod Fullana, V. Durrieu. Design and evaluation of modified soy protein microparticles for oral controlled delivery of hydrophobic drugs, **IXèmes Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Matière** (Toulouse, France, Mai 2016).

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, S. Girod Fullana, V. Durrieu. Design and evaluation of modified soy protein microparticles for oral controlled delivery of hydrophobic drugs, **33e Club Emulsion** (Castres, France, Octobre, 2016).

Publications avec comité de lecture

M. A. Anaya-Castro, J. F. Ayala-Zavala, L. Muñoz-Castellanos, L. Hernández-Ochoa, J. Peydecastaing & Durrieu, V. (2017). β -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging and Shelf Life*, 14(Part B), 96-101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.09.002>

M. A. Anaya-Castro, I. Alric, F. Brouillet, J. Peydecastaing, S. Girod Fullana, V. Durrieu, (2017). Soy Protein Microparticles for Enhanced Oral Ibuprofen Delivery: Preparation, Characterization and *In Vitro* Release Evaluation. *AAPS PharmSciTech*: 1-9. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0928-5>

Optimisation de la pH-sensibilité de protéines végétales en vue d'améliorer leurs capacités d'encapsulation de principes actifs destinés à la voie orale

Doctorat de l'Université de Toulouse – 21 février 2018 – Maria Antonieta ANAYA-CASTRO

RÉSUMÉ

Dans le domaine pharmaceutique, la voie orale demeure la voie d'administration de prédilection, car plus simple et mieux acceptée par les patients. Cependant, ce mode d'administration pose problème pour de nombreux principes actifs (PA) présentant une faible solubilité, une faible perméabilité et/ou une instabilité dans l'environnement gastro-intestinal. Leur microencapsulation dans des matrices polymériques peut permettre d'y répondre, notamment si les microparticules générées résistent aux environnements rencontrés lors du tractus gastro-intestinal et jouent alors un rôle protecteur, tant pour le principe actif que pour les muqueuses rencontrées. La recherche de nouveaux excipients, issus des agro-ressources tels que les polymères naturels, est en plein essor. Les protéines végétales, grâce à leurs propriétés fonctionnelles telles qu'une bonne solubilité, une viscosité relativement basse, et des propriétés émulsifiantes et filmogènes, représentent des candidats privilégiés. De plus, la grande diversité de leurs groupements fonctionnels permet d'envisager des modifications chimiques ou enzymatiques variées.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'intérêt de la protéine de soja en tant que matériau enrobant de principes actifs pharmaceutiques destinés à la voie orale, et plus particulièrement en tant que candidat pour l'élaboration de formes gastro-résistantes. Un isolat protéique de soja (SPI) été utilisé comme matière enrobante et l'atomisation comme procédé. L'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien, a été choisi comme molécule modèle du fait de sa faible solubilité nécessitant une amélioration de sa biodisponibilité, et de ses effets indésirables gastriques nécessitant une mise en forme entérique. Deux modifications chimiques des protéines (l'acylation et la succinylation) ont été étudiées dans le but de modifier la solubilité de la protéine de soja. Ces modifications ont été effectuées dans le respect des principes de la Chimie Verte, notamment en absence de solvant organique. Les microcapsules obtenues par atomisation ont été caractérisées en termes de taux et efficacité d'encapsulation, morphologie et distribution de tailles des particules, état physique du PA encapsulé et capacité de libération en milieu gastrique et intestinal simulé. Les résultats obtenus ont permis de valider l'intérêt des modifications chimiques de la protéine de soja pour moduler les cinétiques de libération d'actif. Les modifications chimiques sont apparues particulièrement adaptées pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes, et ont permis de l'obtention de cinétiques de libération d'ibuprofène ralenties à pH acide (gastrique). La dernière partie de ce travail a permis de valider cette dernière hypothèse par la réalisation de formes gastro-résistantes sur le modèle des comprimés MUPS (multiple unit pellet system). Les résultats de ce travail exploratoire démontrent que les protéines de soja, associées à un procédé de mise en forme multi-particulaire couplé à de la compression directe, peuvent constituer une alternative biosourcée, respectueuse de l'environnement (manipulation en solvant aqueux, temps de séchage et étapes de compression réduits) et sûre à l'enrobage utilisé dans les formes gastro-résistantes traditionnelles.

Mots-clés: microencapsulation, protéines de soja, excipient vert, atomisation, fonctionnalisation, acylation, succinylation, voie orale, libération retardée, microparticules, comprimés, ibuprofène.

ABSTRACT

In the pharmaceutical field, the oral route remains the preferred route of administration because it is simpler and better accepted by patients. However, this mode of administration is problematic for many active pharmaceutical ingredients (API) with low solubility, low permeability and/or instability in the gastrointestinal environment. Their microencapsulation in polymeric matrices can make them able to respond to these factors, especially if the microparticles generated resist the environments encountered during the gastrointestinal tract and then play a protective role, both for the API and for the mucous membranes encountered. The search for new excipients, from agro-resources such as natural polymers, is booming. Vegetable proteins, thanks to their functional properties such as good solubility, relatively low viscosity, and emulsifying and film-forming properties, are preferred candidates. In addition, the great diversity of their functional groups makes it possible to envisage various chemical or enzymatic modifications.

The aim of this work was to study the interest of soy protein as a coating material for API intended for the oral route, and more particularly as a candidate for the development of gastro-resistant forms. A soy protein isolate (SPI) was used as a coating material and the atomization as a process. Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, was chosen as a model molecule because of its low solubility requiring an improvement in its bioavailability, and its gastric side effects requiring an enteric shaping. Two chemical modifications of proteins (acylation and succinylation) have been studied in order to modify the solubility of the soy protein. These modifications were carried out in accordance with the principles of Green Chemistry, especially in the absence of organic solvent. The microcapsules obtained by spray-drying were characterized in terms of rate and encapsulation efficiency, morphology and size distribution of the particles, physical state of the encapsulated API and capacity of release in simulated gastric and intestinal medium. The results obtained validated the interest of the chemical modifications of the soy protein to modulate the release kinetics of API. The chemical modifications appeared particularly suitable for the encapsulation of hydrophobic active ingredients, and allowed to obtain ibuprofen release kinetics decreased to acidic pH (gastric). The last part of this work allowed to validate this last hypothesis by the realization of gastro-resistant forms on the model of MUPS tablets (multiple unit pellet system). The results of this exploratory work demonstrate that soy protein, combined with a multi-particle shaping process coupled with direct compression, can be a biosourced, environmentally friendly alternative (aqueous solvent handling, drying and compression steps reduced) and confident to the coating used in traditional gastroresistant forms.

Key words: microencapsulation, soy protein, green excipient, spray-drying, functionalization, acylation, succinylation, oral route, delayed release, microparticles, tablets, ibuprofen.

