

# Nanosuspensions: Preparation Methods and Stability Issue

## Nanosüspansiyonlar: Hazırlama Yöntemleri ve Stabilité Sorunu

Adem Eren BEKTAŞ<sup>1</sup>  
Afife Büşra UĞUR<sup>1</sup>  
Meltem ÇETİN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ataturk University, Faculty of Pharmacy,  
Department of Pharmaceutical Technology,  
Erzurum, Turkey

\*Corresponding Author:  
Ataturk University, Faculty of Pharmacy,  
Department of Pharmaceutical Technology,  
Erzurum, Turkey  
E-mail: melcetin@atauni.edu.tr,  
melcetin@hotmail.com  
Tel: +90 442 231 52 36

Received date: 19.07.2017  
Accepted date: 19.10.2017

### ABSTRACT

A large proportion of newly discovered active substances are water insoluble and have very low bioavailability. One of the different approaches developed to overcome the issue of low solubility in aqueous media is nanosuspensions and in recent years, this dosage form has gained popularity in the pharmaceutical area because of their unique properties. Nanosuspension is nano-sized (<1000 nm, generally, 200-600 nm) colloidal dispersions of pure active substance particles, which are stabilized by suitable surfactants and/or polymers. Nanosuspensions are successfully prepared using various methods such as media milling, high-pressure homogenization and precipitation techniques etc. This review focus on the properties, stability, advantages and disadvantages of nanosuspensions, and also, preparation methods for nanosuspensions.

**Keywords:** Nanosuspensions, preparation methods, stability

### ÖZET

Yeni keşfedilen etkin maddelerin büyük bir kısmı suda çözünmez ve biyoyararlanımları çok düşüktür. Sulu ortamdaki düşük çözünürlük sorununun üstesinden gelmek için geliştirilen farklı yaklaşımlardan birisi de nanosüspansiyonlardır ve son yıllarda, bu ilaç şekli, eşsiz özelliklerinden dolayı farmasötik alanda popülerlik kazanmıştır. Nanosüspansiyon, uygun sürfaktan ve/veya polimerler ile kararlı hale getirilmiş saf etkin madde partiküllerinin nano-boyutlu (<1000 nm, genellikle, 200-600 nm) kolloidal dağılımlarıdır. Nanosüspansiyonlar, çeşitli yöntemler (öğütme, yüksek basınçlı homojenizasyon, çöktürme vb.) kullanılarak başarıyla hazırlanmıştır. Bu derleme, nanosüspansiyonların özellikleri, kararlılığı, üstünlükleri ve sakıncaları ve aynı zamanda nanosüspansiyon hazırlama yöntemleri üzerine odaklanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Hazırlama yöntemleri, nanosüspansiyonlar, stabilite

### 1. Giriş

Günümüzde, ilaç endüstrisindeki geniş uygulama alanlarından dolayı nano-boyutlu materyallere olan ilgi artmaktadır [1]. Yeni kimyasalların % 40'ından fazlası lipofilik bileşiklerdir. Bununla birlikte, az çözünen etkin maddeler (e.m.'ler), Amerikan farmakopesinde (USP) kayıtlı olan maddelerin yaklaşık 1/3'ünü oluşturmaktadır [2,3]. Bu nedenle, suda az çözünür (yüksek Log P'ye sahip yüksek oranda lipofilik moleküller ve erime noktası 200 °C'nin üzerin-

de olan düşük Log P'li moleküller) ve düşük biyoyararlanıma sahip yeni moleküllerin formülasyonlarının hazırlanması ciddi ve zorlu bir süreçtir [2]. Dolayısıyla, bu e.m.'lerin düşük çözünürlük ve biyoyararlanım sorunlarını gidermek için birçok yaklaşım (mikronizasyon, absorpsiyon artırıcılarının veya yardımcı çözücülerin kullanılması, e.m.'lerin tuz şeklinin kullanılması, katı dağılımların ve misellerin hazırlanması, siklodekstrinler kullanılarak inklüzyon komplekslerinin hazırlanması, lipozom, emülsiyon, mikroemülsiyon, yağlı

çözelti gibi ilaç şekillerinin kullanılması vb.) mevcuttur. Bu yaklaşımların başlıca problemi, tüm e.m.'ler için uygulanabilir olmamalarıdır [2,4]. Suda çözünürlüğü düşük olan e.m.'lerin çözünürlüklerini artırmak ve biyoyararlanım sorunlarını gidermek/biyoyararlanımlarını artırmak üzere hazırlanmış ilaç şekillerinden biri olan nanosüspansiyonlar [5], herhangi bir matris materyal kullanılmaksızın nano-boyutlu etkin madde partiküllerinin [ortalama partikül büyüklüğü (PB): 200-600nm olan] yüzey aktif madde ve/veya polimerler ile dayanıklılığının sağlanması ve uygun hazırlama yöntemlerinin kullanılmasıyla elde edilen kolloidal dağılımlardır [6-8].

