

UTILIZACIÓN DE NANOCRISTALES EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Cristina Rodríguez Riscardo



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

Utilización de nanocristales en Tecnología Farmacéutica

Cristina Rodríguez Riscardo

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Tutora: María Luisa González Rodríguez

Revisión bibliográfica

(Sevilla, 16 de junio 2022)

RESUMEN

Los problemas de solubilidad de los fármacos constituyen, en la mayoría de los casos, la principal limitación para obtener una adecuada biodisponibilidad. En algunos casos, el uso de estrategias de solubilización, como la formación de sales, el empleo de cosolventes y tensioactivos, la formación de cocristales, el empleo de complejos de inclusión (ciclodextrinas), los sistemas autoemulsionantes o la micronización, entre otros, no resultan eficaces. Los nanocristales surgen como una alternativa de reducción del tamaño de partícula, al igual que la micronización pero, en este caso, hasta escala nanométrica.

El objetivo principal del presente trabajo es el de realizar una revisión bibliográfica sobre la aportación de los nanocristales en la Tecnología Farmacéutica. Para ello, se han recopilado datos relevantes tras la lectura de diferentes artículos científicos.

Los nanocristales son sistemas versátiles que pueden administrarse por diferentes vías, principalmente por las vía oral e intravenosa, así como por las vías pulmonar, percutánea y oftálmica, entre otras. Entre sus principales características se encuentran la capacidad de mejorar la solubilidad, aumentar la velocidad de disolución e incrementar la adhesividad del fármaco a las mucosas, lo que repercutiría en un aumento de la biodisponibilidad de moléculas activas poco solubles. Se ha demostrado que los nanocristales pueden ser también empleados para la vectorización de fármacos.

Actualmente se dispone en el mercado mundial de algunos medicamentos que contienen nanocristales. A pesar de que los problemas de solubilidad suponen una importante limitación, los nanocristales pueden resultar muy eficaces para combatirla. Sin embargo, son necesarios más estudios que avalen su seguridad.

Palabras clave: nanocristal, nanosuspensión, solubilidad, velocidad de disolución

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	7
3. METODOLOGÍA.....	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4.1. Concepto	9
4.2. Características y propiedades de los nanocristales.....	11
4.2.1. Solubilidad	11
4.2.2. Velocidad de disolución.....	12
4.2.3. Adhesividad	13
4.2.4. Otros aspectos	14
4.3. Métodos de producción	14
4.3.1. Métodos <i>Top-Down</i>	16
4.3.2. Métodos <i>Bottom-Up</i>	18
4.3.3. Combinación de métodos.....	20
4.4. Aplicaciones	21
4.4.1. Vía oral	21
4.4.2. Vía intravenosa	23
4.4.3. Vía pulmonar	25
4.4.4. Vía oftálmica	26
4.4.5. Vía percutánea.....	27
4.4.6. Vectorización de fármacos	29
4.5. Comportamiento in vivo y nanotoxicidad	30
4.6. Medicamentos comercializados.....	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ANEXO

Índice de tablas:

Tabla 1. Listado de palabras claves utilizadas en la búsqueda de artículos

Tabla 2. Ejemplos de estabilizantes empleados en la producción de nanocristales y sus características

Tabla 3. Ecuaciones que explican el aumento de solubilidad

Tabla 4. Ecuación de Noyes-Whitney

Tabla 5. Características de las tecnologías top-down

Tabla 6. Características de las tecnología bottom-up

Tabla 7. Características de la combinación de métodos

Tabla 8. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía oral

Tabla 9. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía intravenosa

Tabla 10. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía pulmonar

Tabla 11. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía ocular

Tabla 12. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía percutánea

Tabla 13. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vectorización de fármacos

Tabla 14. Ejemplos de medicamentos basados en nanocristales actualmente aprobados por la FDA

Índice de figuras:

Figura 1. Representación esquemática de la distribución de fármaco según el tipo de nanopartícula

Figura 2. Diagrama de porcentaje de bibliografía

Figura 3. Representación esquemática de las diferentes clases del sistema DCS, con sus características y posibles formulaciones para los fármacos de dichas clases

Figura 4. Representación del aumento de la curvatura (ρ_r) de la superficie de las partículas al disminuir el tamaño y, en consecuencia, aumento de la presión de vapor de las gotículas

Figura 5. Representación del aumento del área superficial al disminuir el tamaño de partícula

Figura 6. Representación esquemática del aumento de la adhesividad al disminuir el tamaño de partícula

Figura 7. Representación esquemática de algunos ejemplos de posibles modificaciones de la superficie de los nanocristales

Figura 8a. Esquema de los diferentes métodos de producción de nanocristales

Figura 8b. Esquema representativo de la obtención de nanocristales

Figura 9. Representación esquemática del piston-gap y jet-stream (microfluidizador)

Figura 10. Representación esquemática de las diferentes vías posibles para la administración de nanocristales

Figura 11. Resumen de parámetros farmacocinéticos de domperidona libre, domperidona en nanocrystal, cápsulas de nanocristales de domperidona y domperidona comercializada

Figura 12. Parámetros farmacocinéticos de CZ48 y Camptotecina formulados con cosolventes, en nanosuspensión con tamaño de partícula menor (NS-S) y mayor (NS-L)

Figura 13. Tabla comparativa de parámetros aerodinámicos de nanosuspensiones de curcumina, beclometasona y nanosuspensión multicomponente

Figura 14. Concentraciones del metabolito activo de fluorometolona (A y B) y fluometolona (C y D) a diferentes tiempos

Figura 15. Cantidad de fármaco que penetra a través de las diferentes capas de la piel en diferentes formas farmacéuticas de apremilast

Figura 16a. Absorción por parte de células tumorales de nanocristales de carfilzomib modificadas con albúmina y marcadas con rodamina

Figura 16b. Representación gráfica de la capacidad de disminuir el crecimiento del tumor de tanto de carfilzomib en ciclodextrina como de carfilzomib formulado como nanocrystal con superficie modificada con albúmina

Figura 17. Representación esquemática de las diferentes clases dentro del Sistema de Clasificación Nanotoxicológica

1. INTRODUCCIÓN

El rápido desarrollo de la química combinatoria y el cribado de alto rendimiento está haciendo que la cantidad de nuevos fármacos para diferentes dianas terapéuticas esté aumentando significativamente (Li et al., 2021). Este hecho podría tener un gran impacto en la terapéutica de diversas enfermedades. Sin embargo, se estima que entre el 70 - 90 % de estos fármacos presentan problemas de solubilidad (Loftsson y Brewster, 2010).

Para que un fármaco, tras su administración, se absorba y pase a circulación sistémica, es imprescindible que llegue disuelto al lugar de absorción. Por tanto, el proceso de disolución se convierte en la etapa limitante de los fármacos poco solubles y esto hace que presenten una biodisponibilidad baja y variable.

Existen diferentes estrategias para aumentar la solubilidad de los fármacos. El método más directo es mediante la generación de una sal. Sin embargo, para ello, el fármaco debe ser ionizable. En caso de que así no sea, existen otras estrategias ampliamente conocidas, como son la formación de complejos de inclusión, el empleo de cosolventes o solubilizantes (tensoactivos), la disminución del tamaño de partícula y la incorporación a emulsiones, microemulsiones o dispersiones sólidas, entre otros (Merisko-Liversidge et al., 2003).

Desafortunadamente, a pesar de que estas estrategias hayan resultado útiles para ciertos fármacos, muestran una serie de limitaciones. En el caso de las ciclodextrinas, se requiere de un tamaño y una conformación concreta. Por otro lado, existe riesgo de que aparezcan efectos secundarios con el empleo de cosolventes y solubilizantes. Por último, la disminución del tamaño de partícula hasta su micronización no resulta ser suficiente para aumentar la solubilidad de algunos principios activos (Junghanns y Müller, 2008).

En la pasada década surgió la nanotecnología como una estrategia de reducción del tamaño de partícula hasta escala nanométrica (Farokhzad y Langer, 2009). En este campo, las nanopartículas poliméricas, los liposomas, las nanoemulsiones y las nanopartículas lipídicas (Müller et al., 2011) se presentan por sus ventajas en cuanto al incremento de la biodisponibilidad de los fármacos poco solubles. No obstante, presentan una serie de inconvenientes. Las formulaciones basadas en nanotecnología muestran baja carga de fármaco, baja estabilidad a largo plazo y requieren gran cantidad de solubilizantes, lo cual puede incrementar el riesgo de toxicidad (Patel et al., 2018).

En los años 90, la empresa americana Elan Nanosystem dio un paso hacia delante con el desarrollo de los nanocristales (Liversidge et al., 1992). Los nanocristales, que también forman

parte de la nanotecnología, pueden vencer las desventajas que tienen el resto de los sistemas nanométricos (Fig. 1) (Junghanns y Müller, 2008).

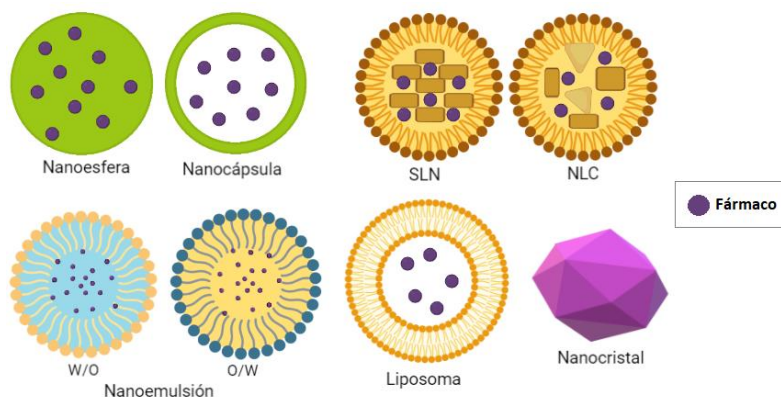


Figura 1. Representación esquemática de la distribución de fármaco según el tipo de nanopartícula

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las ventajas que ofrecen los fármacos formulados como nanocristales hacen que puedan ser administrados por diferentes vías. La vía oral es la más popular debido a su gran aceptación por parte de los pacientes y por su bajo coste. Debido a ello, los formuladores suelen tener dicha vía de administración como prioridad a la hora de formular un principio activo. Otras vías de administración también serían adecuadas para administrar los nanocristales, como la vía parenteral, pulmonar, percutánea y oftálmica, por ejemplo. En todas ellas, se podría conseguir aumentar los valores de solubilidad de los fármacos, con el consiguiente incremento en los valores de biodisponibilidad por las diferentes vías. Además, los nanocristales podrían ser una buena opción para la vectorización de fármacos en el tratamiento de diversos tipos de cáncer y otras patologías, debido a su capacidad para ser funcionalizadas en su superficie (Chang et al., 2015).

En base a estos antecedentes, el **objetivo general** del presente trabajo se centra en realizar una revisión bibliográfica sobre la aportación de fármacos formulados como nanocristales en la mejora de sus propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y farmacocinéticas.

Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

1. Recopilar información sobre las generalidades y peculiaridades de los nanocristales.
2. Conocer los procedimientos de elaboración de estos sistemas.
3. Describir algunas aplicaciones de los nanocristales como sistemas de administración de fármacos por diferentes vías.
4. Analizar algunos aspectos toxicológicos sobre el uso de los nanocristales.

3. METODOLOGÍA

La información necesaria para la realización del trabajo ha sido obtenida de la base de datos electrónica “Web of Science”.

