Research Title Preparation of *in-situ* forming gels and microparticles comprising doxycycline hyclate using shellac as polymer with different solvents and study of their solvent exchange and transformation

Researcher Associate Professor Dr. Thawatchai Phaechamud and

Dr. Jongjan Mahadlek and Tharatree Srichan

Office Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

Research Grants

Fiscal Budget of Year 2017

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of Completion 2017

Type of Research Applied research

Subjects Chemical Science and Pharmacy

Abstract

As drug delivery systems, *in situ* forming gel exhibits a sol-to-gel phase transition after contact with aqueous fluid whereas *in situ* microparticle (ISM) obsesses transformation of emulsion droplets into the solid particles to modulate the drug release. Phase separation is the main strategy of these systems, and it undergoes the prompt changes in solubility of polymer in response to solvent exchange. This research purposed to better comprehend the behavior of solvent (e.g. Dimethyl sulfoxide (DMSO), *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and 2-pyrrolidone (PYR)) state in bleached shellac from preparation process to the entire phase separation of *in situ* forming microparticle and gel. The formulations employed the *in situ* forming gel as an internal phase of ISM, and emulsion was achieved by mixing the *in situ* forming gel with the external phase made from GMS and olive oil. In preparation process, the parameters such as pH, solubility parameter, density, interfacial tension and phase separation rate of emulsion compositions were investigated. During the phase separation, the physical characteristics were examined for the three phases according to exposure time. 1) Before (morphology of o/o emulsion and its droplet size, viscosities, viscoelasticity and thermal analysis). 2) During (transformation of sol to microparticles, solvent and drug releases, *in vitro* degradation, water diffusion rate and solvent diffusion). 3) After (texture analysis, XRD pattern and SEM microphotograph). Bleached shellac dissolved in solvents via strongly hydrogen

bonding and van der Wall forces. *In situ* forming gel using NMP as solvent could not fabricate into an emulsion because NMP was partial miscible with olive oil. The solubility parameter could be in rank of the solvent order as following: NMP > DMSO > PYR. NMP was described as the best "good solvent". This parameter related to viscosities, viscoelasticity and thermal analysis. Additionally, PYR itself was more viscous than DMSO and NMP, respectively. There are four crucial steps of phase separation. Firstly, water flowed into the system with different rate in rank of the solvent order as following: DMSO > NMP > PYR. This water permeation decreased the solubility of bleached shellac, and it then precipitated. Secondly, solvent and drug diffused out in few minutes later. The diffusion rate of all species was presented in term of solvent applied in formulation as DMSO > NMP > PYR. PYR formula had the slowest release rate of solvent and drug because solvent itself and its systems were higher viscous. Whereas, all diffusion profiles from DMSO and NMP systems were governed by solubility parameter. Thirdly, pores were supplied with water and solvent fluxes. The size and density of pores were increased by time similarly to the release rate of solvent and drug. Bleached shellac matrices prepared using PYR as solvent eventually dissipated due to hydrolysis at ester bond which was accelerated by PYR-induced water accumulation. A higher porous structure collapsed easily and it was more likely plastic but a dense one considerably resisted to a compression and deformed elastically. Finally, the degradation of bleached shellac in aqueous condition actually started after systems completed solidification. At steady state, the total mass loss converted to PYR >> NMP > DMSO similarly to a water content pattern. PYR could gain the high amount of water and pH of doxycycline hyclate solution in matrix was maintained by buffer pH nearly to 7, resulting in the large hydrolysis at polyesters. However, all behaviors of solvent state in ISM was covered by hindrance effect of oil phase. The solvent had no effect on the structure of remained bleached shellac after solvent exchange. PYR was the most appropriated solvent for preparing the *in situ* forming systems because its formulations demonstrated the proper sustained drug release profiles and preferable self-degradation in physiological condition for periodontitis treatment.