Diğer kolloidal sistemlere kıyasla teknik gereksinim basitliği ve maliyet etkinliği özelliklerinden dolayı nanosüspansiyonlar yoğun bir ilgi görmektedir [1]. Bundan dolayı, bu derlemede nanosüspansiyonlar, hazırlama yöntemleri ve bu sistemlerin stabilitesi hakkında kısaca bilgi verilecektir. Tarihsel gelişim içinde öncelikle mikronizasyon tekniği (kolloid değirmenlerin veya jet değirmenlerin kullanımı vb) kullanılarak çok küçük bir fraksiyonu 1µm'nin altında olmakla birlikte boyutları 0.1-25 µm aralığında olan partiküller elde edilebilmiştir. Etkin madde partiküllerinin nano-boyuta getirilmesi yani nano-boyutlu partiküllerin hazırlanması ise bir sonraki aşamayı oluşturmuştur [2]. Bu amaçla, öncelikle çöktürme yöntemi kullanılmış, kolloidal sistemi elde etmek üzere e.m. ilk olarak organik bir çözücüde çözüldürülmüş ve daha sonra bu çözelti stabilizan içeren sulu ortam içerisine enjekte edilmiştir. Bu yöntemde e.m.'nin en azından bir çözücüde çözünmesi ve bu çözücünün de çözücü olmayan diğer bir çözücüyle karışabilir olması gerekliliği sakıncasından dolayı nanosüspansiyon hazırlanması için daha sonra dispersiyon yöntemi kullanılarak 10-1000 nm aralığında saf e.m. partiküllerini içeren, polimer/sümfaktanlarla dayanıklılığı artırılmış nanosüspansiyon formülasyonu geliştirilmiştir [9-12]. Nanosüspansiyon teknolojisinin, e.m.'lerin çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla farklı uygulama yollarına yönelik uygulanabilirliği ve verimliliği çalışılarak gösterilmiştir [13-18]. Nanosüspansiyon şeklinde etkinliği ve biyoyararlanımı etkileyen başlıca faktörler ise PB ve dağılımı, morfolojik özellikler, kristal yapı, stabilizanlar ve uygulama yoludur [7,19]. Piyasada, Emend®, Rapamune®, Tricor®, Megace ES®, Triglide™, Gris-PEG® gibi nanokristal/nanosüspansiyon temelli ilaçlar mevcuttur [20].

#### **Nanosüspansiyonların Üstünlükleri:**

- Nanoboyuta getirilmiş ve yüzey alanı artırılmış e.m.'nin doyunluk çözünürlüğünün, çözünme hızının, biyoyararlanımının ve farmakokinetiğinin değiştirilmesiyle etkinliğinin artırılması,
- Kolaylıkla ticarileştirilebilir olması,
- Düşük dozda e.m. uygulanmasına ve istenmeyen yan etkilerin giderilmesine/azaltılmasına imkân

sağlaması,

- Açlık ve tokluk durumlarındaki e.m. biyoyararlanımındaki farklılığın azaltılması,
- Gerekğinde, aseptik koşullarda süzme ile sterilizasyonlarının gerçekleştirilebilmesi,
- Topikal nanosüspansiyonlarda penetrasyon kabiliyetinin önemli derecede artması,
- Farklı uygulama yolları (oral, parenteral, pulmoner, oküler vb) ile uygulanabilmesi,
- Ölçek büyütme işlemlerinin (hazırlama yöntemine bağlı olarak) kolay uygulanabilir olması,
- Stabilizanlardan dolayı daha uzun süreli fiziksel dayanıklılık göstermesi,
- Zayıf çözünürlüğe sahip e.m.'lerin formülasyonu için uygun olması,
- i.m. uygulamalarda doku irritasyonunu azaltması,
- Tedavi maliyetini düşürmesi,

şeklinde sıralanabilir [2,6-8,21-24]. Nanosüspansiyonlar, küçük boyutları ve artmış yüzey alanlarından dolayı tüm bu üstünlükleri sunarlar ve bu nedenle, bu sistemlerde partiküllerin bir araya gelmemesi kritik bir önem taşır. Stabilizanlar, nanosistemlerin oluşumunda ve işlevselliğinin korunmasında önemli bir role sahiptir.

Yang ve ark. [13], hazırladıkları polietilen glikol (PEG):10-hidroksi kamptotesin (HK) konjugatını, HK nanosüspansiyonunu hazırlarken stabilizan olarak kullanmışlar, dayanıklı (kararlı) ve antikanserojen etkisi daha yüksek bir nanosüspansiyon formülasyonu elde etmişlerdir. Bu nanosüspansiyonun HK injeksiyonuna göre Hep G2 (karaciğer kanser hücreleri) ve MCF-7 (meme kanseri hücreleri) hücre hatlarında önemli oranda yüksek sitotoksik etki gösterdiği ve in vivo çalışmalarda da antikanserojen etkinliğinin piyasadaki HK injeksiyonuna göre anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada, oral yoldan uygulamaya yönelik suda çözünürlüğü düşük olan antibakteriyel bir maddenin (Cyadox) nanosüspansiyon formülasyonu stabilizan olarak PVP K30 kullanılarak hazırlanmış ve in vivo olarak oral biyoyararlanımının nanosüspansiyon halinde iyileştirildiği bildirilmiştir [14].