Para poder tener acceso a los artículos, se accedió a la base de datos “Web of Science” a través de la herramienta proporcionada por la biblioteca de la Universidad de Sevilla “famaUS”. Dentro de dicha base de datos, los artículos se buscaron introduciendo las palabras claves y filtros que se recogen en la Tabla 1:

Tabla 1. Listado de palabras claves utilizadas en la búsqueda de artículos

Palabra clave	Filtros
<i>Nanocrystal AND drug delivery</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanocrystal AND drug delivery</i>	5 últimos años Revisiones Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanocrystal AND drug delivery</i>	-
<i>Nanocrystal AND technology AND drug</i>	5 últimos años Artículos y revisiones Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanocrystal AND technology AND drug</i>	-
<i>Nanocrystal techonology</i>	5 últimos años Artículos y revisiones Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanocrystal AND formulation</i>	5 últimos años Artículos y revisiones Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanosuspension</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanosuspension</i>	5 últimos años Revisiones Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanocrystals AND oral</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanocrystals AND ocular</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanosuspension AND pulmonary</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanosuspension AND intravenous</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy

<i>Nanosuspension AND targeting</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy
<i>Nanosuspension AND dermal</i>	5 últimos años Artículos de investigación Categoría: Pharmacology & Pharmacy

Los artículos han sido elegidos tras la lectura del *abstract*, rechazándose aquellos no relacionados con el objetivo del presente trabajo. A través de la lectura de los artículos seleccionados, se obtuvo el resto de la bibliografía que no había aparecido en la búsqueda principal. En total, han sido utilizados 66 artículos, de los cuales 32 se obtuvieron de Web Of Science y 34 extraídos de la bibliografía de dichos artículos. Además, la bibliografía cuenta con 2 patentes y 2 capítulos de libros (Fig. 2).

■ Artículos de Web Of Science
■ Artículos de la bibliografía
■ Patentes
■ Capítulos de libros

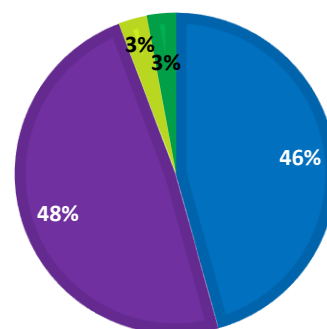


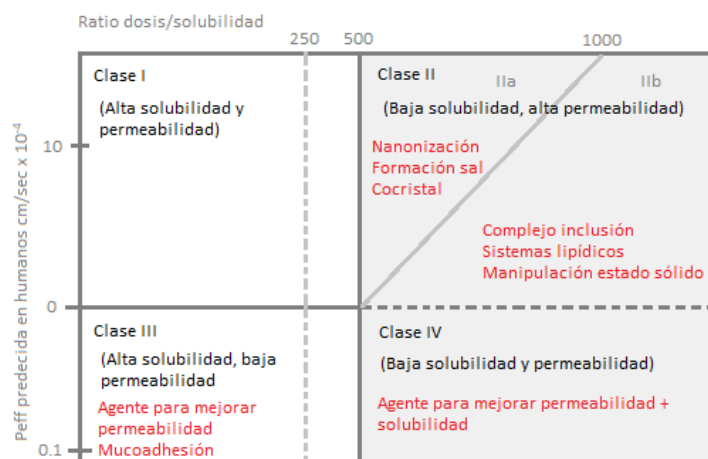
Figura 2. Diagrama de porcentaje de bibliografía

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concepto

Los nanocristales son partículas sólidas de fármaco (100% fármaco) cuyo tamaño ha sido reducido a escala nanométrica (1-1000 nm). Si estos nanocristales se encuentran dispersos en un medio acuoso o no acuoso junto con estabilizantes, tenemos lo que se conoce como nanosuspensión (Suman Kattaboina et al., 2009). El término “nanocristal” no debe confundirse con el de “nanopartícula”. Las nanopartículas, al contrario que los nanocristales, no están constituidos en su totalidad por el fármaco. Éste es un término más general y hace referencia a partículas en estado nanométrico, principalmente partículas poliméricas y lipídicas como son los liposomas, las nanopartículas sólidas lipídicas y las nanopartículas poliméricas (Gigliobianco et al., 2018).

Los principales fármacos candidatos para ser formulados como nanocristales son aquellos con baja solubilidad cuyo factor limitante es la velocidad de disolución. Estos fármacos se suelen encontrar en la clase II del sistema de clasificación BCS (*Biopharmaceutic Classification System*) y más concretamente en la clase IIa del sistema DCS (*Developability Classification System*) (Fig. 3) (Möschwitzer, 2013).



*Peff: Permeabilidad efectiva en yeyuno

Figura 3. Representación esquemática de las diferentes clases del sistema DCS, con sus características y posibles formulaciones para los fármacos de dichas clases (Adaptada de Möschwitzer, 2013)

El sistema de clasificación DCS es una modificación del sistema BCS, siendo más útil para determinar el comportamiento *in vivo* en humanos. Con esta clasificación, la clase II del sistema BCS queda dividido en dos: IIa y IIb. La clase IIa reúne aquellas partículas con baja solubilidad y cuyo factor limitante es la velocidad de disolución, mientras que en la clase IIb se encuentran las partículas cuyo factor limitante es la solubilidad (Butler y Dressman, 2010).

Como se ha mencionado, las nanosuspensiones están constituidas por nanocristales suspendidos en un medio líquido que contiene estabilizantes. Por otro lado, los nanocristales sólidos también pueden llevar estabilizantes. Los estabilizantes que más se emplean son los tensioactivos, los polímeros y mezclas de ambos. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos y el mecanismo de acción por el que consiguen estabilizar al fármaco.

Los tensioactivos iónicos estabilizan los nanocristales por impedimento electrostático. En este caso, el estabilizante es adsorbido por la superficie del nanocrystal y una vez que esto tiene lugar, se forma una doble capa de carga alrededor de este. Cuando dos partículas de fármaco estabilizadas con este tipo de tensioactivo se vean atraídas, la distancia entre ambas irá disminuyendo hasta llegar a un límite. En este límite, la doble capa de carga se repelerá con la doble capa de carga de la otra partícula de fármaco, impidiendo entonces que el acercamiento suceda (Li et al., 2021).

En el caso de los polímeros y los tensioactivos no iónicos, el mecanismo de estabilización es por impedimento estérico. En esta situación, lo que ocurre es que las moléculas hidrofóbicas de tensioactivo o las cadenas hidrofóbicas de los polímeros son adsorbidas por la superficie del

nanocristal e impiden/limitan el movimiento de las partículas de fármaco de tal forma que estas mantengan la distancia las unas de las otras (Li et al., 2021).

Tabla 2. Ejemplos de estabilizantes empleados en la producción de nanocristales y sus características (Chang et al., 2015; Li et al., 2021)

Estabilizante	Categoría	Mecanismo
Cremophor® EL	Tensioactivo no iónico	Impedimento estérico
Tiloxapol	Tensioactivo no iónico	Impedimento estérico
Lecitina	Tensioactivo no iónico	Impedimento estérico
Lauril sulfato sódico (LSS)	Tensioactivo iónico	Impedimento electrostático
Poloxámero 338	Tensioactivo no iónico	Impedimento estérico
Goma arábiga	Polímero	Impedimento estérico
Alcohol polivinílico	Polímero	Impedimento estérico
Hidroxipropilcelulosa (HPC)	Polímero	Impedimento estérico
Povidona K15	Polímero	Impedimento estérico
Carbopol® 975 P - Tween® 80	Polímero - Tensioactivo	Impedimento estérico y electrostático
HPC - LSS	Polímero - Tensioactivo	Impedimento estérico y electrostático
Hidroxipropilmeilcelulosa (HPMC) - Tween® 80	Polímero - Tensioactivo	Impedimento estérico y electrostático
Alcohol polivinílico - Poloxámero 188	Polímero - Tensioactivo	Impedimento estérico y electrostático

4.2. Características y propiedades de los nanocristales

Como se ha comentado previamente, los nanocristales están compuestos por el fármaco en su totalidad y poseen tamaño nanométrico. Además, es importante destacar tres aspectos fundamentales de los nanocristales como son su capacidad para aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución y la posibilidad de aumentar la adhesividad del fármaco (Müller et al., 2011).

4.2.1. Solubilidad

La solubilidad es la capacidad que tiene una sustancia en disolverse en un disolvente. La solubilidad de partículas con tamaño micrométrico o superior es constante. Sin embargo, en el caso partículas de tamaño inferior a 1000 nm, la solubilidad aumenta (Zhou et al., 2016). Tres ecuaciones respaldan esta afirmación (Tabla 3):

Tabla 3. Ecuaciones que explican el aumento de solubilidad (Zhou et al., 2016).

Ecuación	Explicación
Ecuación de Kelvin: $\ln \frac{P_r}{P_\infty} = \frac{2 \gamma M r}{r R T \rho}$ P _r =Presión de disolución de una partícula con radio r	La presión de vapor de las gotas lipídicas que pasan a estado gaseoso (aerosol) aumenta acompañada de un aumento en la curvatura de la superficie de estas partículas.

<p>γ=Tensión superficial entre dos partículas M_r=Peso molecular de la partícula P_∞=Presión de disolución teórico de una partícula con longitud infinita r=radio R=Constante del gas T=Temperatura absoluta δ=Densidad de la partícula</p>	
<p>Ecuación de Ostwald-Freundlich:</p> $\text{Log} \frac{C_s}{C_\alpha} = \frac{2\sigma V}{2.303RT r \rho}$ <p>C_s=Solubilidad C_α=Solubilidad de partículas grandes de la sustancia sólida σ=Tensión interfacial de la partícula V=Volumen molar de la partícula R= Constante del gas T= Temperatura absoluta δ=Densidad</p>	<p>La solubilidad (C_s) es inversamente proporcional al radio de la partícula (R).</p>
<p>Ecuación de Prandt:</p> $h_H = k \left(\frac{L^{1/2}}{V^{1/2}} \right)$ <p>h_H=Espesor capa límite hidrodinámica k=Constante L=Longitud de la superficie de la partícula en dirección del flujo V=Velocidad de flujo de líquido que rodea a la partícula</p>	<p>El espesor de la capa de difusión es dependiente del tamaño de partícula.</p>

Los nanocristales presentan un pequeño tamaño de partícula, lo cual, según las ecuaciones anteriores, explica por qué aumentan la solubilidad del fármaco (Fig. 4).

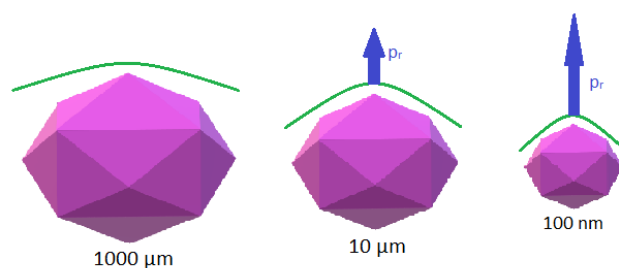


Figura 4. Representación del aumento de la curvatura (p_r) de la superficie de las partículas al disminuir el tamaño y, en consecuencia, aumento de la presión de vapor de las gotículas

4.2.2. Velocidad de disolución

La velocidad de disolución expresa la mayor o menor rapidez con la que se disuelve un soluto en un disolvente. En este caso, es la ecuación de Noyes-Whitney la que explica cómo los nanocristales aumentan la velocidad de disolución (Tabla 4).

Tabla 4. Ecuación de Noyes-Whitney (Zhou et al., 2016).

Ecuación	Explicación
Ecuación de Noyes-Whitney: $\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C)$ dC/dt=Velocidad de disolución D=Coficiente de difusión S=Área superficial V=Volumen medio de disolución h=Longitud capa de difusión C _s =Solubilidad de la partícula C=Concentración de la partícula en la solución	La velocidad de disolución (dC/dt) es proporcional al área superficial (S). A mayor área superficial, mayor velocidad de disolución.

La disminución del tamaño de partícula supone un aumento en el área superficial (Fig. 5), y éste, da como resultado un incremento de la velocidad de disolución.

