

**Research Title** Development and characterization *in-situ* forming microparticles and gels as drug controlled-release systems for periodontitis treatment  
**Researcher** Associate Professor Dr. Thawatchai Phaechamud and Assistant Professor Dr. Juree Charoenteeraboon  
**Office** Faculty of Pharmacy, Silpakorn University  
**Research Grants** Fiscal Budget of Year 2015  
Research and Development Institute, Silpakorn University  
**Year of Completion** 2016  
**Type of Research** Applied research  
**Subjects** Chemical Science and Pharmacy

### Abstract

Local drug delivery of antimicrobial drug into periodontal pocket has been interesting for periodontitis treatment. Practically, *in situ* forming gel is solution of polymer that transforms into gel after administration into the body and *in situ* forming microparticle system is injectable emulsion. The internal phase of emulsion contains drug and polymer solution and continuous phase contains oil and stabilizer. The objective of this research was to develop *in situ* forming gel system and *in situ* forming microparticle system (ISM) for periodontitis treatment using cholesterol and bleached shellac. The parameters such as appearance, viscosity, rheology, syringeability, gel formation, degradability, drug release, stability of emulsion and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* were investigated. The *in situ* forming gel was prepared using cholesterol and bleached shellac as gelling agent while *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2-pyrrolidone and eutectic (menthol and camphor) used as solvent. The *in situ* forming microparticle (ISM) was prepared by sol in oil emulsion containing bleached shellac in 2-pyrrolidone as in internal phase, olive oil as external phase and glycerol monostearate as stabilizer (emulsifier). All doxycycline hyclate (DH) loaded systems were easy to be injected and able to form gel. They showed Newtonian or pseudoplastic flow and could inhibit *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. An addition of 10% benzyl benzoate in the *in situ* forming gel prepared from cholesterol was the most suitable preparation because the burst release was minimized. The DH *in situ* forming gel containing bleached shellac with 2-pyrrolidone as solvent and the DH ISM containing bleached shellac with 2-pyrrolidone as internal phase and 2.5% GMS dissolved in olive oil as external phase might be the most suitable preparation to use in periodontitis treatment because the systems were able to properly sustainable drug release and degradable higher than the others.

Keyword : *in situ* forming gel, *in situ* forming microparticle, bleached shellac, cholesterol, antimicrobial agent, periodontitis

ชื่อโครงการ การพัฒนาและการตรวจคุณลักษณะไมโครพาร์ติเคิลและเจลก่อกตัวเองเพื่อเป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยยาสำหรับรักษาโรคปริทันต์อักเสบ

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัชชัย แพชคณิต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุรีย์ เจริญธีรบูรณ์  
หน่วยงานที่สังกัด คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร  
แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558  
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์  
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