Naringenin biyoyararlanımını artırmak içinde nanosüspansiyon formülasyonu hazırlanmış (stabilizan olarak PVP K90 kullanılarak) ve yapılan farmakokinetik çalışmada, naringenin nanosüspansiyonlarının  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-24}$  (eğri altında kalan alan) değerlerinin naringenine göre sırasıyla yaklaşık 2 ve 1.8 kat daha arttığı saptanmıştır [15].

Ye ve ark.[25] geliştirdikleri yeni bir madde olan östrojen reseptör- $\beta$ 005'in düşük çözünürlük sorununu aşmak, oral biyoyararlanımını artırmak ve analjezik etkisini iyileştirmek üzere nanosüspansiyon formülasyonunu (ortalama partikül büyüklüğü 110 nm) hazırlamışlardır.

Nanosüspansiyon formülasyonu,  $\beta$ -kazein (gıda proteini) kullanılarak stabilize edilmiştir. Yapılan *dairesel dikroizm* spektroskopisi ve floresan analizi sonucu partiküller ile  $\beta$ -kazein arasında güçlü bir etkileşim olduğu saptanmış ve bundan dolayı da  $\beta$ -kazeinin güçlü bir nanosüspansiyon stabilizanı olabileceği vurgulanmıştır. Nanosüspansiyon halinde maddenin sıçanlarda oral biyoyararlanımı süspansiyonuna göre 1.6 kat daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda, hayvan modelleri ile maddenin güçlü bir analjezik olduğu da doğrulanmıştır.

PIK-75 (fosfatidilinositol 3-kinaz inhibitörü) nanosüspansiyonunun hazırlandığı bir çalışmada ise gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda nanosüspansiyonun PIK-75 süspansiyonu ile karşılaştırıldığında tümör bölgesinde daha fazla biriktiği ve antitümör etkinliğinin arttığı saptanmıştır [26].

Gao ve ark. [27] intravenöz yolla kullanıma yönelik hazırladıkları kurkumin nanosüspansiyonlarının güvenliğini değerlendirmek üzere eritrosit hemoliz testini gerçekleştirmişlerdir. Bu testte, kurkumin ile karşılaştırıldığında kurkumin nanosüspansiyonlarının daha az lokal irritasyona, flebit riskine ve daha düşük oranda eritrosit hemolizine neden olduğu gösterilmiştir.

Mikonazol nitrat nanosüspansiyonu, etkin maddenin anti-fungal etkisini ve deriden penetrasyonunu artırmak üzere yaş öğütme yöntemi ile hazırlanmış ve stabilizan olarak da poloksamer 407 ve Tween 80 kullanılmıştır. Domuz kulağı derisi kullanılarak gerçekleştirilen penetrasyon çalışmasında, piyasa preparatı ile karşılaştırıldığında hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonu halinde etkin maddenin deriden penetrasyonunun arttığı ve derinin 5-10  $\mu$ m derinliğindeki etkin madde miktarının  $<1.0-1.7$ 'den  $\% 3.3-6.2$ 'ye kadar yükseldiği tespit edilmiştir [28].

Güçlü bir antioksidan olan resveratrol maddesinin topikal uygulanmasına yönelik nanosüspansiyon formülasyonu poloksamer 188 ve Tween 80 stabilizanları kullanılarak yaş öğütme yöntemi ile hazırlanmış ve domuz kulağı derisi kullanılarak gerçekleştirilen penetrasyon çalışmasında süspansiyon formülasyonuna göre nanosüspansiyon formülasyonu halinde etkin maddenin deriden penetrasyonunun arttığı tespit edilmiştir [29].

Yukarıda verilen örnek çalışmalardan anlaşılacağı üzere nanosüspansiyonlar farklı uygulama yollarına yönelik olarak başarılı bir şekilde hazırlanmaktadır ve formülasyonlarında polimerler, sürfaktanlar ve protein yapısındaki stabilizanlar kullanılarak nanosüspansiyonun kararlılığı sağlanmaktadır. Bununla birlikte, e.m.'nin etkinliğinin/oral biyoyararlanımının/deriden geçişinin artırılmasında, e.m.'nin düşük çözünürlük sorununun aşılmasında ve enjeksiyon sırasında irritasyon riskinin azaltılmasında nanosüspansiyonların faydalı olduğu görülmektedir.

#### **Nanosüspansiyonların Sakıncaları [2,23,30]:**

- Sıvı haldeki nanosüspansiyonların taşınması/

nakliyesi sırasında dikkatli olunmalıdır.

- Kullanımları sırasında dozlama hatası olabilir
- Nanosüspansiyonlar termodinamik olarak dayanıksız sistemlerdir. Fiziksel dayanıksızlık, çökme vb. sorunlar görülebilir
- Yüzey aktif maddelerden (örn: Cremophor EL) dolayı istenmeyen yan etkiler görülebilir
- Nanosüspansiyonlarda e.m.'nin hızlı bir şekilde çözünmesi ciddi yan etkilere ve toksik etkilere neden olabilir.

Nanosüspansiyonlarda e.m.'nin çözünme hızını kontrol etmek ve etki bölgesinde daha uzun süreli kalmasını sağlamak üzere yüzey modifikasyonu gerekebilir. Örneğin, PEG yüzey modifikasyonu için sıklıkla kullanılır ve böylece, partiküllerin sistemik dolaşım süresi artırılır [2].

