

## STABILISATION DE NANOPARTICULES POLYMÈRES EN DISPERSION AQUEUSE PAR DES COPOLYMÈRES À BLOCS PEG-PCL

### STABILISATION OF POLYMER NANOPARTICLES IN AQUEOUS DISPERSIONS BY USING PEG – PCL BLOCK COPOLYMERS

Emmanuel LANDREAU,<sup>a</sup> Youssef AGUNI,<sup>a</sup> Yves CHEVALIER<sup>a</sup> et Thierry HAMAIDE<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), CNRS UMR 5007 ESCPE Lyon, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation (LCP) ESCPE Lyon, 43 boulevard du 11 novembre 1918, BP 2077, 69616 Villeurbanne Cedex, France

*Reçu le 18 novembre 2005*

Plusieurs copolymères à blocs de type PEG – b – PCL ont été synthétisés par polymérisation anionique de l' $\epsilon$ -caprolactone en présence de MPEG comme agent de transfert. Les copolymères ont été caractérisés par RMN et spectrométrie de masse Maldi-Tof. Les longueurs des blocs varient entre 8 et 113 pour le PEG et 5 et 40 pour la PCL. Ces copolymères ont été utilisés comme polymères tensioactifs pour la stabilisation de nanoparticules de PCL obtenues par nanopréciipitation. L'influence de la longueur des blocs sur la stabilisation a été étudiée et il s'est avéré que les copolymères à base de PEG de longueur 113 étaient les plus efficaces. La taille de particules est de l'ordre de 230 nm et les suspensions restent stables sur des périodes dépassant les trois mois. La vitesse de déstabilisation des suspensions a été mesurée en ajoutant des teneurs variables de sulfate de sodium. Une concentration critique de coagulation en a été déduite de l'ordre de 190 mg/L. Les résultats suggèrent cependant que l'ancrage du copolymère est meilleur quand la longueur de la chaîne PCL dépasse les 10 unités.

Various PEG-b-PCL block copolymers have been synthesized from anionic polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone by using MPEG based aluminium alcoholate as initiator and MPEG as transfer agent. These copolymers have been characterised by NMR and mass spectroscopy. The chain lengths were in the range 8 – 113 for PEG and in the range 5 – 40 for PCL. They have been used as emulsifiers in order to stabilise PCL nanoparticles and the influence of both chain lengths on the nanoparticles stability has been investigated. It was shown that block copolymers with a PEG chain length of 113 EO units were the most efficient for the stabilisation of the nanoparticles. Particles size was around 230 nm, with a colloidal stability at room temperature over more than 100 days. The dispersions have been destabilised by adding sodium sulphate and the coagulation rate was measured. A critical coagulation concentration has been determined around 190 mg/L whatever the PCL chain length.

### INTRODUCTION

Dans de nombreux domaines d'applications, le choix d'un émulsifiant est limité par de nombreuses contraintes qui ne sont pas directement liées aux propriétés émulsifiantes des molécules. Cela est particulièrement sensible dans le cas des applications qui concernent les organismes vivants, en particulier l'environnement et les personnes humaines. Ainsi par exemple, les tensioactifs utilisés en détergence doivent être biodégradables pour le bon fonctionnement des stations d'épuration d'eau, les tensioactifs utilisés en soin corporel

doivent de plus être peu irritants; et les exigences deviennent encore plus dures quand on s'adresse aux applications cosmétiques et en galénique pharmaceutique. Pour ces dernières applications, la mise sur le marché d'une formulation n'est possible que si l'innocuité de tous les excipients a été prouvée par des études de toxicologie.<sup>1</sup> Cette règle s'applique aux émulsifiants.