#### บทคัดย่อ

การนำส่งยายับยั้งเชื้อโรคสู่บริเวณร่องลึกปริทันต์เพื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบอักเสบเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ในทางปฏิบัติแล้วระบบเจลก่อกตัวเองเป็นระบบที่สามารถเปลี่ยนจากสารละลายเป็นเจลหลังจากที่บริหารยาเข้าสู่ร่างกายและระบบไมโครพาร์ติเคิลชนิดก่อกตัวเองเป็นระบบของอิมัลชันซึ่งมีวัฏภาคภายในเป็นสารละลายของยาและพอลิเมอร์ และมีวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมันและสารเพิ่มความคงตัว วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนา ระบบไมโครพาร์ติเคิลและเจลก่อกตัวเองเพื่อใช้ในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ โดยใช้สารก่อกเจลเป็นเซลลูล์ฟอกขาว และคลอเรสเทอรอล ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ เพื่อประเมินระบบ ได้แก่ ลักษณะภายนอก ความหนืด การไหล ความสามารถในการฉีด การก่อกเจล การสลายตัว การปลดปล่อยยา ความคงตัวของอิมัลชัน ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรค *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* และ *Porphyromonas gingivalis* ทั้งนี้ระบบเจลก่อกตัวเองใช้คลอเรสเทอรอล และเซลลูล์ฟอกขาวเป็นสารก่อกเจล และใช้สารทำละลาย คือ เอ็น-เมทิล-สอง-ไพโรลิโดน (เอ็นเอ็มพี) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (ดีเอ็มเอสโอ) สอง-ไพโรลิโดน และระบบยูเทคติก (ประกอบด้วยเมนทอล และพิมเสน) ระบบไมโครพาร์ติเคิลชนิดก่อกตัวเองถูกเตรียมให้เป็นระบบของอิมัลชันชนิดสารละลายในน้ำมันโดยใช้ระบบเจลก่อกตัวเองที่ประกอบด้วยเซลลูล์ฟอกขาวละลายในสอง-ไพโรลิโดนเป็นวัฏภาคภายใน และใช้น้ำมันมะกอกเป็นวัฏภาคภายนอกโดยมีกลีเซอรอลโมโนสเตียเรทเป็นสารเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน ระบบทั้งหมดซึ่งบรรจุยาดีออกซีไซคลินไฮดรอกไซด์ที่เตรียมนี้สามารถฉีดได้ง่ายและเปลี่ยนสภาพกลายเป็นเจล โดยมีรูปแบบการไหลแบบนิวโตเนียนและซูโดพลาสติก และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสแตปไฟโลคอคคัสออเรียส สเตรปโตคอคคัสมีวาแทนส์ และพอไฟโรโมนเนสจิงจีวาลิส ระบบเจลก่อกตัวเองที่ใช้คลอเรสเทอรอลเป็นสารก่อกเจลที่ประกอบด้วยเบนซิลเบนโซเอตปริมาณร้อยละ 10 เป็นสารเติมแต่งเป็นตำรับที่มีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากให้รูปแบบการปลดปล่อยที่เหมาะสม สามารถลดการปลดปล่อยของยาที่เร็วในตอนแรก ระบบเจลก่อกตัวเอง และไม่โครพาร์ติเคิลยาดีออกซีไซคลินไฮดรอกไซด์ก่อกตัวเองที่ใช้เซลลูล์ฟอกขาวเป็นสารก่อกเจล โดยใช้สอง-ไพโรลิโดนเป็นสารทำละลายของวัฏภาคภายใน และน้ำมันมะกอกผสมกับกลีเซอรอลโมโนสเตียเรทปริมาณร้อยละ 2.5 เป็นวัฏภาคภายนอกเป็นตำรับที่มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาและสลายตัวได้มากกว่าตำรับอื่นๆ

คำสำคัญ : ระบบเจลก่อกตัวเอง, ระบบไมโครพาร์ติเคิลชนิดก่อกตัวเอง, เซลลูล์ฟอกขาว/คลอเรสเทอรอล, ยาที่ยับยั้งเชื้อโรค, โรคปริทันต์อักเสบ

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research work in title “Development and characterization *in-situ* forming microparticles and gels as drug controlled-release systems for periodontitis treatment” was performed with kind support from Research and Development Institute, Silpakorn University. For this research work, the researcher wishes to express sincere appreciation to every person who contributed in diverse ways to the completion of this research work. I would like to especially thank Assoc. Prof. Dr. Jintakorn Kuvatanasuchate, Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for supporting the anaerobic bacteria in periodontitis diseases (*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277). I am grateful to Faculty of Pharmacy, Graduate School, and Research and Development Institute, Silpakorn University. A big thank you goes to Miss Jongjan Mahadlek and Miss Orn Setthajindalert for their helpful assistance.

## TABLE OF CONTENTS

	Page
English Abstract .....	iv
Thai Abstract .....	v
Acknowledgments .....	vi
List of Tables .....	viii
List of Figures .....	x
List of Abbreviations .....	xii
Chapter	
1    Introduction .....	1
2    Literature Reviews .....	5
3    Materials and Methods .....	29
4    Results and Discussion .....	45
5    Conclusions .....	109
References .....	111
Appendices .....	117
Output .....	121
Biography .....	123