Shegokar ve Singh [31], nevirapin nanosüspansiyonlarını YBH yöntemini kullanarak hazırlamışlar ve hedeflendirme potansiyelini artırmak üzere serum albumini, polisakkarit ve PEG ile yüzey modifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sıçanlarda, i.v. uygulama sonrası, yüzeyi modifiye edilmiş nanosüspansiyonların birikiminde daha fazla artış gözlenmiş ve e.m. çözeltisiyle karşılaştırıldığında bu nanosüspansiyonların beyin, karaciğer ve dalakta daha yüksek ortalama kalış sürelerine sahip olduğu saptanmıştır. E.m.'nin biyoyararlanımı artırılmış ve hedef bölgede uzun süreli olarak kalması sağlanmıştır.

Ayrıca, *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonuna karşı etkin bir tedavi sağlamak üzere buparvakuon nanosüspansiyonu hazırlanmış ve adezif polimerler (kitosan ve Carbopol®) kullanılarak mukoadezif formülasyonlar (nanosüspansiyon içeren hidrojel) geliştirilmiştir. Bu formülasyonun uzun süreli (6 ay) fiziksel kararlılığa sahip olduğu saptanmıştır. Adezyondan dolayı e.m.'nin emilim bölgesinde daha uzun süre kalabileceği ve etkinliğinin iyileştirilebileceği ifade edilmiştir [32,33].

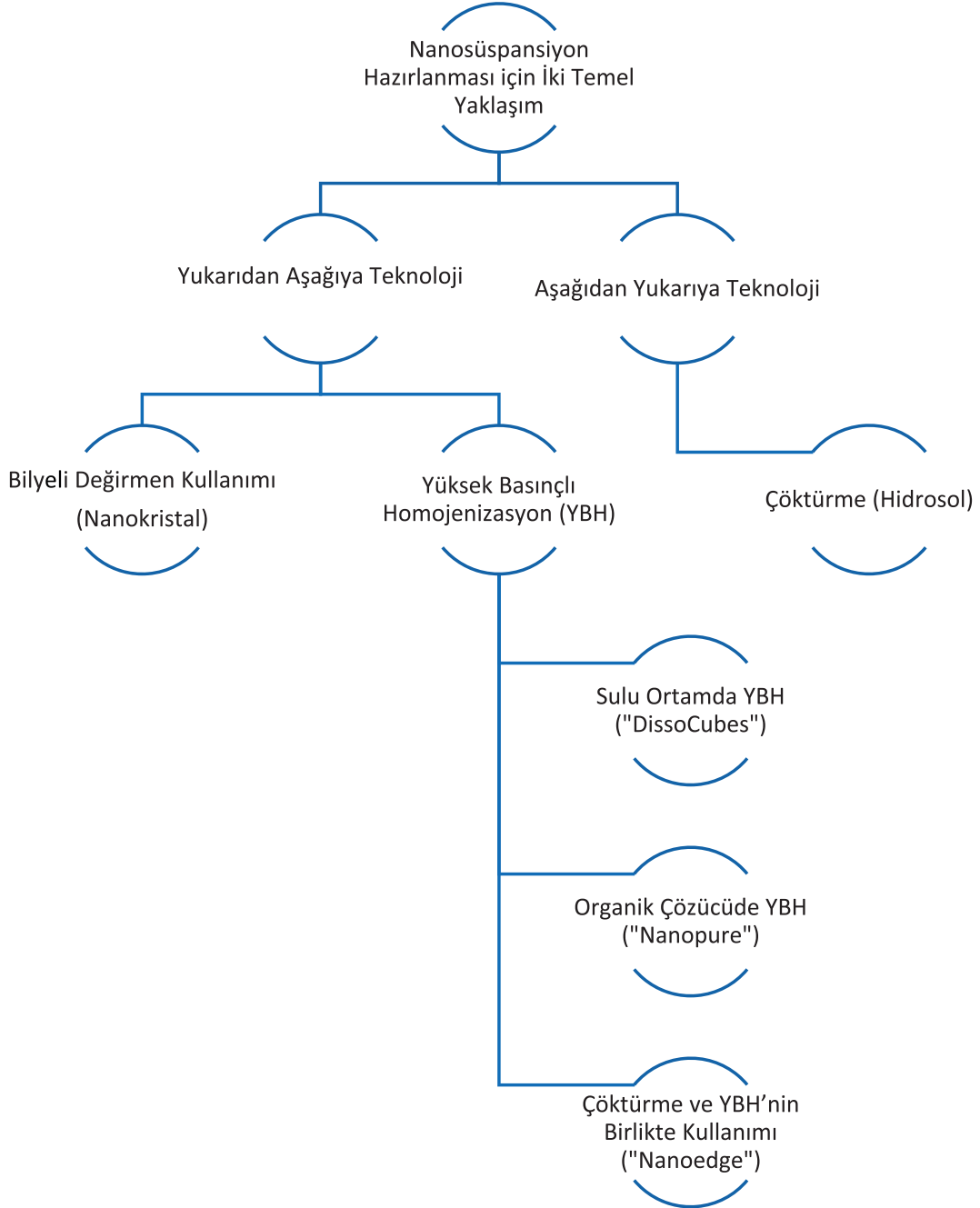
#### **Nanosüspansiyon Formülasyonu ve Hazırlama Yöntemleri**

Bir nanosüspansiyon formülasyonunda kullanılan/kullanılabilecek yardımcı maddeler Tablo 1'de özetlenmiştir [6,22].