En conséquence, l'usage courant en pharmacie consiste à n'utiliser que des produits validés et décrits dans la Pharmacopée Européenne parce que les études de toxicologie ont déjà été effectuées. Dans ce cadre restrictif, le choix des émulsifiants

\* Corresponding author: hamaide@lcpp.cpe.fr

s'avère très difficile à cause de faible nombre de tels produits décrits. Il est ainsi très fréquent de ne pas trouver de produit émulsifiant dont les propriétés soient réellement satisfaisantes par rapport à la propriété recherchée de stabilisation d'une émulsion ou d'une suspension. L'utilisation d'un nouveau composé nécessite une étude de toxicologie très longue et coûteuse car il faut fournir de nombreuses preuves de l'absence de toxicité des composés. On n'entreprend une telle démarche que si on est certain de la qualité optimale du composé. Il y a donc un grand intérêt à rechercher de nouveaux composés à propriétés améliorées et qui puissent être satisfaisants au regard des contraintes de l'application en pharmacie ou cosmétique.

Parmi les produits émulsifiants pour lesquels il est possible d'espérer un gain de propriétés, les tensioactifs polymères<sup>2</sup> présentent des avantages certains qui justifient les études que nous décrivons. En particulier, les copolymères à blocs qui possèdent un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe (non polaire) ont une structure similaire à celle des tensioactifs classiques, mais les propriétés de chaque bloc sont exacerbées: la partie hydrophile est beaucoup plus polaire que celle d'un tensioactif classique et il en est de même pour la partie hydrophobe. La conséquence est l'obtention de propriétés émulsifiantes comme l'abaissement de tension interfaciale pour de très faibles concentrations d'émulsifiant.<sup>3</sup> Cette propriété permet d'utiliser des quantités moindres d'émulsifiant pour stabiliser une émulsion ou une suspension. Cela est éventuellement un avantage économique, mais surtout, la concentration résiduelle d'émulsifiant dans la phase aqueuse est réduite, ce qui diminue les effets secondaires tels

l'entraînement d'air et le moussage, l'adsorption aux autres interfaces, en particulier les surfaces des membranes cellulaires.

Outre l'absence de toxicité des composés et de leur métabolites, les émulsifiants doivent être capables de stabiliser les émulsions ou les suspensions pendant des périodes très longues, être biocompatible et biodégradables. Enfin pour une application en pharmacie où une substance active sera encapsulée dans une émulsion ou dans de particules de polymère en suspension, il est nécessaire que la forme galénique puisse atteindre la cible thérapeutique et soit donc véhiculée longtemps dans l'organisme. Un moyen efficace d'éviter la reconnaissance et l'élimination des particules par le système immunitaire est de recouvrir sa surface par une couche protectrice de polymère hydrophile.<sup>4,5</sup> La partie hydrophile d'un émulsifiant de type copolymère à blocs peut évidemment jouer ce rôle qu'un émulsifiant classique, très mobile et de petite taille, peut difficilement assurer.

Notre étude s'est portée sur la synthèse et l'évaluation des propriétés émulsifiantes de copolymères à blocs de type poly(caprolactone) – b – poly(oxyde d'éthylène), PCL – b – POE. Le schéma 1 montre la structure chimique générale de ces copolymères. Ce type de copolymère et certains copolymères similaires sont largement étudiés pour des applications en encapsulation et vectorisation, bien qu'aucune exploitation dans une application pharmaceutique n'ait encore vu le jour. Les formulations généralement décrites concernent des micelles de copolymères à blocs plutôt que leur utilisation pour stabiliser des suspension de nanoparticules.<sup>6-11</sup>

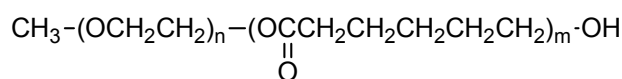


Schéma 1 – Structure générale des copolymères à blocs poly(oxyde d'éthylène)-b-poly(caprolactone).