Keyword : Solvent exchange, *in situ* forming gels, *in situ* forming microparticles, bleached shellac

ชื่อโครงการ การเตรียมเจลและไมโครปาร์ติเคิลชนิดก่อตัวเองที่บรรจุยาด็อกซีไซคลินไฮเคลตโดยใช้เซลแล็กเป็นพอลิเมอร์โดยใช้สารทำละลายที่ต่างกัน และการศึกษาการแลกเปลี่ยนตัวทำละลายและการก่อตัวของระบบ

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย แพชมัด และ อ. ดร. จงจันท์ มหาดเล็ก

และ อ. ธาราธีร์ ศรีจันทร์

หน่วยงานที่สังกัด คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2560

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2560

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

บทคัดย่อ

สำหรับระบบนำส่งยาเช่นเจลชนิดก่อตัวเองเป็นระบบที่มีการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคจากของเหลวเป็นเจลภายหลังสัมผัสตัวกลางที่เป็นน้ำ และไมโครปาร์ติเคลชนิดก่อตัวเองเป็นระบบที่มีการเปลี่ยนแปลงจากหยดอิมัลชันเป็นอนุภาคแข็งหลังสัมผัสตัวกลางที่เป็นน้ำ การเปลี่ยนแปลงของทั้งสองระบบนี้เกิดขึ้นผ่านกลไกการแยกวัฏภาคซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของพอลิเมอร์อย่างฉับพลันที่ตอบสนองต่อการแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรมของตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) และ 2-pyrrolidone (PYR) ภายในเซลแล็คตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมจนกระทั่งระบบเกิดการแยกวัฏภาคของไมโครปาร์ติเคิลและเจลชนิดก่อตัวเอง สูตรตำรับใช้ระบบก่อตัวเองเป็นเจลชนิดก่อตัวเองเป็นวัฏภาคภายในของระบบก่อตัวเองเป็นไมโครปาร์ติเคลซึ่งเป็นอิมัลชันที่เกิดจากการผสมระหว่างระบบดังกล่าวกับวัฏภาคภายนอกซึ่งประกอบด้วยน้ำมันมะกอกและ Glyceryl monostearate (GMS) ปัจจัยที่ศึกษาในขั้นตอนการเตรียมได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ค่าดัชนีการละลาย ความหนาแน่น แรงตึงผิว และอัตราการแยกวัฏภาคของส่วนประกอบอิมัลชัน ในระหว่างการแยกวัฏภาคของระบบก่อตัวเองจะศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วนตามลำดับการสัมผัสกับตัวกลางที่เป็นน้ำ 1) ก่อนสัมผัส (รูปร่างและขนาดของอิมัลชัน ความหนืด สมบัติหยุ่นหนืด และการวิเคราะห์เชิงความร้อน) 2) ระหว่างสัมผัส (การเปลี่ยนแปลงจากของเหลวไปสู่ไมโครปาร์ติเคล การปลดปล่อยตัวทำละลาย