Nanosüspansiyonları üretmek için, "bottom-up" (aşağıdan yukarıya; e.m.'nin uygun çözücüde çözüldürülmesi ve daha sonra çöktürülmesi esasına dayanır) ve "top-down" (yukarıdan aşağıya; dışarıdan maddeye mekaniksel veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi ile öğütülmesi veya dağıtılması esasına dayanır) teknolojileri olmak üzere iki yöntem söz konusudur. Nanosüspansiyon hazırlanması için kullanılan temel yaklaşımlar Şekil 1 ve Tablo 2'de verilmiştir [2,4].

**Tablo 1.** Nanosüspansiyon formülasyonlarında kullanılan/kullanılabilecek yardımcı maddeler [6,22]

Yardımcı Madde	Örnek
Stabilizan	-Poloksamerler, lesitin, polisorbatarlar, selüloz türevleri, polivinil prolidon (PVP)
Ko-sürfaktan	-Safra tuzları, dipotasyum gliserhizinat, transkutol, glikofurol
Organik çözücü	Metanol, etanol, kloroform, izopropanol, etil asetat, propilen karbonat
Diğer yardımcı maddeler	Tamponlar, tuzlar, polioller, kriyoprotektanlar



**Şekil 1.** Nanosüspansiyon hazırlanmasında kullanılan temel yaklaşımlar [2,4].

**Tablo 2.** Nanosüspansiyon hazırlama yöntemlerinin prensipleri, üstünlük ve sakıncaları [2,6,20,22,23, 34-37].

Yöntem	Prensip-Hazırlama	Üstünlük	Sakıncaları
Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımlar			
Öğütme yöntemi (ÖY; Bilyeli değirmen yöntemi; (ÖY; Bilyeli değirmen yöntemi)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Partikül boyutu mekanik enerji ile küçültülür.</li> <li>Sürtünme ve çarpma kuvvetlerine bağlı partikül boyutu küçülmesi gerçekleşir.</li> <li>E.m. stabilizan içeren sulu ortamda dağıtılır. Öğütme haznesine e.m. dağılımı, bilya (uygun büyüklük ve sayıda; paslanmaz çelik, cam, porselen zirkonyum oksit gibi sert bir materyalden yapılmış bilyalar kullanılır) yerleştirilerek öğütme işlemi uygun süre ve hızda gerçekleştirilir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Seyreltik ve konsantrasyonların hazırlanmasına imkan vermesi</li> <li>Seriler arası farklılıkların düşük olması</li> <li>Büyük miktarlarda e.m. ile çalışılabilmesine imkan vermesi</li> <li>Partikül boyutu üzerinde kullanılan bilyelerin çapı, sayısı (hazne hacminin %30-50) ve öğütme haznesinin devir hızı etkili olduğundan, uygun koşullarda nano-boyutlu partiküller içeren dağılım hazırlanması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zaman alıcı olması (birkaç gün)</li> <li>Uygun koşullarda çalışılmadığında mikron boyutlarında partiküllerin oluşması</li> <li>Öğütme haznesi ve bilyelerin aşınması ile sonuç ürünün kirlenmesi</li> <li>Öğütme sırasında açığa çıkan ısıdan dolayı ısıya hassas maddelerin bozunması</li> <li>Uzun öğütme sürelerinin amorf yapıların oluşumuna ve stabilize problemlerine yol açması</li> <li>Bilye boyut ve ağırlığından dolayı ölçek büyütmeye kolay olmaması</li> </ul>