De tels copolymères comportent un bloc hydrophobe poly(caprolactone) (PCL) qui est un polyester biocompatible et biodégradable bien connu.<sup>12-14</sup> La PCL est en effet largement utilisée comme polymère de base pour l'encapsulation de substance actives dans des microsphères ou des nanosphères de polymère.<sup>1</sup> Le bloc hydrophile est composé de poly(oxyde d'éthylène) (POE) qui est biocompatible mais faiblement biodégradable. L'utilisation de POE dans de nombreux émulsifiants nonioniques tels les Tween® est

cependant très courante et bien acceptée. Il est en effet difficile de trouver des produits hydrophiles de substitution dont les propriétés soient satisfaisantes. Les deux paramètres qui contrôlent les propriétés de ces copolymères sont les degrés de polymérisation des blocs PCL et POE. Le procédé de synthèse que nous décrivons permet de faire varier à volonté les degrés de polymérisation des deux blocs afin de pouvoir effectuer une étude systématique sur les relations entre structure chimique et propriétés.

L'évaluation des propriétés consiste en une étude de l'émulsification de la poly(caprolactone) dans l'eau par la méthode de "nanoprécipitation"<sup>15,16</sup> en utilisant les copolymères à blocs comme émulsifiants. Deux paramètres principaux seront étudiés: *i*) la possibilité de fabriquer une suspension de PCL à l'aide de ces émulsifiants; *ii*) la stabilité des suspensions ainsi préparées à long terme et dans un test de floculation accélérée.

Les nanoparticules de PCL biocompatible et biodégradable<sup>12-14</sup> qui sont produites par un tel procédé peuvent être utilisées pour la vectorisation de substances actives hydrophobes qui auraient été dissoutes dans la phase organique au moment de la préparation de la suspension de nanoparticules [1]. La structure globale des nanoparticules ainsi préparées (Fig. 7) consiste en un cœur de poly(caprolactone) entouré d'une écorce de copolymères à blocs qui assure la stabilité colloïdale de la suspension et prévient la reconnaissance des particules par le système immunitaire dans l'organisme. Cette structure est semblable à celle des micelles de copolymères à blocs qui a été beaucoup étudiée par ailleurs;<sup>3,17-20</sup> les particules de l'étude que nous présentons sont

cependant différentes car elles contiennent de la PCL à l'intérieur et la taille des particules est donc beaucoup plus grande.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1. Synthèse des copolymères

La synthèse des copolymères à blocs MPEG – b – PCL a été effectuée par polymérisation anionique coordonnée de l' $\epsilon$ -caprolactone en présence de MPEG comme agent de transfert et AlEt<sub>3</sub> pour la synthèse de l'alcoolate qui sera l'amorceur de la polymérisation. Le principe de la polymérisation de l' $\epsilon$ -caprolactone en présence d'un agent de transfert, couramment utilisée pour la synthèse d'oligomères fonctionnels,<sup>21-23</sup> peut être très facilement étendu à la synthèse de copolymères à blocs lorsque le premier bloc peut lui-même jouer le rôle de l'agent de transfert, ce qui est le cas des chaînes POE ou MPEG<sup>24, 25</sup> (Schéma 2).

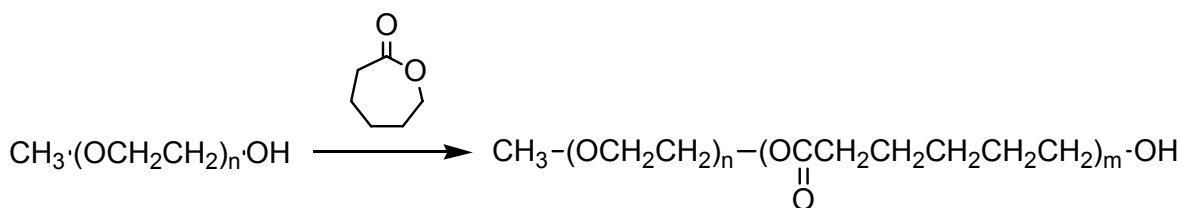


Schéma 2 – Schéma de principe de la synthèse des copolymères à blocs MPEG – b – PCL.