## List of Tables

Tables		Page
1	Interpretation of diffusional release mechanism from drug release data from thin polymer film .....	25
2	Diffusional exponent and mechanisms of diffusional release from various non-swella-ble controlled release systems.....	25
3	Diffusional exponent and mechanisms of drug from various swella-ble controlled release systems.....	26
4	Model files used with Scientist® .....	27
5	Meaning of abbreviation in formula. ....	31
6	Composition formula of gels containing different drugs in NMP. ....	31
7	Composition formula of gels containing different amounts of benzyl benzoate in <i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone.....	35
8	Composition formula of the systems fabricated from bleached shellac containing different solvents.....	40
9	Composition formula of the ISM prepared from bleached shellac using different solvents. ....	42
10	Effect of type of drug on flow index and consistency index.....	46
11	Appearance of <i>in situ</i> forming gel system prepared from cholesterol containing benzyl benzoate.....	50
12	Effect of benzyl benzoate concentration on flow index and consistency index of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol without doxycycline hyclate..	52
13	Effect of benzyl benzoate concentrations on flow index and consistency index of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol with doxycycline hyclate. ....	55
14	Effect of the amount of benzoyl benzoate and doxycycline hyclate on the force of syringeability of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol. ....	56
15	<i>In vitro</i> gel formation of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol with benzyl benzoate (0-30% w/w) at pH 6.8... ..	57
16	<i>In vitro</i> gel formation of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol with benzyl benzoate (0-30% w/w) at pH 7.0... ..	58
17	<i>In vitro</i> gel formation of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol with benzyl benzoate (0-30% w/w) at pH 7.4... ..	59
18	Percentage of weight loss of <i>in situ</i> forming gels from cholesterol without doxycycline hyclate... ..	61
19	The percentage of weight loss of <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol containing doxycycline hyclate.....	61
20	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of the release profiles of doxycycline hyclate from the system with 0-30% benzyl benzoate in phosphate buffer pH 6.8 using dialysis membrane method to different release models.....	65
21	Estimate parameter from curve fitting of doxycycline hyclate from the system with 0 -30% benzyl benzoate release in phosphate buffer pH 6.8 using dialysis membrane method to power law expression.....	66
22	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of the release profiles of doxycycline hyclate from the system with 0-30% benzyl benzoate in phosphate buffer pH 6.8 using membrane-less method to different release models.....	67
23	Estimate parameter from curve fitting of doxycycline hyclate from the system with 0-30% benzyl benzoate release in phosphate buffer pH 6.8 using membrane less method to power law expression.....	67
24	Cryo-SEM micrograph of the gels prepared from cholesterol with different magnifications.....	68
25	Appearance of <i>in situ</i> forming gel system from bleached shellac in different solvents.....	71
26	Effect of type of solvent on flow index and consistency index (without doxycycline hyclate).... ..	73