อินทรีย์และยา การสลายตัว อัตราการแพร่ของน้ำ และการแพร่ของตัวทำละลายอินทรีย์) 3) หลังสัมผัส (การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส การวิเคราะห์โครงสร้างผลึก และภาพใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน) ทั้งนี้เซลแล็กละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยการเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรงวานเดอร์วาล เจลชนิดก่อตัวเองที่ใช้ NMP เป็นตัวทำละลายไม่สามารถนำมาเตรียมเป็นอิมัลชันได้เนื่องจาก NMP เข้ากับน้ำมันมะกอกบางส่วน ค่าดัชนีการละลายสามารถเรียงลำดับตามชนิดตัวทำละลายได้ดังนี้ NMP > DMSO > PYR NMP จึงจัดเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับเซลแล็ก พารามิเตอร์นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาด้านความหนืด สมบัติหยุ่นหนืด และการวิเคราะห์เชิงความร้อน รวมถึง PYR มีความหนืดมากกว่า DMSO และ NMP ตามลำดับ กระบวนการแยกวัฏภาคสามารถแบ่งได้ 4 ขั้น ขั้นแรกน้ำได้เคลื่อนที่เข้าสู่ระบบด้วยอัตราเร็วต่างกันซึ่งเรียงตามลำดับตามชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในระบบดังนี้ DMSO > NMP > PYR น้ำที่เข้าสู่ระบบจะลดค่าการละลายของเซลแล็กจนเกิดการแยกวัฏภาค ขั้นที่สองตัวทำละลายอินทรีย์และยาจะแพร่ออกจากระบบออกมาภายนอก อัตราการแพร่ของสารดังกล่าวเรียงตามลำดับตามชนิดตัวทำละลายในระบบได้ดังนี้ DMSO > NMP > PYR ระบบที่มี PYR มีอัตราการปลดปล่อยสารช้าที่สุดเนื่องจากตัวทำละลายเองและระบบมีความหนืดสูงกว่า สำหรับการแพร่ของระบบที่มี DMSO และ NMP สามารถอธิบายได้จากค่าดัชนีการละลาย ขั้นที่สามระบบจะเกิดรูพรุน บริเวณที่มีการเคลื่อนที่ของน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ ขนาดและความหนาแน่นของรูพรุนจะเพิ่มขึ้นตามเวลาซึ่งสอดคล้องกับอัตราการปลดปล่อยตัวทำละลายอินทรีย์และยา เมทริกซ์เซลแล็คที่เกิดจากระบบที่ใช้ PYR มีการฉีกขาดในภายหลังเนื่องจากเกิดไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเธอร์ ซึ่งถูกเร่งโดย PYR เหนี่ยวนำให้มีการสะสมน้ำภายในระบบ โครงสร้างที่มีความพรุนสูงจะเกิดการแตกหักได้ง่ายและมีพฤติกรรมแบบพลาสติก แต่โครงสร้างที่มีความพรุนต่ำจะทนต่อแรงกดและยืดหยุ่น ขั้นสุดท้ายเซลแล็กเริ่มสลายตัวในสภาวะที่มีน้ำหลังจากระบบกลายเป็นของแข็งอย่างสมบูรณ์ เมื่อสภาวะคงที่ปริมาณการสลายตัวทั้งหมดเรียงตามลำดับตัวทำละลายได้ดังนี้ PYR >> NMP > DMSO ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายกับปริมาณน้ำที่สะสมในระบบ ระบบที่เตรียมด้วย PYR สามารถกักเก็บน้ำได้มากและความเป็นกรด-ด่างของสารละลายด็อกซีไซคลินไฮเครตในเมทริกซ์ที่ควบคุมโดยบัฟเฟอร์มีค่าใกล้เคียง 7 จึงทำให้เกิดไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเตอร์ของเซลแล็กได้สูง อย่างไรก็ตามพฤติกรรมของตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบก่อตัวเป็นไมโครปาร์ติเคลถูกบดบังด้วยน้ำมัน ตัวทำละลายดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างเซลแล็กที่เหลือหลังจากกระบวนการแลกเปลี่ยนสารละลาย PYR เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมระบบก่อตัวเองที่สุดเนื่องจากมันทำให้ระบบมีการปลดปล่อยยาอย่างช้า ๆ และมีโอกาสสลายตัวได้ในสภาวะร่างกายเพื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบ

คำสำคัญ : การแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย, การก่อตัวเป็นเจลชนิดก่อตัวเอง, การก่อตัวเป็นไมโครปาร์ติเคิล, เซลแล็ก

ACKNOWLEDGEMENTS

After an intensive period of several months, we would like to reflect on all those people who made this research work possible and a precious experience for us. This research work in title 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. We 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 (Porphyrommonas gingivalis ATCC 33277). We are grateful to Research and Development Institute, Silpakorn University. A big thank you goes to Miss Pitsiree Praphanwittaya, Miss Jongjan Mahadlek and Miss Orn Setthajindalert for their helpful assistance. Most of the journeys described in this thesis would not have been achieved without a good collaboration. I owe a great deal of appreciation to lecturers, administrative and technical staff members of the school who have been kind enough to advise and help in their respective roles.

In our daily work we have been blessed with a friendly and cheerful group of fellow students. Many thanks to them for their gorgeous care and helpful suggestions during my progress report presentations. We are indebted to Mr. Kritamorn Jitrangsri who generously shared his time and valuable knowledge, especially HPLC information. Thank you.

Finally, we must express our very profound gratitude to our family for understanding and love during the past few years. Their unfailing motivation and continuous encouragement though the process of research were the end of this accomplishment.