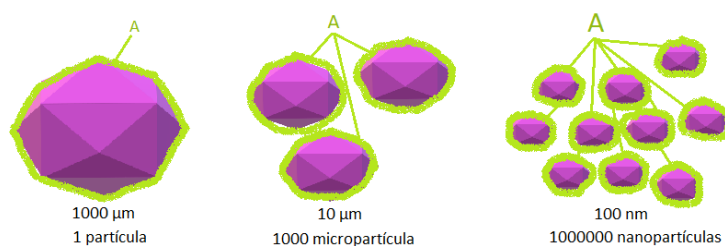


Figura 5. Representación del aumento del área superficial al disminuir el tamaño de partícula

4.2.3. Adhesividad

Anteriormente, se ha mostrado que, a menor tamaño de partícula, existe una mayor área superficial. Este incremento del área superficial hace que aumenten las fuerzas de interacción entre las partículas y la superficie (Fig. 6). Debido a ello, una mayor adhesión consigue que el fármaco permanezca mayor tiempo en el lugar de absorción (Gigliobianco et al., 2018).

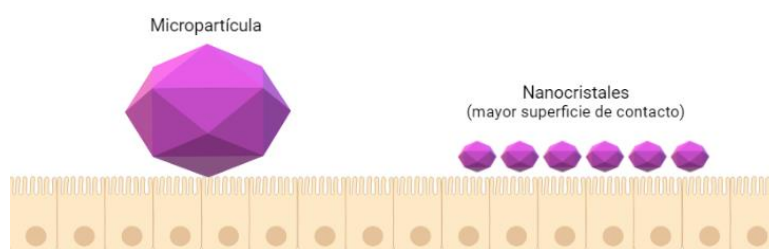


Figura 6. Representación esquemática del aumento de la adhesividad al disminuir el tamaño de partícula

Se ha demostrado que la superficie de los nanocristales se puede funcionalizar pudiendo incrementarse aún más la adhesividad de fármacos a las mucosas. Además, esta funcionalización puede mejorar el targeting sitio-específico de fármacos administrados por vía intravenosa (Fig. 7) (Zhou et al., 2016).

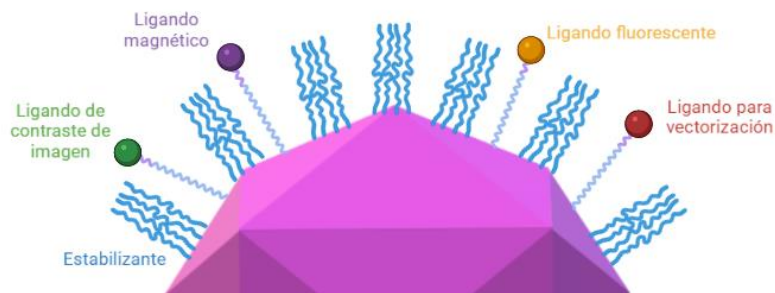


Figura 7. Representación esquemática de algunos ejemplos de posibles modificaciones de la superficie de los nanocristales

4.2.4. Otros aspectos

A diferencia de otros sistemas nanoparticulares, los nanocristales muestran una mayor carga del fármaco, consiguiendo que sea necesario un menor **volumen de dosificación** en el caso de las nanosuspensiones (el fármaco en estado sólido se encuentra suspendido en el líquido) (Dong et al., 2019).

Sin embargo, la **estabilidad** es el punto débil de los nanocristales, ya que sufren el fenómeno que se conoce como maduración de Ostwald. Este fenómeno consiste en que, al mostrar mayor área superficial, la energía libre de Gibbs se ve incrementada y estas partículas tienden a disminuir dicha energía aumentando el tamaño de los cristales, formando agregados y dando lugar a fenómenos de floculación. Para evitar la aparición de este fenómeno, se deben emplear adecuadamente los estabilizantes mencionados en apartados anteriores (Zhou et al., 2016).

No obstante, a pesar de la necesidad de emplear estabilizantes, al no ser la cantidad de estos elevada, el uso de nanocristales supone un menor riesgo de toxicidad en comparación con otras nanopartículas (Patel et al., 2018).

Por último, en cuanto a su **administración**, los nanocristales permiten ser administrados por diferentes vías (oral, parenteral, ocular, tópica, etc.) y se pueden formular tanto como cápsulas y comprimidos como en suspensiones (Gigliobianco et al., 2018).

4.3. Métodos de producción

Los métodos de producción más empleados para obtener nanocristales son el molino de bolas vía húmeda (WBM, *Wet Ball Milling*) y la homogeneización a alta presión (HPH, *High Pressure Homogenization*). Estas técnicas se engloban en lo que se denomina método *Top-Down*, el cual se denomina así ya que el tamaño de partícula existente se reduce gradualmente. Además de

este método, existe el método *Bottom-Up*, en el cual las partículas aumentan de tamaño debido a procesos de precipitación, fundamentalmente (Müller et al., 2011).

La nueva generación de tecnologías para la producción de nanocristales está consistiendo en la combinación de ambos métodos.

En definitiva, hay disponible tres modos de obtener nanocristales: método *Top-Down*, método *Bottom-Up* y combinación de métodos. La aplicación de una u otra depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo, del tamaño de partícula deseado, así como de los recursos disponibles. En la Figura 8a se recogen los equipos empleados en ambos tipos de procesos. Así mismo, en la Figura 8b se presenta un esquema representativo de las etapas de obtención de las nanosuspensiones y nanocristales (Zhou et al., 2016).

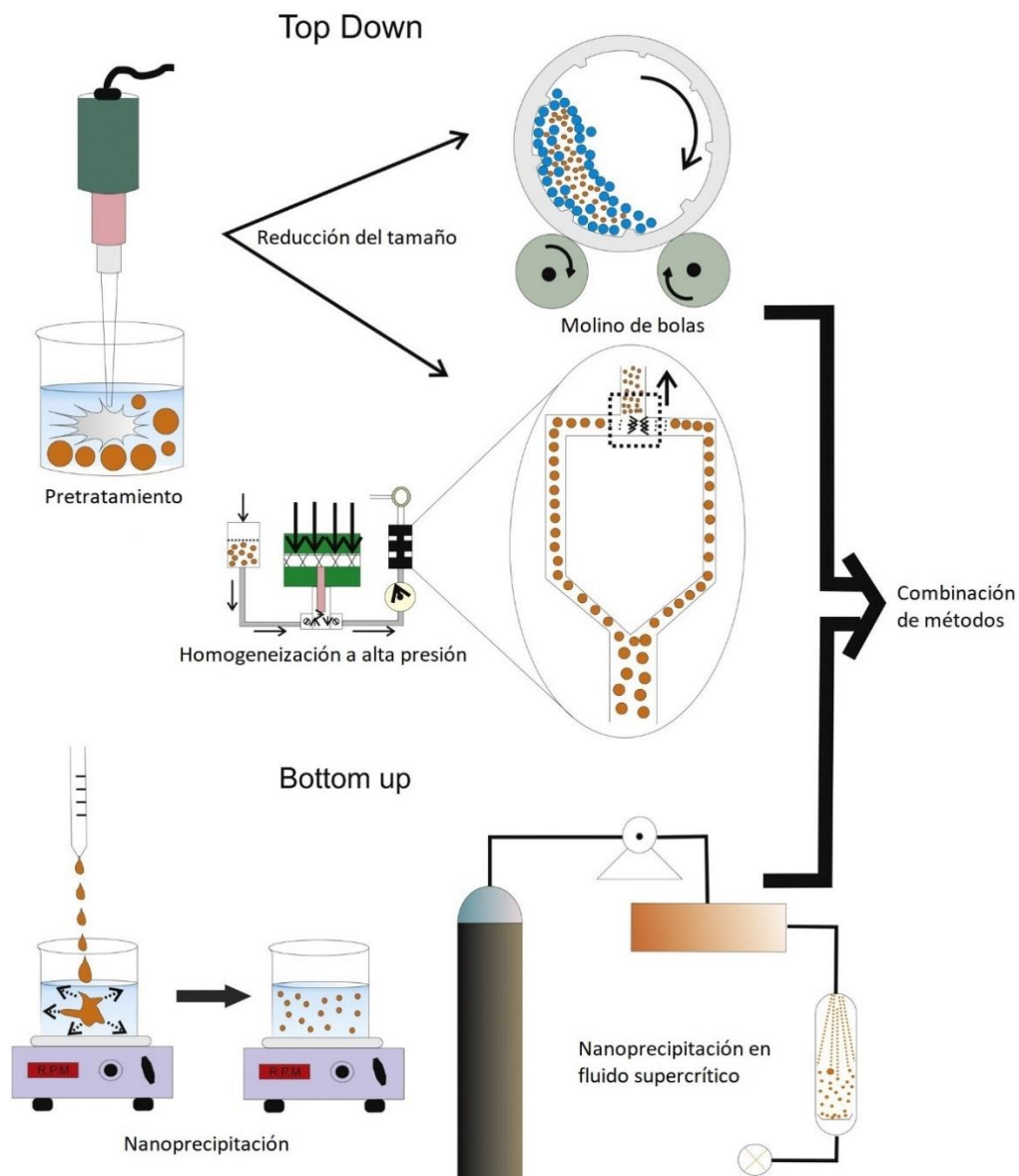


Figura 8a. Esquema de los diferentes métodos de producción de nanocristales (Adaptada de Pawar et al., 2014)

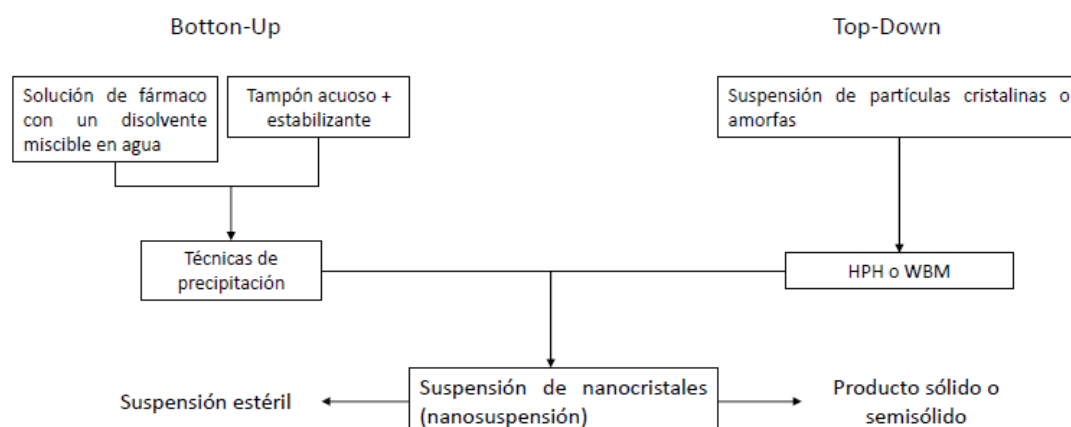


Figura 8b. Esquema representativo de la obtención de nanocristales (Adaptada de Sun y Yeo, 2012)

4.3.1. Métodos *Top-Down*

El método *Top-Down* se basa en el paso de partículas de tamaño micrométrico al nanométrico (Junghanns y Müller, 2008), por medio de procesos de desintegración que consumen gran energía. En la Tabla 5 se recogen un resumen de las técnicas empleadas aplicando este método, con sus ventajas e inconvenientes.