27	Effect of the type of solvent and doxycycline hyclate on the force of syringeability.	75
28	Effect of the type of solvent and doxycycline hyclate on the force of syringeability of formulations containing bleached shellac .....	75
29	<i>In vitro</i> gel formation of <i>in situ</i> forming gel system prepared from bleached shellac using different solvents at pH 6.8 .....	77
30	<i>In vitro</i> gel formation of <i>in situ</i> forming gel system prepared from bleached shellac using different solvents at pH 7.0 .....	78
31	<i>In vitro</i> gel formation of <i>in situ</i> forming gel system prepared from bleached shellac using different solvents at pH 7.4 .....	79
32	The percentage of weight loss of <i>in situ</i> forming gel prepared from bleached shellac without doxycycline hyclate .....	80
33	The percentage of weight loss of <i>in situ</i> forming gel prepared from bleached shellac with doxycycline hyclate .....	81
34	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of the release profiles of doxycycline hyclate from the system using different solvent in phosphate buffer pH 6.8 using dialysis membrane method to different release models	84
35	Estimate parameter from curve fitting of doxycycline hyclate from the system using different solvent release in phosphate buffer pH 6.8 using dialysis membrane method to power law expression.....	84
36	SEM micrograph of the dried gels prepared from bleached shellac with different magnifications (6X, 200X, 500X and 2000X) .....	85
37	Cryo-SEM micrograph of the gels prepared from bleached shellac with different magnifications (25X, 100X, 400X and 2000X.).....	86
38	Effect of amount of GMS on the stability of emulsion. (without doxyxycline hyclate) .....	88
39	Effect of amount of GMS on the stability of emulsion (with doxyxycline hyclate)	89
40	Mean size of emulsion droplet .....	90
41	Transform sol into microparticle of emulsion droplet containing 2.5% GMS ...	91
43	Appearance of ISM from bleached shellac in different solvents.....	92
43	Effect of type of solvent and drug on flow index and consistency index .....	95
44	Effect of the type of solvent and drug on the force of syringeability .....	96
45	<i>In vitro</i> gel formation of ISM prepared from bleached shellac with different solvents at pH 6.8.....	97
46	<i>In vitro</i> gel formation of ISM prepared from bleached shellac with different solvents at pH 7.0.....	98
47	<i>In vitro</i> gel formation of ISM prepared from bleached shellac with different solvents at pH 7.4.....	99
48	The percentage of weight loss of ISM from bleached shellac .....	101
49	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of the release profiles of doxycycline hyclate from the ISM in phosphate buffer pH 6.8 using dialysis membrane method to different release models .....	104
50	Estimate parameter from curve fitting of doxycycline hyclate from the ISM release in phosphate buffer pH 6.8 using dialysis membrane method to power law expression. ....	105
51	SEM micrograph of the dried microparticle systems with different magnifications (6X, 200X, 500X and 2000X).....	106
52	Cryo-SEM micrograph of the microparticle prepared from bleached shellac with different magnifications (25X, 100X, 400X and 2000X).. .....	106
53	Inhibition zone diameter of the <i>in situ</i> forming gel prepared from cholesterol containing doxycycline hyclate and metronidazole gainst <i>P. gingivalis</i> .	118
54	Inhibition zone diameters of the <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol containing benzyl benzoate against <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> and <i>P.gingivali</i> .....	118
55	Inhibition zone diameter of the <i>in situ</i> forming gel prepared from bleached shellac containing doxycycline hyclate against <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> and <i>P. gingivalis</i> .....	119
56	Inhibition zone diameter of the ISM prepared from bleached shellac containing doxycycline hyclate against <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> and <i>P. gingivalis</i> .....	119

## List of Figures

Figures		Page
1	Chemical structure of cholesterol, C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O.....	10
2	Main components of bleached shellac a) aleuritic acid b) butolic acid c) shellolic acid d) jalaric acid .....	11
3	Chemical structure of shellac.....	11
4	Chemical structure of <i>N</i> -Methyl-2-Pyrrolidone (NMP), C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO.....	12
5	Chemical structure of Dimethyl sulfoxide (DMSO), C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS.....	13
6	Chemical structure of 2-pyrrolidone, C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO .....	14
7	Chemical structure of menthol, C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O .....	14
8	Chemical structure of camphor, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O .....	15
9	Chemical structure of olive oil, R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> and R <sup>3</sup> are alkyl group (20%) or alkenyl group (80%) .....	16
10	Chemical structure of glycerol monostearate, C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> .....	16
11	Chemical structure of metronidazole, C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> .....	17
12	Chemical structure of doxycycline hyclate, C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , HCl .....	18
13	Chemical structure of benzyl benzoate, C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> .....	19
14	Newtonian behaviors. The shear stress means the applied force; the shear rate means the rate of deformation. ....	19
15	Non-Newtonian behaviors (Pseudoplastic flow).....	20
16	Non-Newtonian behaviors (Dilatant flow).....	21
17	Non-Newtonian behaviors (Plastic flow).....	21
18	Viscosity and time curves of thixotropy and rheopexy.....	22
19	Shear rate-viscosity curves of <i>in situ</i> forming gel systems containing cholesterol with an addition of doxycycline hyclate and metronidazole at 25°C.....	46
20	Flow curves of <i>in situ</i> forming gel systems prepared from cholesterol with an addition of doxycycline hyclate and metronidazole at 25°C.....	47
21	Inhibition zone diameter of the <i>in situ</i> forming gel prepared from cholesterol containing doxycycline hyclate and metronidazole against <i>P. gingivalis</i> ....	48
22	Release of metronidazole and doxycycline hyclate from <i>in situ</i> forming gel systems containing cholesterol using dialysis method. ....	49
23	Shear rate-viscosity curves of <i>in situ</i> forming gel systems containing cholesterol and different amounts of benzyl benzoate without doxycycline hyclate at 25°C .....	52
24	Flow curve of <i>in situ</i> forming gel systems prepared from cholesterol and different amounts of benzyl benzoate without doxycycline hyclate at 25°C.....	53
25	Shear rate-viscosity curves of <i>in situ</i> forming gel systems containing cholesterol and different amounts of benzyl benzoate and addition of 10% doxycycline hyclate at 25°C.....	54
26	Flow curve of <i>in situ</i> forming gel systems prepared from cholesterol and different amounts of benzyl benzoate with an addition of 10% doxycycline hyclate at 25°C .....	55
27	Diagram of gel formation in PBS .....	60
28	Inhibition zone diameter of the <i>in situ</i> forming gels prepared from cholesterol containing benzyl benzoate against <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> and <i>P. gingivalis</i>	62
29	Release of doxycycline hyclate from <i>in situ</i> forming gel system containing cholesterol and benzyl benzoate using dialysis method .....	63
30	Release of doxycycline hyclate from <i>in situ</i> forming gel systems containing cholesterol and benzyl benzoate using membrane less method .....	64
31	Gel formation in pig's gum of the <i>in situ</i> forming gel system prepared from cholesterol .....	69