Le degré de polymérisation moyen en nombre  $X_n$  est facilement contrôlé par la quantité de l'agent de transfert mis en œuvre selon la relation usuelle :

$$\overline{X}_n = \frac{[\text{caprolactone}]}{[\text{MPEG}]}$$

Trois MPEG commerciaux de masse molaire croissante ( $M_n = 350, 750$  et  $5000$  g/mol ce qui correspond à des  $X_n = 7,6, 16,7$  et  $113,3$  respectivement) ont été utilisés comme agent de transfert. Les copolymères ont été caractérisés par RMN du <sup>1</sup>H et par spectrométrie de masse Maldi – Tof. Connaissant la longueur de la chaîne MPEG initiale, il est aisé par RMN d'en déduire la longueur de la chaîne PCL greffée (Fig. 1). Le

spectre de masse Maldi – Tof est a priori plus délicat à interpréter mais permet dans un premier temps de vérifier l'absence de produits secondaires, ainsi que de produits cycliques qui seraient indécélables par RMN. La Fig. 2 montre l'élargissement d'une zone du spectre de masse. Ce spectre est la résultante de la distribution du MPEG de départ sur laquelle s'ajoute la distribution des chaînes PCL sur chaque chaîne de MPEG. On retrouve ainsi les pics spécifiques de chaque chaîne copolymère avec des écarts de  $m/z$  de 114 correspondant à une unité caprolactone et 44 pour l'unité oxyde d'éthylène. La structure des copolymères utilisés dans la suite de l'étude est rapportée dans le tableau 1.

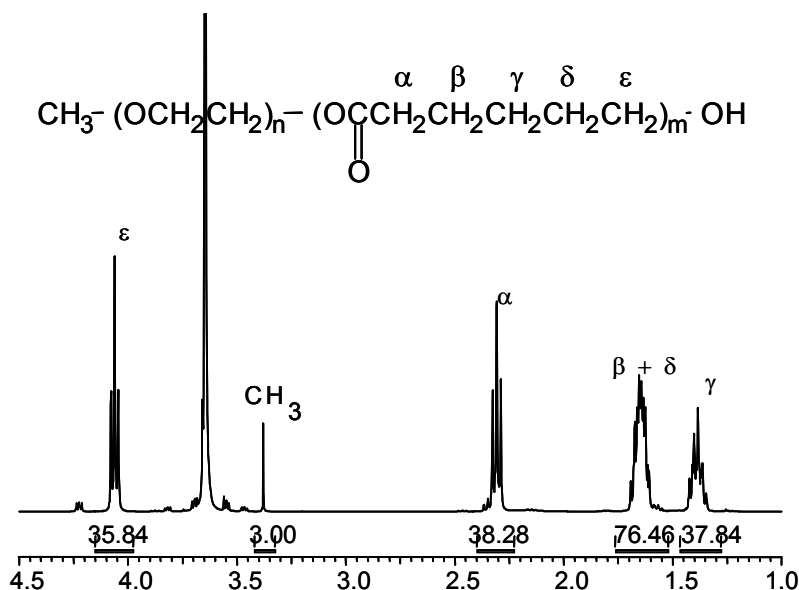


Fig. 1 – Spectre RMN du  $^1\text{H}$  d'un copolymère à blocs MPEG – b – PCL. La raie à  $\delta = 3,65$  ppm correspond aux unités  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ .

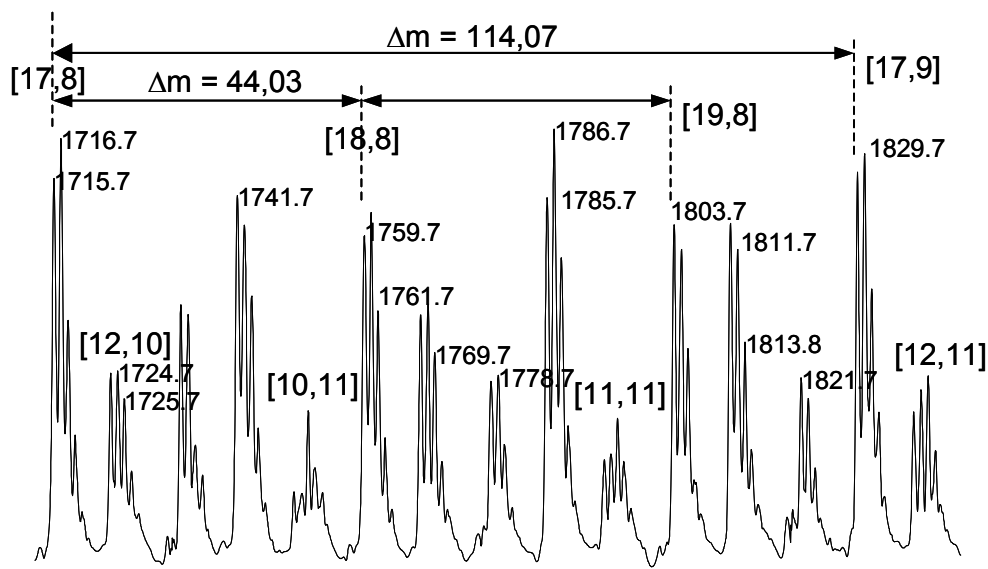


Fig. 2 – Élargissement d'une zone du spectre de masse Maldi-Tof d'un copolymère. Les nombres entre crochets correspondent au nombre d'unités CL et OE du copolymère.

## 2. Formulation des dispersions et caractérisations

Tous les copolymères répertoriés dans le Tableau 1 sont solubles dans l'acétone. Seul le copolymère (113 – 10) présente une certaine solubilité dans l'eau. La valeur du nombre HLB a été estimée selon la formule de Griffin :

$$HLB = 20 \times \frac{M_n \text{ PEG}}{M_n \text{ copolymère}}$$

Les dispersions de polycaprolactone sont préparées par nanoprecipitation de la PCL en

solution dans l'acétone dans un plus grand volume d'eau. Selon sa solubilité, le copolymère est présent dans la phase organique avec la PCL ou préalablement mis en solution dans l'eau. De façon générale, le protocole opératoire consiste à dissoudre 0,2 g de PCL ( $M_n = 80000$  g/mol) et 0,1 g de copolymère à blocs dans 25 mL d'acétone. Cette solution est alors injectée rapidement dans 50 mL d'eau. L'acétone est ensuite éliminée à l'évaporateur rotatif.

La dernière colonne du Tableau 1 rapporte les observations concernant la stabilité des dispersions obtenues. Seuls les copolymères avec une chaîne PEG de masse 5000 g/mol ( $X_n = 113$ ) conduisent à

des dispersions stables. La diminution de la longueur de la séquence PEG provoque une floculation partielle et souvent immédiate de la suspension.

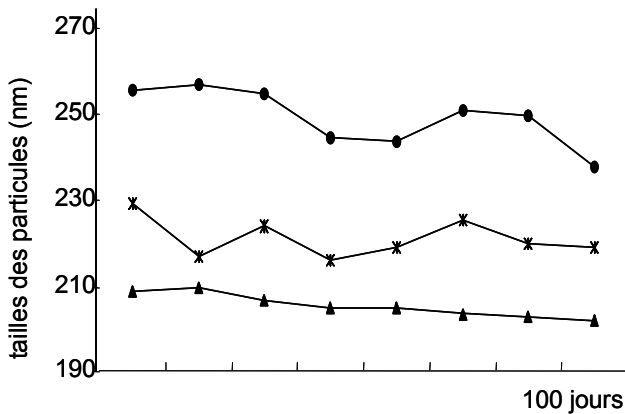
Dans le cas des suspensions stables, la mesure des tailles de particules a été effectuée par diffusion dynamique de lumière. On vérifie bien

que l'augmentation de la proportion de tensioactif polymère provoque une diminution de la taille des particules (Fig. 3). D'autre part, la stabilité colloïdale des dispersions dans le temps a été vérifiée par mesure des tailles pour différents temps de stockage (Fig. 4).