Tabla 5. Características de las tecnologías *top-down* (Patravale et al., 2004; Merisko-Liversidge y Liversidge, 2011; Williams et al., 2013; Chin et al., 2014; Chang et al., 2015)

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Tamaño
Molino de bolas vía húmeda (NanoCrystals®)	<ul style="list-style-type: none"> • Útil para fármacos poco solubles en medios acuosos y orgánicos • Permite el escalado • Buena distribución de tamaño • Flexibilidad a la hora de manejar el fármaco • Consume poca energía 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede haber residuos por desgaste del molino • Proceso lento e inestable 	150-400 nm
Homogeneización a alta presión (IDD-P™, DissoCubes® y Nanopure®)	<ul style="list-style-type: none"> • Permite condiciones asépticas • Aplicable universalmente • Fácil purificación • Permite la producción en condiciones anhidras (el resto de las ventajas son las mismas que para el molino de bolas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita que las partículas estén previamente micronizadas y que se encuentren en suspensión • Consume mucha energía • Requiere de experiencia para su empleo 	40-500 nm

- Molino de bolas vía húmeda (NanoCrystals®):

Esta tecnología fue desarrollada por Liversidge et al. (1992). Es la más empleada ya que es bastante simple y se puede emplear en cualquier tipo de laboratorio (Möschwitzer, 2013).

Consta de un recipiente que lleva incorporado un agitador, bolas para la molienda, el medio de dispersión que normalmente es agua, estabilizantes y el fármaco que va a ser nanonizado (Salazar et al., 2014). Es necesario que el principio activo esté previamente micronizado (Sinha et al., 2013). Las bolas, de tamaño comprendido entre 0.2-0.6 mm (Sinha et al., 2013), suelen ser de acero inoxidable, cristal, cerámica o de resina de poliestireno (Salazar et al., 2014). Mediante esta técnica, el fármaco sufre la reducción de su tamaño gracias a las fuerzas de cizalla y de colisión con las bolas y las paredes del recipiente (Chang et al., 2015). La producción mediante molino de bolas vía húmeda puede llevarse a cabo a baja energía (LE-WBM) o a alta energía (HE-WBM). Con el fin de producir nanocristales a gran escala, resulta más conveniente el de alta energía puesto que acortan los tiempos de producción. Además, puede realizarse en lotes o de forma continua (Möschwitzer, 2013).

- Homogeneización a alta presión:

Tras el molino de bolas vía húmeda, es la técnica más utilizada. Emplea altas presiones para reducir el tamaño de partícula. En este tipo de homogeneización, los procesos de reducción del tamaño están basados en los principios del *piston-gap* y del *jet-stream* (Fig. 9) (Van Eerdenbrugh et al, 2008; Müller et al., 2011). Como se aprecia en la imagen de la izquierda, en la homogeneización basada en el *piston-gap*, la suspensión que contiene al fármaco, es forzada a pasar por un orificio de pequeño diámetro de tal forma que el tamaño de las partículas de fármaco se reduce. Esta gran reducción del diámetro hace que el líquido empiece a hervir y se formen burbujas que explotan tras salir de dicho orificio. Todo este proceso se realiza a alta presión (1500 bares) e intervienen las fuerzas de colisión, cizalla y cavitación para la reducción del tamaño de partícula (Salazar et al., 2014). Las técnicas Dissocubes® y Nanopure®, desarrolladas por Müller et al. (2000) se basan en el *piston-gap*. Ambas se llevan a cabo a más de 1500 bares; sin embargo, la primera emplea un medio de dispersión acuoso y la segunda uno no acuoso (Müller et al., 2000; Möschwitzer y Müller, 2006; Müller et al., 2011). Por otro lado, en la homogeneización basada en *jet-stream* (microfluidización), que se muestra en la imagen de la derecha, la suspensión es forzada a pasar por dos cámaras diferentes del homogeneizador: la cámara tipo Y y la cámara tipo Z. Esto conlleva la reducción del tamaño de partícula debido a fuerzas de cizalla, colisión y cavitación (Salazar et al., 2014) La empresa SkyPharma Canada Inc. emplea esta técnica para la producción de sus productos (IDD-P) (Majuru y Oyewumi, 2009).

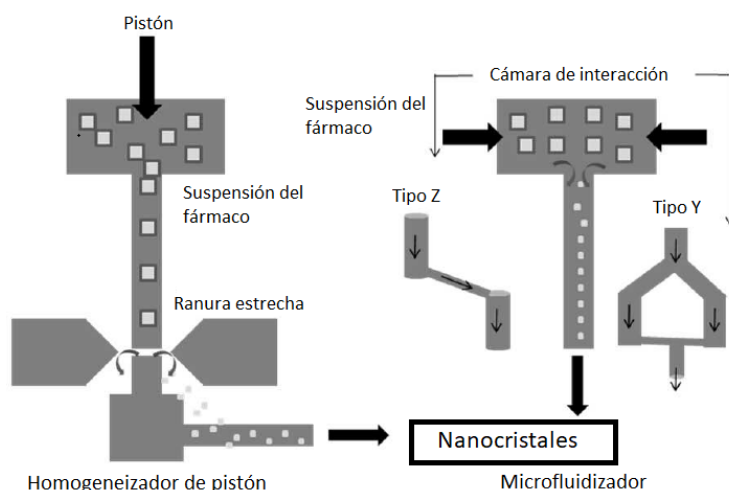


Figura 9. Representación esquemática del piston-gap y jet-stream (microfluidizador) (Adaptada de Nekkanti et al., 2012)

4.3.2. Métodos *Bottom-Up*

La técnica del *Bottom-Up* se basa en la precipitación de partículas a partir de moléculas en disolución (Junghanns y Müller, 2008). Se pueden distinguir cuatro mecanismos diferentes de precipitación: por adición de un antisolvente, en presencia de fluido supercrítico, por eliminación del disolvente y en presencia de procesos de alta energía (método combinado) (Sinha et al., 2013). En la Tabla 6 se recopilan, a modo de resumen, las ventajas e inconvenientes de las técnicas que emplean *Bottom-Up*, así como el tamaño de partícula alcanzado en cada una de ellas.

Tabla 6. Características de las tecnología *bottom-up* (Hu et al. 2002; Cocero et al., 2009; Chan y Kwok, 2011; Kalani y Yunus, 2011; Sinha et al., 2013; Salazar et al., 2014; Chang et al., 2015)

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Tamaño
Hidrosol	<ul style="list-style-type: none"> Permite obtener finas partículas 	<ul style="list-style-type: none"> El fármaco debe ser soluble en al menos un disolvente Requiere del empleo de disolventes orgánicos 	100-400 nm
Nanomorph®	<ul style="list-style-type: none"> Se obtienen amorfos Tienen mayor solubilidad y velocidad de disolución que los cristales 	<ul style="list-style-type: none"> La biodisponibilidad se puede ver afectada por recristalización de componentes no deseables 	5-5000 nm
Ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"> Método simple Reduce el uso de disolventes orgánicos 	<ul style="list-style-type: none"> Largos tiempos de producción 	80-130 nm
HGRP	<ul style="list-style-type: none"> No requiere del uso de estabilizantes 	<ul style="list-style-type: none"> Equipamiento muy especializado que no suele estar disponible en todos los laboratorios 	200-500 nm
EPAS	<ul style="list-style-type: none"> Coste-efectivo Fácil de llevar a cabo Permite el escalado 	<ul style="list-style-type: none"> No adecuado para fármacos termolábiles 	4-2600 nm

RESS	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución de tamaño de partícula uniforme • Requiere de pocas etapas para su producción 	<ul style="list-style-type: none"> • Aglomeración de las partículas más pequeñas 	45-500 nm
SAS	<ul style="list-style-type: none"> • Puede llevarse a cabo a temperatura ambiente • Fácil escalado 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de residuos orgánicos en el producto final 	45-500 nm
SFL	<ul style="list-style-type: none"> • Permite la producción de amorfos porosos y nanocristales más pequeños en forma de solución • Mejora la velocidad de disolución y la biodisponibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • El principio activo debe tener una temperatura de transición vítrea baja 	7000 nm

- Precipitación por adición de un antisolvente:

Es un proceso por el cual las moléculas de principio activo disueltas en un disolvente miscible en agua se mezclan con un antisolvente, el cual suele ser agua. Este es un método muy simple de obtener nanocristales, siendo el más empleado dentro de los métodos que engloba el *Bottom-Up*. Las técnicas Hidrosol, Nanomorph®, precipitación por ultrasonidos, precipitación a alta gravedad (HGRP, *High Gravity Precipitation*) y las técnicas de precipitación basadas en la evaporación (EPAS, *Evaporative Precipitation into Aqueous Solution*) aplican este método (Sinha et al., 2013).

- Precipitación en fluido supercrítico:

Esta técnica hace uso, como su nombre indica, de líquidos supercríticos para la formación de nanocristales. Dentro de este tipo de precipitación se encuentra la técnica RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*) y la técnica SAS (*Supercritical AntiSolvent*). Brevemente, en la primera, el fármaco es solubilizado en el fluido supercrítico, mientras que, en la segunda, el fármaco es disuelto en un disolvente orgánico tal que sea miscible en el fluido supercrítico (Sinha et al., 2013).

- Precipitación por eliminación del disolvente:

Destaca la técnica de *Spray Freezing into Liquid* (SFL), en la cual, el principio activo es disuelto en una mezcla de un disolvente acuoso/orgánico o puramente orgánico con o sin estabilizador y, a continuación, es rociado en nitrógeno líquido para la inmediata precipitación de partículas amorfas (Sinha et al., 2013).

4.3.3. Combinación de métodos

Las técnicas basadas en la combinación de métodos surgen con el fin de superar los inconvenientes que presentan los métodos usados de forma individual. Estas técnicas son NanoEdge®, H96, H42, H69 y CT (*Combinative Technology*) y en la Tabla 7 se recoge información en relación a las ventajas e inconvenientes de estas.

Tabla 7. Características de la combinación de métodos (Salazar et al., 2014; Chang et al., 2015)

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Tamaño
NanoEdge®	<ul style="list-style-type: none"> Reducción del tamaño de partícula 	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de residuos orgánicos en el producto final 	177-930 nm
H96	<ul style="list-style-type: none"> Permite la nanonización de fármacos termolábiles No deja residuos orgánicos 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere un mayor tiempo de liofilización 	62-440 nm
H42	<ul style="list-style-type: none"> Consigue tamaño de partícula menor en menos ciclos de HPH Tiempo de liofilización menor 	<ul style="list-style-type: none"> No es adecuado para principios activos termolábiles 	172-636 nm
H69	<ul style="list-style-type: none"> Reducción del tamaño de partícula 	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de residuos orgánicos en el producto final 	22-921 nm
CT	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo de producción y presión para la homogeneización menores Mejora en la estabilidad física 	<ul style="list-style-type: none"> No se consigue un tamaño de partícula tan reducido como en otras técnicas 	275-604 nm

- NanoEdge®:

Fue la primera técnica desarrollada por Baxter basada en la combinación de métodos. Esta técnica combina la precipitación por adición de antisolvente con la homogeneización a alta presión. La etapa de precipitación o de pretratamiento tiene como objetivo mejorar la efectividad de la reducción del tamaño de partícula mediante la homogeneización a alta presión. La segunda etapa es la homogeneización, paso de alta energía, que logra una mayor estabilidad de la estructura cristalina (Salazar et al., 2014).

- H96, H42 y H69:

Estas técnicas pertenecen a smartCrystal. H96, desarrollada por Müller y Möschwitzer, combina al igual que NanoEdge® la precipitación por adición de un antisolvente con la homogeneización a alta presión. Sin embargo, en este caso, el proceso de cavitación tiene lugar al mismo tiempo que la precipitación (cavi-precipitación). H42 fue desarrollada por Möschwitzer y combina el *spray-drying* con la homogeneización a alta presión. H69 combina la liofilización con la

homogeneización a alta presión y fue desarrollada por Möschwitzer y Lemke. Estas dos últimas técnicas eliminan el disolvente orgánico en la etapa de pretratamiento (Salazar et al., 2014).

- CT:

Consiste en la combinación del molino de bolas vía húmeda de baja energía (LE-WBM) con la homogeneización a alta presión. Esta es la única técnica dentro de la combinación de métodos que no emplea disolventes orgánicos (Salazar et al., 2014).