<p><b>Yüksek Basınçlı Homojenizasyon (YBH)</b></p>	<p><b>Sulu Ortamda YBH (“DissoCubes”)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Basınç altında küçük bir açıklıktan e.m.’nin sulu dağılımının geçirilmesi ile partikül boyutunun küçültülmesi esasına dayanır.</li> <li>• E.m. stabilizan içeren sulu ortamda dağıtılır. Nanosüspanسیون, bu dağılımın yüksek basınçlı homojenizatörden yüksek basınç altında (1500 bara kadar) çok küçük bir açıklıktan birkaç kez geçirilmesi ile hazırlanır.</li> <li>• Bu durum, dinamik basıncın artması ile birlikte eşzamanlı olarak statik basıncın azalmasına ve suyun kaynama noktasının oda sıcaklığına düşmesine neden olur. Sonuç olarak, oda sıcaklığında suyun kaynamaya başlaması, gaz kabarcıklarının oluşmasını sağlar. Oluşan süspanسیون açıklıktan çıktıktan sonra ise basınç atmosferik seviyeye döndüğünden dolayı bu gaz kabarcıkları patlar. Bu olaya kavitasyon denir. Kavitasyon, yüksek kayma ve çarpışma kuvvetlerinin birleşimi ile e.m. partikülleri mikron boyutundan nano-boyuta küçültülür.</li> <li>• Bu teknikte, basınç kademeli olarak (%10-100) artırılır.</li> <li>• Homojenizasyon döngüsü, uygulanan basınç, partiküllerin sertliği ve sıcaklık gibi faktörler sonuç nanosüspanسیونunun partikül büyüklüğünü ve diğer fiziksel özelliklerini etkiler.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ögütme ile karşılaştırıldığında aşınmadan kaynaklanan metal kirliliği daha azdır (20 homojenizasyon döngüsü ve 1500 bar basınç altında metal kontaminasyonu &lt;1 ppm olarak tespit edilmiştir).</li> <li>• Seyreltik ve konsantr nanosüspanسیونların hazırlanmasına imkan vermesi</li> <li>• Hem sulu ortamda hem de organik çözücülerde çözünürlüğü düşük e.m.’lere uygulanabilir olması</li> <li>• “Nanopure” tekniğinin ısıya hassas e.m.’ler için çok uygun bir yöntem olması</li> <li>• Tekniğin basit ve hızlı olması (birkaç dakika)</li> <li>• Ölçek büyütmenin kolaylığı ve seriler arası değişkenliğin düşük olması</li> </ul>
<p><b>Organik Çözücüde YBH (“Nanopure”)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çeşitli nedenlerden dolayı, su içeriği azaltılmış veya su içermeyen ortamlarda (yağ, düşük molekül ağırlıklı PEG vb) e.m.’nin süspanسیونu hazırlanır.</li> <li>• Yağların ve yağ asitlerinin (C sayısı önemli) kaynama noktalarının yüksek, buhar basınçlarının ise düşük olmasından dolayı, kavitasyon için basıncın düşmesi yeterli değildir ve bu teknikte belirleyici bir faktör olmamaktadır. Yetersiz basınç düşüşünü telafi etmek için, “Nanopure” işlemi genellikle düşük sıcaklıkta yürütülür ve “derin dondurma” yöntemi olarak da adlandırılır. İşlem 0 ° C’de veya hatta donma noktasının altında gerçekleştirilerek sulu ortamda YBH ile karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmektedir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homojenizasyon öncesi mikro-boyutlu partikül içeren süspanسیونun eldesi için ön bir işlem gerektirmesi</li> <li>• Çoklu homojenizasyon döngüsü gerekliliği</li> <li>• Cihazın yüksek maliyeti</li> <li>• Cihazın büyük partiküller tarafından tıkanması</li> <li>• Yüksek deneyim gerekliliği</li> <li>• Yüksek enerji gerekliliği</li> </ul>

<p><b>Kuru- Ögütme Yöntemi (KÖY)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zayıf çözünürlüğe sahip e.m.'lerin suda çözünür polimer ve kopolimerler (örn: PVP, PEG, HPMC, SDS, siklodekstrinler) ile ögütülmesi işlemidir. E.m.'nin yüzey polaritesinin değiştirilmesi ve kristal yapısının amorf yapıya dönüşmesi sonucu e.m.'nin fizikokimyasal özellikleri iyileştirilmektedir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolay ve ekonomik bir yöntem</li> <li>• Organik çözücü kullanılmaması</li> <li>• Kısa süreli ögütme yapılması</li> <li>• Nano-boyutta partiküller elde edilmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aşırı kaynaqlanabilecek kirlilik</li> </ul>
<p><b>Aşağıdan Yukarıya Yaklaşım</b></p>		
<p><b>Çöktürme (Hidrokol)</b></p> <p>• E.m.'nin bir çözücüde çözündürülmesi ve daha sonra bu çözeltinin sürfaktan varlığında maddesi çözünmeyen ikinci bir çözücüye eklenmesi ve çözücülerin uzaklaştırılması içerir. E.m. çözeltisinin ikinci çözücüye (genellikle su) hızlı bir şekilde eklenmesi ile çözelti hemen aşırı doygunluğa ulaşır ve çok küçük partiküller elde edilir. Bu işlem iki aşamayı içerir: çekirdek oluşumu ve kristal büyümesi. En küçük PB'ye sahip kararlı bir süspansiyon hazırlanırken, yüksek çekirdek oluşum hızı, ancak düşük büyüme hızı gereklidir. Her iki hız da sıcaklığa bağlıdır: Çekirdek oluşumu için gerekli sıcaklığın kristal büyümesi için gerekli sıcaklığın altında kalması ile uygun sıcaklık sağlanır.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basit ve ekonomik bir yöntem olması</li> <li>• Ölçek büyütme kolaylığı</li> <li>• Küçük boyutlu partiküllerin elde edilmesi ve PB'nin iyi bir şekilde kontrol edilebilmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E.m. en az bir çözücü içerisinde çözümlenmeli ve bu çözücü e.m.'nin çözünmediği ikinci bir çözücü ile karıştırılmalıdır</li> <li>• Kristal büyümesi, sürfaktan ilavesi ile sınırlanmalıdır</li> <li>• Organik çözücü kalıntısı</li> </ul>
<p><b>Çöktürme ve YBH'nin Birlikte Kullanımı ("Nanoedge")</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Standart hazırlama yöntemlerinin sakıncalarını (uzun işlem süresi, homojenizasyon tıkanması vb.) ortadan kaldırmak üzere geliştirilmiştir.</li> <li>• "Nanoedge" teknolojiyi iki basamaktan oluşmaktadır. Bunlar,             <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mikroçöktürme (e.m.'nin çöktürülmesi),</li> <li>2. Daha sonra, YBH ile nanosüspansiyon elde edilmesidir.</li> </ol> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bu tekniklerin birlikte kullanılması ile daha kısa sürede daha küçük partikülleri içeren daha dayanıklı nanosüspansiyonların elde edilmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E.m.'nin çözündüğü susuz çözücünün nanosüspansiyonda kalıntı halinde bulunması ve partikül boyutunda artışa neden olabilmesi</li> </ul>