32	Shear rate-viscosity curves of <i>in situ</i> forming gel systems containing bleached shellac without doxycycline hyclate in different solvents at 25°C .....	72
33	Shear rate-viscosity curves of <i>in situ</i> forming gel systems containing bleached shellac without doxycycline hyclate in different solvents at 25°C .....	72
34	Shear rate - viscosity curves of <i>in situ</i> forming gel system containing bleached shellac and addition of doxycycline hyclate in different solvents at 25°C	73
35	Flow curve of <i>in situ</i> forming gel system prepared from bleached shellac with an addition of doxycycline hyclate in different solvents at 25°C.....	74
36	Inhibition zone diameter of the <i>in situ</i> forming gel prepared from bleached shellac containing doxycycline hyclate against <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> and <i>P. gingivalis</i> .....	82
37	Release of doxycycline hyclate from <i>in situ</i> forming gel system containing bleached shellac using dialysis method.....	83
38	Gel formation in pig's gum of the <i>in situ</i> forming gel system prepared from bleached shellac .....	87
39	Shear rate - viscosity curves of ISM containing bleached shellac with and without doxycycline hyclate prepared with DMSO and 2-pyrrolidone) at 25°C .....	94
40	Flow curve of ISM containing bleached shellac with and without doxycycline hyclate in 2 solvent (DMSO and 2-pyrrolidone) at 25°C.....	95
41	Diagram of gel formation of ISM .....	100
42	Inhibition zone diameter of the ISM prepared from bleached shellac containing doxycycline hyclate against <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> and <i>P. gingivalis</i> .....	102
43	Release of doxycycline hyclate from ISM systems containing bleached shellac using dialysis method.....	103
44	Gel formation in pig's gum of the <i>in situ</i> forming microparticle system prepared from bleached shellac.....	107
45	Standard curve of doxycycline hyclate in phosphate buffer pH 6.8 for the <i>in vitro</i> release study.....	117
46	Standard curve of metronidazole in phosphate buffer pH 6.8 for the <i>in vitro</i> release study.....	117

## LIST OF ABBREVIATIONS

%w/w	percent weight by weight
°C	degree Celsius
µg	microgram(s)
µL	microliter(s)
µm	micrometer(s)
cfu/mL	colony forming unit/milliliter
cm	centimeter(s)
D/cm <sup>2</sup>	Dyne/square centimeter
e.g.	(Latin); for example
Eq.	equation
<i>et al.</i>	and others
etc.	et cetera (Latin); and other things/ and so forth
G	(needle) gauge
g	gram(s)
GMS	glycerol monosterate
h	hour(s)
ISM	<i>in situ</i> forming microparticle
L	liter(s)
mg	milligram(s)
min	minute(s)
mL	milliliter(s)
msc	model selection criterion
MW	molecular weight
N	newton
nm	nanometer(s)
PBS	phosphate buffer solution
pH	potentia hydrogenii (Latin); power of hydrogen
R <sup>2</sup>	coefficient of determination
rpm	revolutions per minute
s	sec(s)
SEM	scanning electron microscope
S.D.	standard deviation