4.4. Aplicaciones

En el presente trabajo de revisión, se van a desarrollar algunos aspectos de los nanocrisales relacionados con sus aplicaciones para diferentes patologías tratadas utilizando diferentes vías de administración. En concreto, la recopilación de información se centró en las vías oral, parenteral, percutánea, pulmonar y oftálmica (Fig. 10).

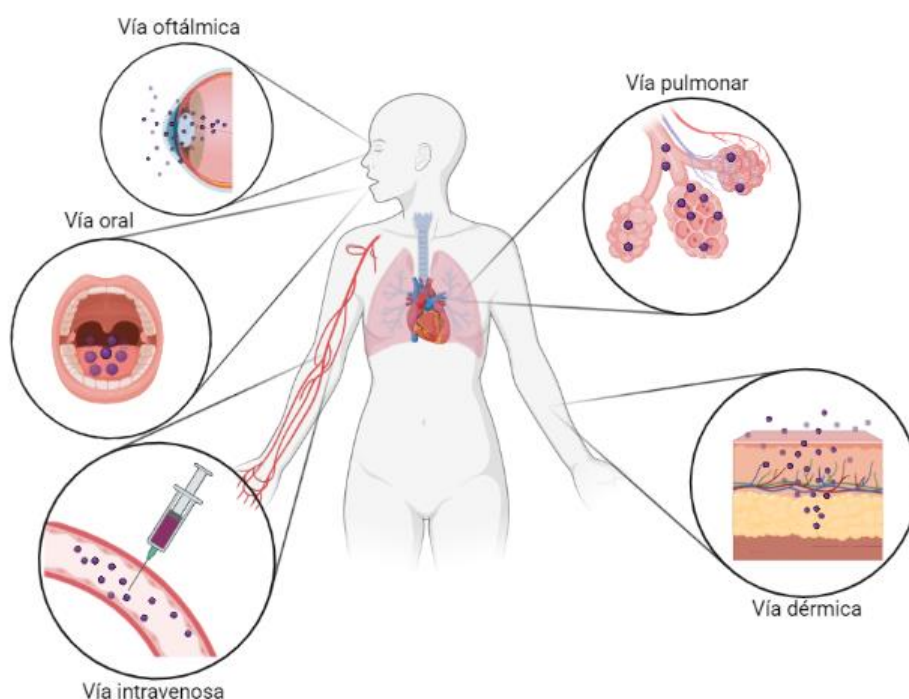


Figura 10. Representación esquemática de las diferentes vías posibles para la administración de nanocrisales

4.4.1. Vía oral

La vía oral es la vía de elección para la administración de fármacos debido a sus múltiples ventajas como son su seguridad, su aceptación por parte de los pacientes y el bajo coste que supone. Sin embargo, presenta como limitaciones, entre otras, los valores de biodisponibilidad obtenidos en muchos casos, principalmente debidos al efecto de primer paso hepático y la

reducida capacidad de absorción de ciertos fármacos a nivel del intestino delgado. El motivo de estos efectos es, en ocasiones, debido a que la velocidad de disolución es el paso limitante de la absorción. Los nanocristales, como ya se ha mencionado, aumentan la velocidad de disolución de los fármacos consiguiendo que, fármacos con baja solubilidad, se vean beneficiados con un aumento en su biodisponibilidad.

Numerosos estudios avalan estas afirmaciones. A continuación, se citan algunos ejemplos de fármacos que han sido formulados como nanocristales junto al impacto que ha tenido sobre su farmacocinética y/o actividad (Tabla 8). Por cuestiones de limitación de espacio, en la Memoria del trabajo únicamente se comentará alguno de los estudios encontrados para cada vía de administración, no desmereciendo por ello el interés del resto.

Tabla 8. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía oral

Fármaco	Técnica de producción	Tamaño de partícula	Beneficios
Silibina	HPH	350 nm	Mayor biodisponibilidad en ratas (Yi et al., 2017)
Nintedanib	Precipitación	370 nm	Mayor biodisponibilidad (Zhu et al., 2022)
Hidroxycamptotecina	Precipitación	160 nm	Mayor biodisponibilidad en ratas (Wang et al., 2021)
Albendazol	HPH	522 nm	Mayor absorción oral e incremento de la respuesta terapéutica en perros (Paredes et al., 2018)
Celecoxib	WBM	< 200 nm	Mayor biodisponibilidad (Ding et al., 2019)
Fenofibrato	WBM	-	Incremento de la absorción del fármaco (Ueda et al., 2019)
Itraconazol	WBM	369 nm	Liberación del fármaco más rápidamente (Karagianni y Peltonen, 2020)
Cilostazol	Precipitación	533 nm	Mayor solubilidad y menor toxicidad (Choi, 2020)
Domperidona	Precipitación	130 nm	Mayor velocidad de disolución (Ndlovu et al., 2019)

HPH: homogeneización a alta presión; WBM: molino de bolas vía húmeda

Ndlovu et al. (2019) llevaron a cabo un estudio comparativo del comportamiento biofarmacéutico de nanocristales de domperidona con domperidona comercial. La domperidona es un fármaco antiemético indicado para el alivio de los síntomas de náuseas y vómitos. Para este estudio, los nanocristales de domperidona se obtuvieron por el método de precipitación por adición de antisolvente. Los resultados mostraron que la etilcelulosa (Ethocel®) resultó ser el estabilizante más adecuado puesto que conseguía controlar el tamaño

de los nanocristales en 130 nm. Los nanocristales obtenidos mostraron una mayor velocidad de disolución con respecto al fármaco comercial. Ese incremento de la velocidad de disolución consiguió, asimismo, un aumento de los valores de biodisponibilidad del fármaco mediante el cual se pudo conseguir una dosis más coste-efectiva manteniendo el nivel de actividad. Como se recoge en la Figura 11, los nanocristales de domperidona permanecían un mayor tiempo en el organismo, presentaban mayores concentraciones en el tiempo y conseguían una mayor concentración máxima (Ndlovu et al., 2019).

Sample	Pharmacokinetic parameters			
	$t_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g h/mL}$)
Raw DOMP	4.182 \pm 0.43	2.0 \pm 0.11	1.3 \pm 0.26	4.91 \pm 0.31
DOMP nanocrystals	13.34 \pm 0.32***	1.0 \pm 0.07**	2.6 \pm 0.18**	13.3 \pm 0.44***
Tablets (DOMP nanocrystals)	8.334 \pm 0.71***	1.0 \pm 0.09**	2.4 \pm 0.21**	11.3 \pm 0.39***
DOMP marketed formulation	6.451 \pm 0.52*	2.0 \pm 0.16	1.6 \pm 0.31	7.73 \pm 0.37*

$n = 6$, \pm SD

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Figura 11. Resumen de parámetros farmacocinéticos de domperidona libre, domperidona en nanocrystal, cápsulas de nanocristales de domperidona y domperidona comercializada (Tomada de Ndlovu et al., 2019).

4.4.2. Vía intravenosa

Es un hecho que la vía intravenosa permite la administración de fármacos directamente al torrente sanguíneo, de tal forma que no es necesario que estos se absorban. Es por esto que, con esta vía de administración, se consiguen biodisponibilidades de aproximadamente el 100 %. Además, la acción farmacológica tiene su efecto casi de forma inmediata.

Sin embargo, a pesar de presentar estas características, las cuales harían pensar que dicha vía sería la de elección, su uso está restringido porque esta vía es invasiva, no siendo aceptada por muchos pacientes; además, requiere el empleo de disolventes y excipientes para mejorar la solubilización de las partículas del principio activo, que pueden resultar tóxicos para el organismo. La formulación de fármacos en nanocristales no requeriría del uso de gran cantidad de estos excipientes, por lo que las reacciones adversas disminuirían, haciendo que esta vía fuera más segura (Pawar et al., 2014). Adicionalmente, con el empleo de nanocristales el volumen de inyección necesario sería menor puesto que se consigue una mayor carga de fármaco.

Algunos estudios al respecto muestran las aportaciones del uso de los nanocristales a los perfiles farmacocinéticos de diversos fármacos, como se recoge en la Tabla 9.

Tabla 9. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía intravenosa

Fármaco	Técnica de producción	Tamaño de partícula	Beneficios
Ascularina	HPH	133 nm	Incremento en $t_{1/2}$, V_d , CI y MRT (Ganta et al., 2009)
Curcumina	HPH	210.2 nm	Incremento en AUC, C_{max} y MRT (Gao et al., 2011)
ZL-004	Precipitación	399 y 208 nm	Mayor solubilidad, velocidad de disolución, AUC y C_{max} (Guo et al., 2019)
Camptotecina	WBM	200-600 nm	Farmacocinética más favorable (Dong et al., 2019)
CCG-211790	Precipitación	315 y 915 nm	Mejora de parámetros farmacocinéticos (Wang et al., 2021)

HPH: homogeneización a alta presión; WBM: molino de bolas vía húmeda

En el estudio de Dong et al. (2019) se buscaba encontrar una solución para conseguir que CZ48, un profármaco de la camptotecina, permaneciese en el organismo durante un mayor tiempo. Para ello, elaboraron nanosuspensiones de este. Como resultados obtuvieron lo que se recoge en la Figura 12. Se puede observar cómo el tiempo de vida media, tanto del profármaco como de la camptotecina, se incrementaba al formularlos como nanocristales. A su vez, los nanocristales con un tamaño de partícula menor mostraban unas mejores propiedades farmacocinéticas que aquellos de tamaño mayor. Concluyeron que tales nanosuspensiones podrían ser de los principales candidatos a ser evaluados en ensayos clínicos para el desarrollo de medicamentos anticancerosos para administración intravenosa (Dong et al., 2019).

	Parameters	Unit	Cosolvent (5 mg/kg)	NS-S (25 mg/kg)	NS-L (25 mg/kg)
CZ48	$t_{1/2}$	hrs	0.70±0.13	8.00±1.03*	5.58±1.20 ^{##}
	C_0 /Dose	nM/(mg/kg)	381.66±105.31	122.29±40.14	172.48±34.39*
	V_{ss}	L/kg	6.48±2.46	41.12±11.85 [‡]	30.61±12.28 ^{##}
	CL	L/kg ² hr	6.41±1.82	9.03±2.82*	10.19±3.47 ^{##}
	$AUC_{0-\infty}$ /Dose	nM ² hr/(mg/kg)	385.70±81.95	440.08±54.10	362.95±63.52 ^{##}
CPT	F_{ab}			1.14	0.94
	$t_{1/2}$	hrs	0.40±0.10	12.51±2.86*	5.81±1.71 ^{##}
	$t_{1/2ka}$	hrs	0.06±0.03	0.47±0.18	0.50±0.22
	V_{ss}	L/kg	11,587±2143	10,570±4093	7209±1466
	CL	L/kg ² hr	19,894±4300	2383±753.7*	3758±780.3 ^{##}
	T_{max}	hrs	0.20±0.04	0.67±0.10*	0.75±0.15*
	C_{max} /Dose	nM/(mg/kg)	10.12±2.13	7.38±1.99*	4.46±1.10
	$AUC_{0-\infty}$ /Dose	nM ² hr/(mg/kg)	8.29±3.45	19.78±6.94*	10.95±1.33 ^{##}
	F_{ab}			2.39	1.32

Notes: * $p < 0.05$ compared to that of cosolvent by t-test; [‡] $p < 0.05$ compared to that of NS-S by t-test.

Abbreviations: CPT, camptothecin; NS-L, CZ48 nanosuspension with particle size of 589.35 ± 23.27 nm; NS-S, CZ48 nanosuspension with particle size of 197.22 ± 7.12 nm; i.v., intravenous.