**Diğer nanosüspansiyon hazırlama yöntemleri ise aşağıdaki şekilde özetlenebilir [6]:**

- Emülsiyon/mikroemülsiyon şablon (kalıp) yöntemi: Uçucu organik çözücüler içinde çözünmeyen veya kısmen suda çözünen e.m.'lerin bu yöntemle nanosüspansiyonları hazırlanır. Yüksek e.m. çözünürlüğü, düşük maliyet, büyük ölçekte üretim, basit üretim yöntemi, etil asetat, etil format benzeri organik çözücülerin kullanılması yöntemin üstünlükleri iken, organik çözücülerin ve yüksek miktarda sürfaktanın kullanılması ise yöntemin sakıncaları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntemle nanosüspansiyon hazırlanması iki şekilde yapılabilir:
  1. E.m.'yi içeren organik çözücü veya organik çözücü karışımları uygun sürfaktanları içeren su fazı ile karıştırılır ve organik faz alçak basınç altında uzaklaştırılır. Sonuç olarak, uygun sürfaktan ve stabilizanlar kullanılarak kararlı nanosüspansiyon hazırlanmış olur.
  2. Öncelikle, dispers faz olarak emülsiyon kısmen karışabilir çözücüler (örn: bütül laktat, benzil alkol ve triasetin) kullanılarak hazırlanır. Daha sonra su kullanılarak seyreltilir ve nanosüspansiyon elde edilir.
    - Lazerle boyut küçültme
    - Nano-jet teknolojisi
    - Emülsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi
    - Eriyik emülsifikasyon yöntemi
    - Süperkritik akışkan yöntemi
    - Püskürterek kurutma yöntemi

Itoh ve ark. [35] griseofulvin, glibenklamid, N-5159 ve nifedipin olmak üzere suda çözünürlüğü zayıf olan e.m.'leri, PVP ve sodyum dodesil sülfat (SDS) stabilizanlarını kullanarak kuru öğütme yöntemi ile nano-boyutlara getirmişlerdir. E.m./PVP/SDS karışımları distile suda dağıtıldığında, boyutları  $\leq 200$  nm olan dayanıklı nanosüspansiyonlar hazırlanmıştır. Partiküllerin yüzeyine PVP ve SDS'nin adsorbsiyonu sonucu partikül agregasyonunun önlediği, bununla birlikte, SDS'nin negatif yükünden dolayı oluşan elektrostatik itmeninde dayanıklı bir formülasyon hazırlanmasında etkili olduğu ifade edilmiştir.

İki farklı diklofenak asit kristalini içeren nanokristal formülasyonlarının hazırlanması için bu iki kristal şekil (% 0.92 ve 1.84 a/a) farklı oranlarda poloksamer 188 (%0.46 ve 0.92 a/a) içeren distile su içerisinde dağıtılmış ve bilyeli değirmen yöntemi (İtriyumla stabilize edilmiş zirkonyum-silika boncukları) kullanılarak nanosüspansiyon haline getirilmiştir. Hazırlanan nanosüspansiyonların PB ve zeta potansiyel (ZP) değerleri sırasıyla 279-315

nm ve -35 ile -39 mV aralığında bulunmuştur. Öğütme süresinin artışı ile birlikte PB ve dağılımının küçüldüğü saptanmıştır. Süreyi daha fazla artırmanın ise PB'de ıleri bir küçülme sağlamadığı raporlanmıştır [38]. Öğütme ekipmanı ne olursa olsun, daha uzun bir öğütme işlemi genellikle daha küçük partiküllerin elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak, öğütme işleminin yeterince uzun süre devam ettirilmesi sonucu partikül büyüklüğü bilinen bir öğütme sınırına/dinamik bir dengeye yaklaşma eğilimindedir. Başka bir deyişle, partikül büyüklüğünü daha fazla küçültmek için öğütme süresini gereğinden fazla uzatmak enerji ve zaman kaybına neden olmaktadır. Yüksek enerji tüketimine neden olmasının yanı sıra, bilyelerin aşınması ile sonuç ürünün kirlenmesi ve e.m.'nin kristal yapısında değişimler olabileceğinden öğütme süresinin gereğinden fazla uzatılmasından kaçınılmalıdır.