Table of Contents

Page

English Abstract…….. iv
Thai Abstract……... v
Acknowledgements…….. vi
List of Tables……... viii
List of Figures…….. x
List of Abbreviation……..... xiv
Chapter
1 Introduction……... 1
2 Literature Reviews……. 4
3 Materials and Methods…….. 21
4 Result and Discussion……..... 34
5 Conclusion……. 113
References…… 116
Appendices…….. 136
Biography…… 156

List of Tables

Tables		Page
1	Definition of abbreviation in formulation……..……...	25
2	Composition formula of *in situ* forming gel……...	25
3	Composition formula of *in situ* forming microparticles…….	26
4	Solubility parameter of organic solvents, water and oil phase……	40
5	Flow index and consistency index of prepared solutions at 25°C (n=3), *p≤0.05……	49
6	Flow index and consistency index of ISMs at 25°C (n=3), * p≤0.05…….....	49
7	DTGA peaks of *in situ* forming gels and their compositions…….	64
8	DTGA peaks of *in situ* forming microparticles and their compositions	66
9	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of solvent release from *in situ* forming gel systems…….	81
10	Estimate parameter from curve fitting of solvent release from *in situ* forming gel systems…….	81
11	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of solvent release from ISM……..	82
12	Estimate parameter from curve fitting of solvent release from ISM…….....	82
13	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of drug release from *in situ* gel systems…….....	82
14	Estimate parameter from curve fitting of drug release from *in situ* gel systems…….....	82
15	Comparison of degree of goodness-of-fit from curve fitting of drug release from ISM……..	83
16	Estimate parameter from curve fitting of drug release from ISM……..	83
17	Density of liquid compositions at 25°C (n=3)……	140
18	Surface tension of different solvents, olive oil and GMS-dispersed olive oil at 25°C (n=3)……..	140
19	Interfacial tension of different solvents in olive oil at 25°C (n=3).....	140
20	Volume of solvent separation during 24 h at 25°C (n=3)…….....	141
21	pH of organic solvents, PBS 6.8, DI water and their solutions at 25°C (n=3)……	142
22	Relative viscosities of diluted bleached shellac (BS) solution in different solvents (n=3)……	143
23	Droplet size of o/o emulsion with various concentrations of GMS at phase ratio 1:1 (n=3)……	144
24	Droplet size of o/o emulsion at various phase ratios (n=3)…….	144
25	Droplet size of o/o emulsion with constant GMS concentration at various phase ratios (n=3)…….…….....	144
26	Appearance viscosity of solvents at 25°C (n=3)…….	145

27	Appearance viscosity of bleached shellac solutions at 25^{o}C (n=3)……	145
28	Appearance viscosity of ISMs at 25^{o}C (n=3)…….	145
29	Release of DMSO, NMP and PYR from *in situ* forming gels in PBS pH 6.8 within 21 days (n=3)…….....	146
30	Release of DMSO, NMP and PYR from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 21 days (n=3)……	147
31	Release of DMSO, NMP and PYR from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 21 days (n=3)……	148
32	Drug release from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 21 days (n=3)……...	149
33	Dynamic change in total mass of *in situ* forming gels (n=3)…….....	149
34	Dynamic change in mass of bleached shellac from *in situ* forming gels (n=3)……	150
35	Dynamic change in water content of *in situ* forming gels (n=3)……	150
36	Dynamic change in total mass of *in situ* forming microparticles (n=3)	150
37	Dynamic change in mass of bleached shellac from *in situ* forming microparticles (n=3)…….	151
38	Dynamic change in water content of *in situ* forming microparticles (n=3).....	151
39	Water diffusion of *in situ* forming gels (n=3)…….…	152
40	Water diffusion of *in situ* forming microparticles (n=3)…….	153
41	Solvent diffusion distance of *in situ* forming gels prepared with different solvents (n=3)…….....	153
42	Solvent diffusion rate of *in situ* forming gels prepared with different solvents (n=3)…….....	153
43	Solvent diffusion distance of *in situ* forming microparticles prepared with different solvents (n=3)……	154
44	Solvent diffusion rate of *in situ* forming microparticles prepared with different solvents (n=3)……	154
45	Maximum deformation force or hardness of *in situ* forming gels (n=6)	155
46	Ratio of remaining force/maximum deformation force or ratio of elasticity/plasticity of *in situ* forming gels (n=6)…….	155
47	Maximum deformation force or hardness of *in situ* forming microparticles (n=6)…….	155
48	Ratio of remaining force/maximum deformation force or ratio of elasticity/plasticity of *in situ* forming microparticles (n=6)……..	155