Tableau 1

Structure chimique et propriétés des dispersions de PCL obtenues			
$X_n$ MPEG	$X_n$ PCL	HLB	Aspect de la suspension
8	10	4,6	Précipitation immédiate
17	5	11,2	Précipité + Suspension laiteuse
17	10	7,8	Précipité + Suspension laiteuse
113	10	16,2	Suspension laiteuse
113	20	13,6	Suspension laiteuse
113	25	12,6	Suspension laiteuse
113	30	11,7	Suspension laiteuse
113	40	10,3	Suspension laiteuse

Fig. 3 – Évolution de la taille des particules avec la quantité de tensioactif polymère (113 – 10).



### 3. Stabilité des particules

La stabilité des particules peut être abordée en étudiant sa vitesse de déstabilisation par addition de sel ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) de façon à provoquer la floculation (coagulation) par effondrement de la couche de polymère adsorbée. La vitesse de coagulation est obtenue par mesure de l'évolution de l'absorbance des dispersions en fonction du temps. La Fig. 5 montre le profil habituel rencontré pour ce type d'expérience avec deux zones distinctes. La

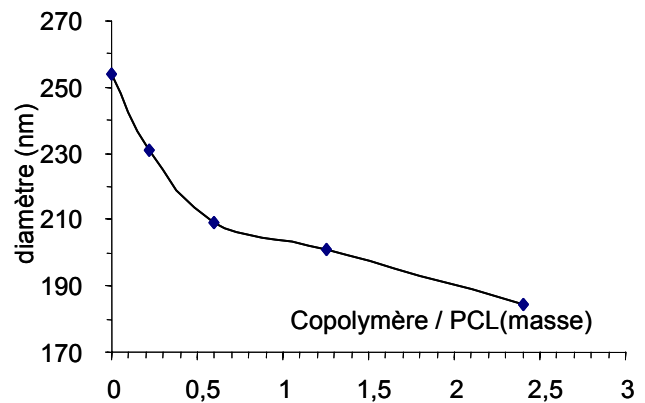


Fig. 4 – Taille des particules et effet du stockage sur la stabilité colloïdale.

$X_n$  (MPEG) = 113;  $X_n$  (PCL) = 10 (●); 30 (\*); 40 (▲).

première zone, observée pour de faibles quantités de sel ajouté, correspond à une coagulation lente, la vitesse de coagulation augmentant avec la quantité de sel ajouté. La deuxième zone correspond à une vitesse de coagulation indépendante de la quantité de sel. La vitesse de coagulation y est maximale (coagulation rapide). On définit le rapport de stabilité de Fuchs  $W$  par le rapport de la vitesse rapide sur la vitesse observée. La concentration critique de coagulation (CCC) est la concentration d'électrolyte nécessaire pour atteindre

le régime de coagulation rapide où  $W$  est égal à l'unité. La Fig. 6 montre l'évolution de  $\log(W)$  en fonction de la concentration d'électrolyte pour des dispersions stabilisées par quelques copolymères. On observe que la valeur de la CCC reste sensiblement la même autour de 190 g/L quelle

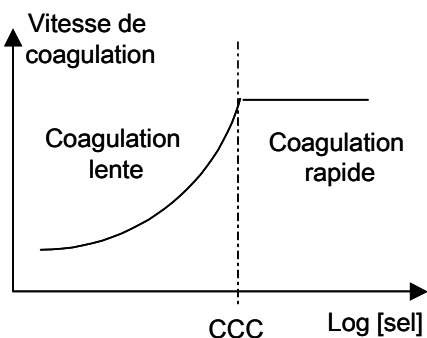


Fig. 6 – Évolution de  $\log(W)$  avec la concentration de sel ajouté à la dispersion. Influence de la nature du copolymère.