Figura 12. Parámetros farmacocinéticos de CZ48 y Camptotecina formulados con cosolventes, en nanosuspensión con tamaño de partícula menor (NS-S) y mayor (NS-L) (Tomada de Dong et al., 2019)

4.4.3. Vía pulmonar

La vía pulmonar es una alternativa para la administración de fármacos gracias a su extensa superficie de absorción, su elevada vascularización y, principalmente, porque evita el efecto de primer paso hepático que experimentan ciertos fármacos cuando se administran por otras vías. Esta vía se emplea para el tratamiento tanto de enfermedades pulmonares como buscando una acción sistémica.

Para la administración de fármacos por esta vía, se requiere del empleo de aerosoles. Los nanocristales, por su pequeño tamaño extremadamente, consiguen una muy buena distribución en las gotículas del aerosol. Además, se aprovecha la propiedad de los nanocristales referente a su elevada adhesividad para evitar que el fármaco sea expulsado por acción del sistema ciliado de la mucosa del tracto respiratorio, de tal forma que permanecen en el lugar de absorción durante más tiempo.

En la Tabla 10 se recopila la información recogida de la revisión llevada a cabo para esta vía de administración.

Tabla 10. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía pulmonar

Fármaco	Técnica de producción	Tamaño de partícula	Beneficios
Budesonida	-	50 nm	Mayor acumulación de fármaco (Britland et al., 2012)
Fluticasona y budesonida	WBM	< 500 nm	Mayor absorción y adhesividad en pulmón (Yang et al., 2008)
Itraconazol	WBM	200 nm	Disminución del número de administraciones (Rundfeldt et al., 2013)
Curcumina y Beclometasona	WBM	200-240 nm	Incremento de la solubilidad y permite que el fármaco llegue a las zonas más bajas del árbol respiratorio (Casula et al., 2021)
Carvedilol	Precipitación	190 nm	Mayor biodisponibilidad (Saindane et al., 2013)
Resveratrol	HPH	-	Incremento de la deposición del fármaco en los pulmones (Liu et al., 2019)

HPH: homogeneización a alta presión; WBM: molino de bolas vía húmeda

Casula et al. (2021) analizaron cómo influía la formulación de curcumina y beclometasona como nanosuspensiones en los parámetros aerodinámicos, para su inhalación en pacientes con asma, aprovechando sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Además, en este estudio se valoró la posibilidad de elaborar una formulación multicomponente que incluyera nanocristales de curcumina y beclometasona, estrategia ampliamente utilizada en la actualidad por muchos

grupos de investigación en Tecnología Farmacéutica con el fin de buscar efectos sinérgicos en la respuesta terapéutica. En la Figura 13 se muestran los parámetros aerodinámicos evaluados con el sistema Next Generation Impactor (NGI, Apparatus E Ph. Eu). Los autores concluyen que, la formulación de estos principios activos en forma de nanocristales, permite obtener valores de MMAD inferiores a 5 micras (llegada del fármaco a zonas más profundas de tracto respiratorio) y una ED% incrementada con la nanosuspensión multicomponente (Casula et al., 2021).

Aerodynamic Parameters	CUR+BDP-NS			
	CUR-NS	CUR	BDP	BDP-NS
ED%	57.0 ± 0.9	81.9 ± 1.1	83.4 ± 3.7	65.5 ± 4.9
FPD (mg)	7.8 ± 0.3	6.8 ± 0.8	6.1 ± 0.1	7.6 ± 0.2
FPF (%)	60.3 ± 1.9 §	64.7 ± 4.0 §	62.7 ± 0.5 §	68.1 ± 7.2 §
MMAD (µm)	4.1 ± 0.1	3.4 ± 0.6	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2
GSD	2.6 ± 0.1	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1

ED%: dosis emitida, FDP: dosis de partículas finas, FPF: fracción de partículas finas, MMAD: diámetro medio de la masa aerodinámica, GSD: desviación geométrica estándar

Figura 13. Tabla comparativa de parámetros aerodinámicos de nanosuspensiones de curcumina, beclometasona y nanosuspensión multicomponente (Tomada de Casula et al., 2021)

4.4.4. Vía oftálmica

La vía oftálmica se emplea principalmente para el tratamiento de enfermedades perioculares e intraoculares. Esta es una vía que supone un reto para la administración de fármacos debido a sus especiales características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas, que hacen que no se llegue a alcanzar, en la mayoría de los casos, la concentración mínima eficaz. La propiedad de adhesividad mejorada de los fármacos al ser formulados como nanocristales consigue aumentar su tiempo de retención aumentando su biodisponibilidad. En la Tabla 11 se recoge información de algunas investigaciones llevadas a cabo empleando esta vía de administración.

Tabla 11. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía ocular

Fármaco	Técnica de producción	Tamaño de partícula	Beneficios
Itraconazol	WBM	378 nm	Mayor solubilidad del fármaco, tiempo de retención en el ojo e incremento de la actividad frente a <i>C. albicans</i> (Permana et al., 2021)
Fluorometolona	Precipitación	201.2 nm	Aumento de la velocidad de disolución y concentración de éste en la cavidad intraocular (Baba et al., 2021)

WBM: molino de bolas vía húmeda

La fluorometolona es un fármaco que se emplea en el tratamiento de la inflamación ocular. En un estudio llevado a cabo recientemente por Baba et al. (2021) se evaluó la actividad de este fármaco administrado en colirios elaborados con nanocristales y colirios con microcristales. Se observó que los colirios con nanocristales presentaron una mayor velocidad de disolución, la cual derivó en un incremento de la penetración del fármaco en el ojo y, por tanto, aumento de la concentración en el humor acuoso, como se aprecia en la Figura 14 (Baba et al., 2021).

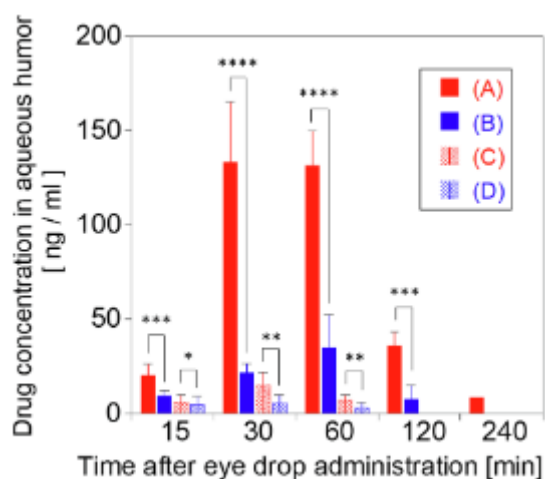


Figura 14. Concentraciones del metabolito activo de fluorometolona (A y B) y fluometolona (C y D) a diferentes tiempos (rojo=nanocrystal; azul=microcrystal) (Tomada de Baba et al., 2021).

4.4.5. Vía percutánea

La vía percutánea es la vía de elección para tratar enfermedades de la piel, aunque también se pueden administrar fármacos buscando una acción sistémica, como es el caso de los parches transdérmicos.

Esta vía requiere que el fármaco penetre a través del estrato córneo para que pueda ejercer su acción farmacológica e incluso más aún, hasta la dermis, para que pase a circulación sistémica. Los nanocristales, por su pequeño tamaño, penetran sin ningún problema a través de la piel. Además, los fármacos que se suelen formular como nanocristales suelen tener elevada lipofilia, lo que facilita su penetración a través de la piel.

Algunas aportaciones de estudios que emplean esta vía para administrar nanocristales se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vía percutánea

Fármaco	Técnica de producción	Tamaño de partícula	Beneficios
Ácido azelaico	WBM	270 nm	Mayor efectividad (Tomic et al., 2021)
Luliconazol	WBM	263 nm	Aumento velocidad de disolución y solubilidad (Kumar et al., 2019)
Ácido fusídico	Precipitación	115 nm	Mayor depósito de fármaco en la piel (Ahmed et al., 2020)
Dexametasona	WBM	260 nm	Mayor penetración en la epidermis (Lohan et al., 2020)
Apremilast	WBM	200 nm	Mayor solubilidad y penetración (Parmar y Bansal, 2020)
Metotrexato	Precipitación	678 nm	Mayor retención de fármaco en la piel (Tekko et al., 2020)
Itraconazol	WBM	320 nm	Mayor penetración (Permana et al., 2020)

WBM: molino de bolas vía húmeda

En un estudio llevado a cabo por Parmar y Bansal (2021), se analizaron comparativamente diferentes formas farmacéuticas tópicas de apremilast (microsuspensión, nanosuspensión, microgel, nanogel, microcrema y nanocrema). Apremilast es un inhibidor de la fosfodiesterasa IV que se emplea por vía oral para el tratamiento de la psoriasis. Este fármaco, en su forma no nanocristalina, no es capaz de atravesar las diferentes capas de la piel para actuar de forma local en las heridas causadas por la psoriasis. Sin embargo, tras el estudio de formulaciones basadas en nanocristales, obtuvieron como resultado una mayor solubilidad, velocidad de disolución y permeabilidad en comparación con formas tópicas de apremilast micronizado, que conllevó a una mayor cantidad de fármaco acumulado en las capa epidérmica y subepidérmica, como se observa en la Figura 15 (Parmar & Bansal, 2021).

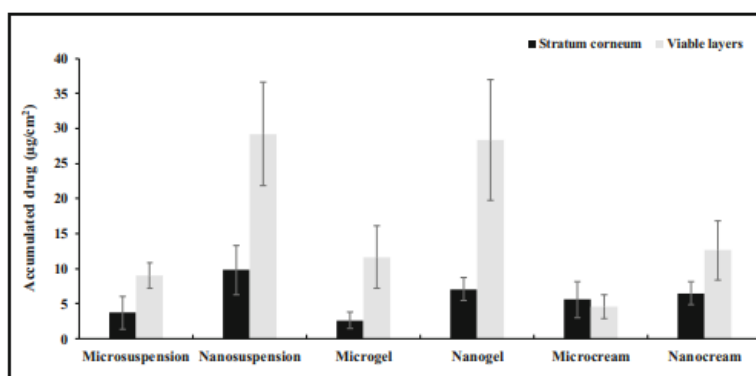


Figura 15. Cantidad de fármaco que penetra a través de las diferentes capas de la piel en diferentes formas farmacéuticas de apremilast (Tomada de Parmar y Bansal, 2021)

4.4.6. Vectorización de fármacos

Cabe destacar el impacto que está teniendo la nanotecnología en la vectorización de fármacos, concepto que consiste en dirigir al fármaco hacia su diana de forma selectiva.

Una de las aplicaciones más interesantes de la vectorización es el tratamiento del cáncer. Como es bien sabido, los fármacos utilizados en quimioterapia presentan infinidad de efectos adversos no deseados, lo cual es debido fundamentalmente a que no se distribuyen selectivamente hacia su diana. En este sentido, los nanocristales se proponen como una alternativa para el tratamiento de estas enfermedades, ya que se trata de estructuras muy versátiles, pudiéndose funcionalizar su superficie mediante el empleo de determinados tensioactivos o polímeros. De esta forma, se podría dirigir selectivamente al fármaco hacia su diana sin afectar a otros órganos.

En la Tabla 13 se recopilan los avances encontrados al respecto.