List of Figures

Figures		Page
1	Main compositions of shellac a) saleuritic acid b) butolic acid c) shellolic acid d) jalaric acid…….	11
2	Chemical structures of shellac: jalaric acid; R = CHO, R' = CH_2OH, laccijalaric acid; R = CHO, R' = CH_3…….	11
3	Chemical structure of dimethyl sulfoxide (DMSO), C_2H_6OS……	12
4	Chemical structure of *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), C_2H_9NO…….	12
5	Chemical structure of 2-pyrrolidone (PYR), C_4H_7NO……..	13
6	Chemical structure of doxycycline hyclate, $(C_{22}H_{24}N_2O_8.\ HCl)_{\ 2}.\ C_2H_6O.\ H_2O$……	14
7	Chemical structure of olive oil, R_1 = oleic acid, R_2 = linoleic acid and R_3 = palmitic acid are alkyl group (20%) or alkenyl group (80%)……..	15
8	Chemical structure of glyceryl monostearate (GMS), $C_{21}H_{42}O_4$……	15
9	(a) Schematic representation of a typical rheometer, with the sample loaded between two plates. (b) Schematic stress response to oscillatory strain deformation for an elastic solid, a viscous fluid and a viscoelastic material…….	18
10	Force-time curve to determine the mechanical and adhesive properties of the implants…….....	20
11	Density of liquid compositions at 25°C (n=3), * p≤0.05……	35
12	Surface tension of different solvents, olive oil and GMS-dispersed olive oil at 25°C (n=3), * p≤0.05……	36
13	Interfacial tension of different solvents in olive oil at 25°C (n=3), * p≤0.05…….	36
14	Volume of solvent separation during 24 h at 25°C (n=3)……...	37
15	Resonance effect of amides ……..	38
16	pH of organic solvents, PBS 6.8, DI water and their solutions at 25°C (n=3)……...	39
17	Solubility parameter of organic solvents, water and oil phase…….	40
18	Relative viscosities of diluted bleached shellac solution in different solvents (n=3)…….	41
19	Droplet size of o/o emulsion with various concentrations of GMS at phase ratio 1:1 (n=150)……...	43
20	Droplet size of o/o emulsion at various phase ratios (n=150)……	44
21	Droplet size of o/o emulsion with constant GMS concentration at various phase ratios (n=150)……..	44
22	Appearance viscosity of solvents at 25°C (n=3), * p≤0.05……	45
23	Appearance viscosity of bleached shellac solutions at 25°C (n=3), * p≤0.05…….	46
24	Appearance viscosity of ISMs at 25°C (n=3), * p≤0.05…….	47
25	Flow of bleached shellac solutions at 25°C (n=3)……..	47
26	Flow of doxycycline hyclated-loaded bleached shellac solutions at 25°C (n=3)……..	48