La déstabilisation des dispersions se fait à des teneurs élevées en sel. Cette déstabilisation est la conséquence de la "déshydratation" des chaînes PEG par le sulfate de sodium, les solutions salines étant des mauvais solvants pour les chaînes PEG. Les chaînons PEG ont alors tendance à s'effondrer sur elles-mêmes (diminution du volume hydrodynamique), diminuant par là la stabilisation

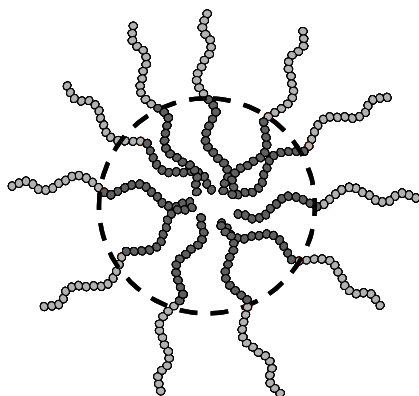
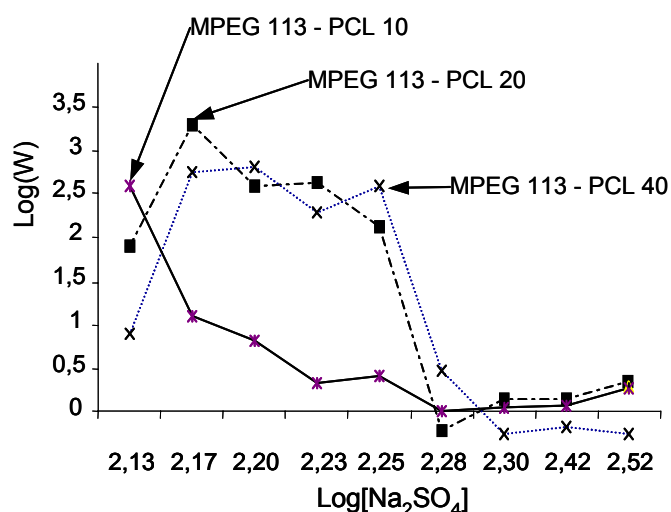


Fig. 7 – Représentation schématique de la stabilisation de nanoparticules par les copolymères PEG – PCL. La chaîne PCL hydrophobe (gris foncé) est "ancrée" à l'intérieur de la nanoparticule tandis que séquence PEG hydrophile (gris clair) est déployée à l'extérieur.

que soit la longueur de la chaîne PCL avec toutefois un comportement différent pour le copolymère à 10 unités PCL. La valeur de  $W$  diminue très rapidement, traduisant une stabilisation moindre de ces dispersions.

Fig. 5 – Comportement de principe observé dans une expérience de coagulation par un électrolyte.



stérique des suspensions. On retrouve globalement les mêmes valeurs de CCC car la longueur de la séquence PEG est la même pour tous les tensioactifs étudiés ici. La longueur de la séquence PCL doit influencer sur "l'ancrage" du copolymère à l'interface, une faible longueur diminuant l'efficacité de l'adsorption (Fig. 7).

## CONCLUSION

Les copolymères à blocs de type PCL-b-POE se sont révélés être des émulsifiants efficaces pour réaliser les suspensions aqueuses de PCL. L'étude systématique en fonction de la longueur des blocs a montré qu'il est nécessaire d'avoir les copolymères dont le bloc POE soit suffisamment long, typiquement 5000 g/mol ( $X_n = 113$ ). Les copolymères qui donnent des résultats négatifs ne permettent pas l'émulsification de la PCL par le procédé de nanopréciipitation ou donnent des suspensions instables qui coagulent et sédimentent très rapidement. Même si le copolymère est soluble dans l'eau, il est préférable de l'introduire dans la phase organique lors de l'émulsification.

Les suspensions de tailles typiques comprises entre 200 et 300 nm sont obtenues avec tous les émulsifiants copolymères pour lesquels  $X_n = 113$ . Ces suspensions sont stables pendant plusieurs mois de stockage et résistent très bien à la coagulation par les électrolytes.