Tabla 13. Ejemplos de fármacos a base de nanocristales estudiados para la vectorización de fármacos

Fármaco	Técnica de producción	Uso/Beneficios
Anfotericina B	HPH	Aspergilosis / Formulado con polisorbato 80 y cholate sódico mejora la llegada del fármaco al cerebro (Lemke et al., 2010)
Curcumina	HPH	Mayor distribución del fármaco en el cerebro con el empleo de Tween 80 (Dibaei et al., 2019)
Itraconazol	Combinación	Antifúngico / Mayor acumulación en hígado, bazo y pulmón (Yuan et al., 2019)
Anfotericina B	Caviprecipitación	Antifúngico / Adsorbe proteínas transportadoras que la dirigen al cerebro (Sinha et al., 2021)
Carfilzomib	Precipitación	Cáncer / Mayor interacción con células tumorales y citotoxicidad (Park et al., 2019)

HPH: *homogeneización a alta presión*

Park et al. (2019) habían estudiado nanocristales de carfilzomib para su utilización como quimioterápico en pacientes con mieloma múltiple. Estos investigadores, con la intención de poder expandir su utilidad al tratamiento del cáncer de mama, llevaron a cabo este estudio en el cual obtuvieron nanocristales de dicho fármaco y modificaron su superficie con albúmina. Comparándolas con soluciones de carfilzomib, vieron que los nanocristales mejoraban su estabilidad física y metabólica, mostraban una mayor acumulación del fármaco en las células tumorales mamarias y mayor actividad, como se desprende de las imágenes de la Figura 16a. En esta figura se aprecia un incremento de la fluorescencia en las células tratadas con los nanocristales en comparación con células no tratadas y aquellas tratadas con la solución del marcador rodamina empleado. Además, debido a la modificación de la superficie con albúmina,

la interacción y la absorción del fármaco se veía incrementada, como se entiende de analizar la Figura 16b (Park et al., 2019).

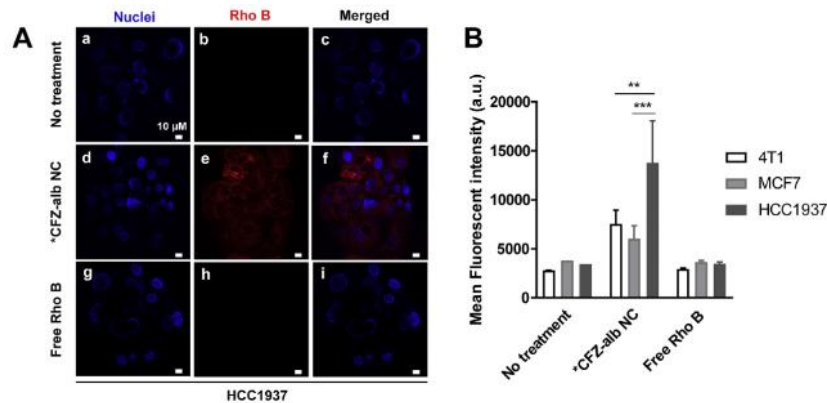


Figura 16a. Absorción por parte de células tumorales de nanocrisales de carfilzomib modificadas con albúmina y marcadas con rodamina. (A) muestra imágenes de microscopía confocal en células HCC1937 y (B) muestra la intensidad de fluorescencia en diferentes líneas celulares (Tomada de Park et al., 2019).

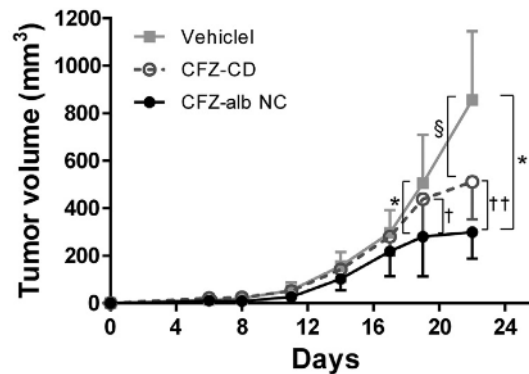


Figura 16b. Representación gráfica de la capacidad de disminuir el crecimiento del tumor de tanto de carfilzomib en ciclodextrina como de carfilzomib formulado como nanocrystal con superficie modificada con albúmina (Tomada de Park et al., 2019).

4.5. Comportamiento in vivo y nanotoxicidad

Desde hace unos años, está habiendo un especial interés en el tema relacionado con la nanotoxicidad debido a la relevancia que está teniendo la nanotecnología en la actualidad. Las nanopartículas, por su alta permeabilidad, pueden entrar fácilmente en las células. De esta forma, pueden producir daños tanto a nivel de la propia célula que penetran como a nivel sistémico (Müller et al., 2011).

El Sistema de Clasificación Nanotoxicológica clasifica las nanopartículas atendiendo a su tamaño y tiempo de permanencia en el organismo. Este sistema establece cuatro clases diferentes, siendo la clase I la menos nanotóxica y la clase IV la más nanotóxica (Fig. 17). No obstante, las nanopartículas, debido al empleo de gran número de excipientes, causan diversas reacciones

adversas (Müller et al., 2011). Aun cuando este no es el caso de los nanocristales, estos no son totalmente inocuos como será expuesto en los siguientes párrafos.

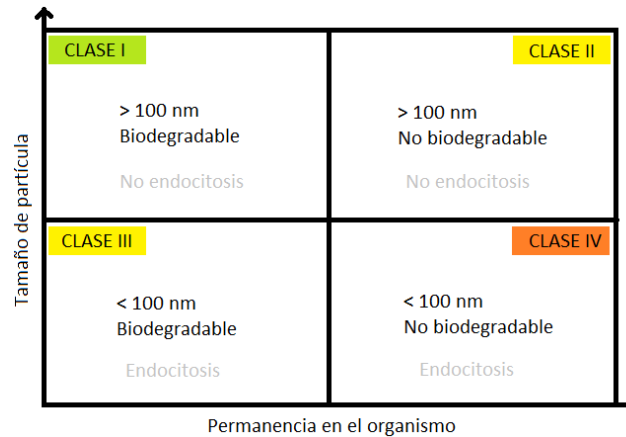


Figura 17. Representación esquemática de las diferentes clases dentro del Sistema de Clasificación Nanotoxicológica (Adaptada de Müller et al., 2011).

¿Cuál es el comportamiento de los nanocristales en el medio biológico? A día de hoy, la captación e interacción con las células del organismo no se comprende del todo, siendo necesario un mayor número de experimentos *in vivo* (Pawar et al., 2014).

Según la vía de administración, se espera que los nanocristales se comporten de una forma u otra. Por vía oral, los nanocristales son absorbidos, según muchos investigadores, en el yeyuno (Zhang et al., 2011). Diferentes rutas de absorción han sido descritas:

- Ruta paracelular a través de las células intestinales. Esta ruta sólo sería posible para nanocristales con tamaño no superior a 100 nm. Algunos investigadores exponen la posibilidad de utilizar determinados excipientes para permitir esta ruta a nanocristales de mayor tamaño (Pawar et al., 2014).
- Endocitosis: La captación podría darse en forma de endocitosis mediada por clatrina, endocitosis no mediada por clatrina, pinocitosis o fagocitosis (Pawar et al., 2014).

De cualquier modo, una mayor experimentación es requerida para entender bien la captación de nanocristales.

Por vía intravenosa, los nanocristales requieren de aproximadamente 5-10 minutos tras la inyección para su disolución. Tan solo 5 minutos son los que hacen falta para que las células del sistema fagocítico mononuclear, del sistema inmunitario, detecten los nanocristales como cuerpos extraños. La consecuencia de esto es que aquellos nanocristales que no hayan sido disueltos en ese tiempo serán captados por macrófagos del hígado y del bazo. De esta forma, la concentración de estas partículas será alta en dichos órganos (Müller et al., 2011).

En caso de nanocrisales a base de fármacos anticancerosos, esta acumulación puede conllevar a efectos citotóxicos en estos órganos. Para evitar que esto ocurra, la estrategia a seguir sería desarrollar nanocrisales que evitasen el reconocimiento por parte de las células del sistema fagocítico mononuclear (Zhou et al., 2016). Sin embargo, este fenómeno se puede aprovechar en caso de que lo que se busque sea una liberación prolongada. En tal caso, no sería necesario el empleo de una infusión intravenosa para la administración del fármaco ya que el hígado o el bazo actuarían como un depot (Müller et al., 2011).

4.6. Medicamentos comercializados

Hasta día de hoy, a pesar de la cantidad de ventajas que supone el empleo de nanocrisales, no muchos productos han podido ser comercializados. No obstante, muchos de ellos se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos y probablemente, en pocos años, el número de productos comercializados se vea incrementado.

El primer medicamento a base de nanocrisales aprobado por la FDA fue Rapamune® en el año 2000. En la siguiente tabla (Tabla 14) se exponen algunos ejemplos de los productos actualmente comercializados.

Tabla 14. Ejemplos de medicamentos basados en nanocrisales actualmente aprobados por la FDA (de Waard et al., 2011; Chen et al., 2017; Zhou et al., 2016; Couillaud et al., 2019)

Medicamento	P.a.	Compañía	Indicación	Producción	Año	F.F.
Rapamune® (oral)	Sirolimus	Wyeth	Inmunosupresor	WBM	2000	Comprimido
Emend® (oral)	Aprepitant	Merck	Antiemético	WBM	2003	Cápsula
Megace ES® (oral)	Megestrol	PAR	Estimulante del apetito	WBM	2005	Suspensión
Tricor® (oral)	Fenofibrato	Abbott	Hipercolesterolemia	WBM	2004	Comprimido
Triglide® (oral)	Fenofibrato	Sciele Pharma Inc.	Hipercolesterolemia	HPH	2005	Comprimido
Invega Sustenna® (i.v.)	Paliperidona palmitato	Janssen	Esquizofrenia	WBM	2009	Suspensión
Ilevro® (ocular)	Nepafenaco	Novartis	Antiinflamatorio	-	2012	Suspensión

Ryanodex® (i.v.)	Dantroleno sódico	Eagle Pharmaceuticals	Relajante muscular	-	2014	Suspensión
-----------------------------	----------------------	--------------------------	--------------------	---	------	------------

HPH: homogeneización a alta presión; WBM: molino de bolas vía húmeda

5. CONCLUSIONES

Desde los años 90, los nanocristales están ganando popularidad debido a que suponen una importante estrategia para aumentar la biodisponibilidad de aquellos fármacos que muestran problemas de solubilidad. Debido a su pequeño tamaño, los nanocristales tienen la capacidad de aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución, incrementan la adhesividad y la efectividad, permiten disminuir el volumen de dosis, consiguen una mayor penetración del fármaco y disminuyen posibles efectos adversos debido al empleo de determinados excipientes. Los nanocristales son muy versátiles, pues han demostrado poder administrarse por diferentes vías tales como la vía oral, la intravenosa, la pulmonar, la percutánea y la oftálmica. Además, se puede funcionalizar su superficie con determinados estabilizantes permitiendo su empleo para la vectorización de fármacos. Múltiples estudios realizados desde entonces han demostrado el potencial que presentan los nanocristales para la formulación de este tipo de fármacos. Sin embargo, a pesar de ser considerados seguros por su escaso empleo de excipientes tóxicos, se considera que pueden llegar a ser tóxicos por mostrar mayor facilidad para penetrar en las células debido a su reducido tamaño. Como perspectivas futuras, los nanocristales presentan un futuro prometedor por sus numerosas ventajas; no obstante, se requiere de un mayor número de estudios sobre su seguridad ya que actualmente no se dispone de la suficiente información.

6. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed IS, Elnahas OS, Assar NH, Gad AM, El Hosary R. Nanocrystals of Fusidic Acid for Dual Enhancement of Dermal Delivery and Antibacterial Activity: In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 2020; 12(3)

Baba K, Hashida N, Tujikawa M, Quantock AJ, Nishida K. The generation of fluorometholone nanocrystal eye drops, their metabolization to dihydrofluorometholone and penetration into rabbit eyes. *Int J Pharm*. 2021; 592.

Britland S, Finter W, Chrystyn H, Eagland D, Abdelrahim ME. Droplet aerodynamics, cellular uptake, and efficacy of a nebulizable corticosteroid nanosuspension are superior to a micronized dosage form. *Biotechnol Prog*. 2012; 28(5): 1152-9.

Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: Application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci.* 2010; 99(12): 4940–54.

Casula L, Lai F, Pini E, Valenti D, Sinico C, Cardia MC et al. Pulmonary Delivery of Curcumin and Beclomethasone Dipropionate in a Multicomponent Nanosuspension for the Treatment of Bronchial Asthma. *Pharmaceutics.* 2021; 13(8).