27	Flow of bleached shellac emulsions at 25^{o}C (n=3)…….	48
28	Strain dependence of G' for gels at ω = 1 Hz under 25^{o}C……..	50
29	Strain dependence of G' for emulsions at ω = 1 Hz under 25^{o}C……	51
30	Frequency (0.1-10 Hz) dependence of G' and G'' for gels at 25^{o}C……	52
31	Frequency (0.1-10 Hz) dependence of G* and η* for gels at 25^{o}C……..	52
32	Frequency (0.1-10 Hz) dependence of loss tangent (tan δ) for gels at 25^{o}C……	53
33	Frequency (0.1-10 Hz) dependence of G' and G'' for emulsions at 25^{o}C……	54
34	Frequency (0.1-10 Hz) dependence of G* and η* for emulsions at 25^{o}C	54
35	Frequency (0.1-10 Hz) dependence of loss tangent (tan δ) for emulsions at 25^{o}C……	55
36	Temperature (20-45^{o}C) dependence of G' and G'' for gels at frequency of 1 Hz……	56
37	Temperature (20-45^{o}C) dependence of G' and G'' for emulsions at frequency of 1 Hz……	57
38	DSC curves of *in situ* forming gels and their compositions……	60
39	DSC curves of *in situ* forming microparticles and their compositions	62
40	TG curves of *in situ* forming gels and their compositions……..	63
41	DTGA curves of *in situ* forming gels and their compositions……	64
42	TG curves of *in situ* forming microparticles and their compositions….	65
43	DTGA curves of *in situ* forming microparticles and their compositions	66
44	Transformation of ISM with phase ratio of 1:1 (external phase: internal phase) comprising 5% GMS of external phase or 2.5% of whole system within 3 min……	69
45	Transformation of systems with different ratios of external an internal phase: 5:5; 6:4; 7:3; 8:2 and 9:1 after contacting PBS pH 6.8 at 10 sec at magnitude of 20X……	70
46	Transformation of systems using 2-pyrrolidone as solvent with different ratios of external and internal phase: a) 5:5; b) 4:6; c) 3:7; d) 2:8 and e) 1:9 after contacting PBS pH 6.8 at10 sec at magnitude of 20X……...	71
47	Transformation of doxycycline hyclate-loaded systems with different ratios of external and internal phase: 5:5; 6:4; 7:3; 8:2 and 9:1 after contacting PBS pH 6.8 at 10 sec at magnitude of 20X…….	71
48	Release of DMSO, NMP and PYR from *in situ* forming gels in PBS pH 6.8 within 21 days (n=3)……	72
49	Initial solvent release of *in situ* forming gels in PBS pH 6.8 within 1 day (n=3)…….	73
50	Release of DMSO, NMP and PYR from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 21 days (n=3)……	74
51	Initial release of DMSO, NMP and PYR from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 1 day (n=3)……	74
52	Drug release from *in situ* forming gels in PBS pH 6.8 within 21 days	76
53	Initial drug release of *in situ* forming gels in PBS pH 6.8 within 1 day	77
54	Drug release from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 21 days	78

(n=3)……..

55 Initial drug release from *in situ* forming microparticles in PBS pH 6.8 within 1 day (n=3)…….. 78

56 Identification of unknown peak by peak purity analysis mode of a release medium from DXP gel as specimen…… 79

57 Identification of unknown peak by peak purity analysis mode from diluted DXP gel in acetonitrile as reference peaks……. 80

58 Dynamic change in total mass of *in situ* forming gels (n=3)……. 84

59 Dynamic change in mass of bleached shellac from *in situ* forming gels (n=3)……... 85

60 Dynamic change in water content of *in situ* forming gels (n=3)…… 85

61 Dynamic change in total mass of *in situ* forming microparticles (n=3) 86

62 Dynamic change in mass of bleached shellac from *in situ* forming microparticles (n=3)……... 87

63 Dynamic change in water content of *in situ* forming microparticles (n=3)……... 87

64 Water diffusion of *in situ* forming gels (n=3)……. 89

65 Water diffusion of *in situ* forming microparticles (n=3)…… 89

66 Water diffusion of *in situ* forming microparticles (n=3)…… 93

67 Solvent diffusion distance of *in situ* forming gels prepared with different solvents (n=3)……... 94

68 Solvent diffusion rate of *in situ* forming gels prepared with different solvents (n=3)……. 94

69 Visual image of solvent diffusion from *in situ* forming microparticles prepared with different solvents……. 95

70 Solvent diffusion distance of *in situ* forming microparticles prepared with different solvents (n=3)……... 96

71 Solvent diffusion rate of *in situ* forming microparticles prepared with different solvents (n=3)……... 96

72 Photograph of *in situ* forming gels without drug loading in agarose pocket: a) DMSO gel, b) NMP gel, and c) PYR gel……. 101

73 Photograph of *in situ* forming gels with drug loading in agarose pocket: a) DXDM gel, b) DXN gel, and c) DXP gel…… 102

74 Maximum deformation force or hardness of *in situ* forming gels (n=6), * p≤0.05……..... 102

75 Ratio of remaining force/maximum deformation force or ratio of elasticity/plasticity of *in situ* forming gels (n=6) * p≤0.05……. 102