Ces copolymères sont donc de bons candidats pour une utilisation en formulation de suspensions. Bien que l'étude n'ait été réalisée que sur le procédé de nanopréciipitation, il est raisonnable de penser que de tels émulsifiants polymères puissent convenir pour d'autres procédés d'émulsification et aussi pour l'émulsification d'autres polymères que le PCL, voire d'huiles diverses. L'utilisation pour des application en galénique pharmaceutique demandera un travail d'évaluation plus approfondi, d'une part de manière évidente sur la toxicité de ces composés, mais aussi sur leur comportement in vivo. En particulier, l'évaluation de leur résistance au système immunitaire et de leur compatibilité avec les autres composés véhiculés dans la circulation sanguine est d'une grande importance.

## REFERENCES

1. R. Arshady, "Microspheres, Microcapsules & Liposomes", R. Arshady Editeur Citus Books, 1999, Vo1 1.
2. I. Piirma, "Polymeric surfactants", Marcel Dekker, 1992.
3. G. Riess, *Prog. Polym. Sci.*, **2003**, 28, 1107.
4. R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R.H. Müller, J.M. Verbavatz et R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1995**, 16, 215.
5. K. Holmberg, F. Tiberg, M. Malmsten et C. Brink, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1997**, 123-124, 297.
6. M.N.V. Ravi Kumar, N. Kumar, A.J. Domb et M. Arora, *Adv. Polym. Sci.*, **2002**, 160, 45.
7. P.L. Soo, L. Luo, D. Maysinger et A. Eisenberg, *Langmuir*, **2002**, 18, 9996.
8. F. Ravenelle et R.H. Marchessault, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 856.
9. B. Shi, C. Fang, M.X. You, Y. Zhang, S. Fu et Y.Y. Pei, *Colloid Polym. Sci.*, **2005**, 283, 954.
10. S.-J. Park, K.-S. Kim et S.-H. Kim, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2005**, 43, 238.
11. A. Mahmud et A. Lavasanifar, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2005**, 45, 82.
12. U. Edlund et A.-C. Albertsson, *Adv. Polym. Sci.*, **2002**, 157, 67.
13. A.-C. Albertsson et I.K. Varma, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 1466.
14. S. Wang, Q. Cai et J. Bei, *Macromol. Symp.*, **2003**, 195, 263.
15. I. Montasser, S. Briançon, J. Lieto et H. Fessi, *J. Pharm. Belg.*, **2000**, 55, 155.
16. I. Montasser, H. Fessi, S. Briançon et J. Lieto, Brevets FR 2806005 (2000); US 2003059473 (2001); WO 0168235 (2001).
17. C.R. Heald, S. Stolnik, K.S. Kujawinski, C. De Matteis, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis, S.C. Purkiss, R.J. Barlow et P.R. Gellert, *Langmuir*, **2002**, 18, 3669.
18. T. Riley, C.R. Heald, S. Stolnik, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis, S.M. King, R.K. Heenan, S.C. Purkiss, R.J. Barlow, P.R. Gellert et C. Washington, *Langmuir*, **2003**, 19, 8428.
19. P. Vangeyte, S. Gautier et R. Jérôme, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2004**, 242, 203.
20. K. Letchford, J. Zastre, R. Liggins et H. Burt, *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, **2004**, 35, 81.
21. C. Delaite-Miola, Th. Hamaide et R. Spitz, *Macromol. Chem. Phys.*, **1999**, 200, 1771.
22. Th. Hamaide, M. Pantiru et H. Fessi, *Chem. Bull. "Politehnica" Univ (Timisoara)*, **2001**, 46, 46.
23. M. Pantiru, C. Iojoiu, T. Hamaide et F. Delolme, *Polym Int.*, **2004**, 53, 506.
24. C. Iojoiu, C. Racles, V. Harabagiu et Th. Hamaide, *Chem. Bull. "Politehnica" Univ (Timisoara)*, **2003**, 48, 230.
25. C. Iojoiu, Th. Hamaide, V. Harabagiu et B.C. Simionescu, *J. Polym. Sci. Part A. Polym. Chem.*, **2004**, 42, 689.