Chan HK, Kwok PCL. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(6): 406-16.

Chang TL, Zhan HL, Liang D, Liang JF. Nanocrystal technology for drug formulation and delivery. *Front Chem Sci Eng.* 2015; 9(1): 1-14.

Chen ML, John M, Lee SL, Tyner KM. Development Considerations for Nanocrystal Drug Products. *APPS J.* 2017; 19(3): 642-51.

Chin WWL, Parmentier J, Widzinski M, Tan ENH, Gokhale R. A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product. *J Pharm Sci.* 2014; 103(10): 2980-99.

Choi JS. Design of Cilostazol Nanocrystals for Improved Solubility. *J Pharm Innov.* 2020; 15(3): 416-23.

Cocero MJ, Martín A, Mattea F, Varona S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *J Supercrit Fluids.* 2009; 47(3): 546-55.

Couillaud BM, Espeau P, Mignet N, Corvis Y. State of the Art of Pharmaceutical Solid Forms: from Crystal Property Issues to Nanocrystals Formulation. *ChemMedChem.* 2019; 14(1): 8-23.

de Waard H, Frijlink HW, Hinrichs WLJ. Bottom-up preparation techniques for nanocrystals of lipophilic drugs. *Pharm Res.* 2011; 28(5): 1220-3.

Dibaei M, Rouini MR, Sheikholeslami B, Gholami M, Dinarvand R. The effect of surface treatment on the brain delivery of curcumin nanosuspension: In vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine.* 2019; 14: 5477-90.

Ding Z, Wang L, Xing Y, Zhao Y, Wang Z, Han J. Enhanced Oral Bioavailability of Celecoxib Nanocrystalline Solid Dispersion based on Wet Media Milling Technique: Formulation, Optimization and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics.* 2019; 11(7).

Dong D, Hsiao CH, Giovanella BC, Wang YF, Chow DSL, Li ZJ. Sustained delivery of a camptothecin prodrug-CZ48 by nanosuspensions with improved pharmacokinetics and enhanced anticancer activity. *Int J Nanomedicine.* 2019; 14: 3799-817.

Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 16-20.

Ganta S, Paxton JW, Baguley BC, Garg S. Formulation and pharmacokinetic evaluation of an asulacrine nanocrystalline suspension for intravenous delivery. *Int J Pharm*. 2009; 367(1-2): 179-86.

Gao Y, Li ZG, Sun M, Guo CY, Yu AH, Xi YW et al. Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension. *Drug Deliv*. 2011; 18(2): 131-42.

Gigliobianco MR, Casadidio C, Censi R, Di Martino P. Nanocrystals of poorly soluble drugs: Drug bioavailability and physicochemical stability. *Pharmaceutics*. 2018; 10(3).

Guo C, Chen Y, Zhu J, Wang J, Xu Y, Luan H et al. Preparation, optimization of intravenous ZL-004 nanosuspensions by the precipitation method, effect of particle size on in vivo pharmacokinetics and tissue distribution. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019; 50: 313-20.

Hu JH, Rogers TL, Brown J, Young T, Johnston KP, Williams RO. Improvement of Dissolution Rates of Poorly Water Soluble APIs Using Novel Spray Freezing into Liquid Technology. *Pharm Res*. 2002; 19(9): 1278-84.

Junghanns JUAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 2008; 3(3): 295-309.

Kalani M, Yunus R. Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 1429-42.

Karagianni A, Peltonen L. Production of itraconazole nanocrystal-based polymeric film formulations for immediate drug release. *Pharmaceutics*. 2020; 12(10).

Kumar M, Shanthi N, Mahato AK, Soni S, Rajnikanth PS. Preparation of luliconazole nanocrystals loaded hydrogel for improvement of dissolution and antifungal activity. *Heliyon*. 2019; 5(5).

Lemke A, Kiderlen AF, Petri B, Kayser O. Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against *Balamuthia mandrillaris* amebas. *Nanomedicine*. 2010; 6(4), 597-603.

Li JR, Wang ZM, Zhang H, Gao J, Zheng AP. Progress in the development of stabilization strategies for nanocrystal preparations. *Drug Deliv*. 2021; 28(1), 19-36.

Liu QY, Guan J, Sun Z, Shen X, Li L, Jin LW et al. Influence of stabilizer type and concentration on the lung deposition and retention of resveratrol nanosuspension-in-microparticles. *Int J Pharm.* 2019; 569.

Liversidge GG, Chester W, Cundy KC, Bishop JF, Czekai DA. Surface modified drug nanoparticles. US; 5145684, 1992.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62(11): 1607-21.

Lohan SB, Saeidpour S, Colombo M, Staufenbiel S, Unbehauen M, Wolde-Kidan A. Nanocrystals for Improved Drug Delivery of Dexamethasone in Skin Investigated by EPR Spectroscopy. *Pharmaceutics.* 2020; 12(5).

Majuru S, Oyewumi MO. Nanotechnology in drug development and life cycle management. En: *Nanotechnology in Drug Delivery.* New York, NY: Springer New York; 2009. p. 597-619.

Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(6): 427-40.

Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 18(2): 113-20.

Möschwitzer JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm.* 2013; 453(1): 142-56.

Möschwitzer J, Müller RH. New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6(9-10), 3145-53.

Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 78(1): 1-9.

Müller RH, Mäder K, Krause K. Verfahren zur schonenden Herstellung von hochfeinen Micro-Nanopartikeln. DE; 19932157, 2000.

Ndlovu ST, Ullah N, Khan S, Ramharack P, Soliman M, de Matas M. Domperidone nanocrystals with boosted oral bioavailability: fabrication, evaluation and molecular insight into the polymer-domperidone nanocrystal interaction. *Drug Deliv Transl Res.* 2019; 9(1): 284-97.

Nekkanti V, Vabalaboina V, Pillai R. Drug Nanoparticles-An Overview. En: *The Delivery of Nanoparticles.* London: IntechOpen; 2012

Paredes AJ, Litterio N, Dib A, Allemandi DA, Lanusse C, Bruni SS et al. A nanocrystal-based formulation improves the pharmacokinetic performance and therapeutic response of albendazole in dogs. *J Pharm Pharmacol*. 2018; 70(1): 51-8.

Park JE, Park J, Jun Y, Oh Y, Ryoo G, Jeong YS et al. Expanding therapeutic utility of carfilzomib for breast cancer therapy by novel albumin-coated nanocrystal formulation. *J Control Release*. 2019; 302: 148-59.

Parmar PK, Bansal AK. Novel nanocrystal-based formulations of apremilast for improved topical delivery. *Drug Deliv Transl Res*. 2020; 11(3): 966-83.

Patel V, Sharma OP, Mehta T. Nanocrystal: a novel approach to overcome skin barriers for improved topical drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018; 15(4): 351-68.

Patravale VB, Date AA, Kulkarni RM. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56(7), 827-40.

Pawar VK, Singh Y, Meher JG, Gupta S, Chourasia MK. Engineered nanocrystal technology: In-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2014; 183: 51-66.

Permana AD, Paredes AJ, Volpe-Zanutto F, Anjani QK, Utomo E, Donnelly RF. Dissolving microneedle-mediated dermal delivery of itraconazole nanocrystals for improved treatment of cutaneous candidiasis. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020; 154: 50-61.

Permana AD, Utami RN, Layadi P, Himawan A, Juniarti N, Anjani QK. Thermosensitive and mucoadhesive in situ ocular gel for effective local delivery and antifungal activity of itraconazole nanocrystal in the treatment of fungal keratitis. *Int J Pharm*. 2021; 602.

Rundfeldt C, Steckel H, Scherliess H, Wyska E, Wlaz, P. Inhalable highly concentrated itraconazole nanosuspension for the treatment of bronchopulmonary aspergillosis. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013; 83(1): 44-53.

Saindane NS, Pagar KP, Vavia PR. Nanosuspension based in situ gelling nasal spray of carvedilol: Development, in vitro and in vivo characterization. *AAPS PharmSciTech*. 2013; 14(1): 189-99.

Salazar J, Müller RH, Möschwitzer JP. Combinative Particle Size Reduction Technologies for the Production of Drug Nanocrystals. *J Pharm*. 2014; 2014: 1-14.

Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm*. 2013; 453(1): 126-41.

Sinha B, Staufenbiel S, Müller RH, Möschwitzer JP. Sub-50 nm ultra-small organic drug nanosuspension prepared by cavi-precipitation and its brain targeting potential. *Int J Pharm.* 2021; 607.

Suman Katteboinaa, Chandrasekhar P, Balaji S. Drug nanocrystals: a novel formulation approach for poorly soluble drugs. *Int J PharmTech Res.* 2009; 1(3): 682-94.

Sun B, Yeo Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2012; 16(6): 295-301.

Tekko IA, Permana AD, Vora L, Hatahet T, McCarthy HO, Donnelly RF. Localised and sustained intradermal delivery of methotrexate using nanocrystal-loaded microneedle arrays: Potential for enhanced treatment of psoriasis. *Eur J Pharm Sci.* 2020; 152.

Tomic I, Miodic S, Pepic I, Simic D, Filipovic-Grcic J. Efficacy and Safety of Azelaic Acid Nanocrystal-Loaded In Situ Hydrogel in the Treatment of Acne Vulgaris. *Pharmaceutics.* 2021; 13(4).

Ueda K, Iwai T, Sunazuka Y, Chen Z, Kato N, Higashi K et al. Effect of molecular weight of hypromellose on mucin diffusion and oral absorption behavior of fenofibrate nanocrystal. *Int J Pharm.* 2019; 564: 39-47.

Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm.* 2008; 364(1): 64-75.

Wang N, Qi F, He X, Shi H, Anderson DW, Li H et al. Preparation and Pharmacokinetic Characterization of an Anti-Virulence Compound Nanosuspensions. *Pharmaceutics.* 2021; 13(10).

Wang Y, Xuan J, Zhao G, Wang D, Ying N, Zhuang J. Improving stability and oral bioavailability of hydroxycamptothecin via nanocrystals in microparticles (NCs/MPs) technology. *Int J Pharm.* 2021; 604.

Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* 2013; 65(1): 315-499.

Yang JZ, Young AL, Chiang PC, Thurston A, Pretzer DK. Fluticasone and budesonide nanosuspensions for pulmonary delivery: Preparation, characterization, and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci.* 2008; 97(11), 4869-78.

Yao L, Zhao X, Li Q, Zu Y, Fu Y, Zu B et al. In vitro and in vivo evaluation of camptothecin nanosuspension: A novel formulation with high antitumor efficacy and low toxicity. *Int J Pharm.* 2012; 423(2): 586-8.

Yi T, Liu C, Zhang J, Wang F, Wang JR, Zhang JF. A new drug nanocrystal self-stabilized Pickering emulsion for oral delivery of silybin. *Eur J Pharm Sci.* 2017; 96: 420-7.

Yuan Q, Wang YL, Song RF, Hou XQ, Yu KK, Zheng JJ et al. Study on Formulation, in vivo Exposure, and Passive Targeting of Intravenous Itraconazole Nanosuspensions. *Front Pharmacol.* 2019; 10.

Zhang H, Hollis CP, Zhang Q, Li TL. Preparation and antitumor study of camptothecin nanocrystals. *Int J Pharm.* 2011; 415(1-2): 293-300.

Zhou YQ, Du J, Wang LL, Wang YC. State of the art of nanocrystals technology for delivery of poorly soluble drugs. *J Nanopart Res.* 2016; 18(9).

Zhu YJ, Fu Y, Zhang AA, Wang XL, Zhao ZQ, Zhang Y et al. Rod-shaped nintedanib nanocrystals improved oral bioavailability through multiple intestinal absorption pathways. *Eur J Pharm Sci.* 2022; 168.