76 Photograph of *in situ* forming microparticles without drug loading in artificial periodontal pocket: a) DMSO ism and b) PYR ism… 103

77 Photograph of drug-loaded *in situ* forming microparticles in artificial periodontal pocket: a) DXDM ism and b) DXP ism…… 103

78 Maximum deformation force or hardness of *in situ* forming microparticles (n=6), * p≤0.05……... 104

79 Ratio of remaining force/maximum deformation force or ratio of elasticity/plasticity of *in situ* forming microparticles (n=6), * p≤0.05……. 104

80 XRD spectra of the pure polymer and *in situ* forming gels after release test……... 106
81 XRD spectra of the pure polymer and *in situ* forming microparticles after release test…….. 107
82 Scanning electron micrographs of *in situ* forming gel after release test at different times at magnitude 100X…….. 109
83 Scanning electron micrographs of *in situ* forming gel after release test at different time at magnitude 500X…… 109
84 Scanning electron micrographs of ISM after release test at different time at magnitude 100X…….. 110
85 Scanning electron micrographs of ISM after release test at different time at magnitude 500X…….. 111
86 Calibration curve of DMSO in phosphate buffer pH 6.8 for the in vitro release study (UV-vis HPLC at 220 nm)…… 137
87 Calibration curve of NMP in phosphate buffer pH 6.8 for the in vitro release study (UV-vis HPLC at 220 nm)…… 137
88 Calibration curve of PYR in phosphate buffer pH 6.8 for the in vitro release study (UV-vis HPLC at 220 nm)…… 138
89 Calibration curve of doxycycline hyclate in DMSO and phosphate buffer pH 6.8 for the in vitro release study (UV-vis HPLC at 273 nm)……... 138
90 Calibration curve of doxycycline hyclate in NMP and phosphate buffer pH 6.8 for the in vitro release study (UV-vis HPLC at 273 nm)……..... 139
91 Calibration curve of doxycycline hyclate in PYR and phosphate buffer pH 6.8 for the in vitro release study (UV-vis HPLC at 273 nm)……..... 139

List of Abbreviations

%w/w	percent weight by weight
%	percent
α	alpha
β	beta
η	consistency index
ω	frequency
δ	solubility parameter
γ	strain
γ_{c}	critical strain
η^{*}	complex viscosity
®	trademark
^{o} C	degree Celsius
±	plus per minus
µg	microgram(s)
µm	micrometer(s)
2θ	two theta
Abs	absorbance
AR grade	analytical reagent grade
BS	bleached shellac
cm	centimeter(s)
cm^2	square centimeter
cps	centipoise
CO., LTD.	Company Limited
D/cm^2	Dyne/square centimeter
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSC	differential scanning calorimetry
e.g.	(Latin); for example
Eq.	equation
et al.	and others
etc.	et cetera (Latin); and other things/ and so forth
$F_{\text{max deformation}}$	maximum deformation force
$F_{\text{remaining}}$	remaining force
g	gram (s)
G’	elastic modulus, shear storage
G’’	viscous modulus, shear loss
G^{*}	complex modulus
GMS	glycerol monostearate
h	hour(s)
Hz	hertz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISM or ism	*in situ* forming microparticle
k	release rate
L	liter(s)
Log	logarithm
LVR	Linear viscoelastic region curves
mg	milligram(s)
min	minute(s)
mL	milliliter(s)

List of Abbreviations

msc	model selection criterion
MW	molecular weight
N	newton
No.	number
n	solvent release exponent value
ng	nanogram(s)
nm	nanometer(s)
NMP	*N*-methyl-pyrrolidone
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug
o/o	oil in oil
PBS	phosphate buffer solution
pH	potential hydrogenii (Latin); power of hydrogen
PYR	2-pyrrolidone
r^2	coefficient of determination
rpm	revolutions per minute
s	sec(s)
SEM	scanning electron microscope
SD	standard deviation
tan δ	loss tangent
TG	thermogravimetry
TGA	thermogravimetry analysis
UV/vis	Ultraviolet-visible
XRD	X-ray powder diffraction