Bu çalışmada, ayrıca, diklofenak asit kristal yapılarının (hammadde halinde) çözünürlüğü benzer ve yaklaşık 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  iken nanokristal halinde her iki kristal yapının sudaki çözünürlüğünün 74 ve 85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak artırıldığı bulunmuştur. Bu çalışmada, partikül boyutunda yaklaşık 1/100'lük bir azalma ile çözünürlükte yaklaşık 3 katlık bir artış sağlanmış ve bunun sonucu olarak da kaba süspansiyonlara göre deride toplam birikim açısından 4 katlık bir artış elde edilmiştir. Partikül büyüklüğünün, nanokristallerin artmış çözünme hızı ve doyunluk çözünürlüğünden (Kelvin ve Noyes-Whitney eşitlikleri) dolayı "stratum corneum"dan penetrasyonda önemli bir rol oynadığı saptanmıştır [38].

Kanthamneni ve ark. [39] danazol nanosüspansiyonunu hazırlamak üzere yaş öğütme ve YBH yöntemlerini kullanmışlardır. Yaş öğütme ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün (400 nm) YBH yöntemi ile elde edilen nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünden (600 nm) daha küçük olduğu, yaş öğütme ve YBH ile hazırlanan nanosüspansiyonların ZP değerlerinin sırasıyla -42.7 ve -35.8 mV olarak saptandığı ve bu yüksek değerlerin partiküllerin agregasyonunu önlediği ifade edilmiştir. Nanosüspansiyonların dondurarak kurutma öncesi ve sonrası partikül büyüklükleri ölçülmüştür. Mannitol ilave edilen kurutulmuş tozların kolayca disperse edildiği ve süspansiyonun dondurarak kurutma öncesi ve sonrası partikül büyüklüklerinin benzer olduğu da saptanmıştır. Ayrıca, gerçekleştirilen çözünme testinde, danazol nanosüspansiyonlarında e.m.'nin %50'sinin çözünmesi için gereken süre 15 dakika iken bu süre danazol süspansiyonları için 1 saat olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, yaş öğütme ile elde edilen nanosüspansiyonlara göre YBH ile elde edilen nanosüspansiyonların önemli ölçüde daha hızlı çözündüğü tespit edilmiştir. Artan çözünme hızı üzerinde küçülen PB, artan yüzey alanı, yüzey aktif madde varlığı (hemen ıslanma açısından önemli) ve buhar basıncı etkisiyle artan doyunluk çözünürlüğü gibi faktörlerin etkili olduğu, ek olarak; "Prandtl" denklemi ile açıklandığı gibi difüzyon mesafesinin, nano-boyutlu partiküllerin artan



eğriliği (artan eğrilik, partiküllerin etrafındaki sodyum glikokolat varlığına bağlanmıştır) ile azaldığı ve çözünme hızının artmasına katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlarda yapılan çalışmalarda, nanosüspansiyon halinde e.m.'nin artmış çözünme hızı ve doygunluk çözünürlüğünden dolayı oral biyoyararlanımın arttığı bulunmuştur. YBH ve yaş öğütme ile hazırlanan nanosüspansiyonlar için AUC değerleri sırasıyla yaklaşık 681 nM.h ve 915 nM.h olarak saptanırken danazol süspansiyonu için bu değer yaklaşık 332 nM.h olarak bulunmuştur. Cmax değerlerinde ise süspansiyona göre YBH ve yaş öğütme ile hazırlanan nanosüspansiyonlar için elde edilen Cmax değerlerinde sırasıyla 4 ve 6.7 katlık bir artış sağlandığı tespit edilmiştir. Bu sonuçların, YBH ve yaş öğütme ile hazırlanan nanosüspansiyonlar için elde edilen in vitro çözünme testi sonuçlarını yansıtmadığı da vurgulanmıştır [39].

Liu ve ark. [40] resveratrol ve resveratrol-sodyum kolat için H42 (püskürtürerek kurutma ve YBH yöntemlerinin birlikte kullanımını içeren teknoloji) yöntemini ve deney tasarımı yaklaşımını kullanarak daha az homojenizasyon döngüsü (5 döngü) ile çok küçük resveratrol partiküllerini (192 nm) elde etmişlerdir. H42 yöntemi ile daha küçük partiküllerin elde edilmesi için e.m. konsantrasyonunun ve etkin madde:sürfaktan oranının önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Gao ve ark. [27] tarafından intravenöz yolla kullanıma yönelik olarak ortalama 250.6 nm (132.6–360.8 nm) boyutunda olan ve -27.92 mV ZP değerine sahip kurkumin nanosüspansiyonları çöktürme ve YBH yöntemleri birlikte kullanılarak hazırlanmıştır. Stabilizan olarak soya lesitini ve anyonik sürfaktan olan sodyum deoksikolat kullanılmıştır. Nanosüspansiyon halinde kurkuminin çözünürlüğü ve çözünme hızı küçük PB'den dolayı önemli derecede artmıştır. Nano-boyutlu partiküllerin, yüksek adeziv özellik göstermesi ve hücre membranından artan geçişi (nanopartikülleri çevreleyen stabilizanlardan dolayı), kurkumin nanosüspansiyonlarının hücrelere [HeLa (insan serviks kanseri hücre hattı) ve MCF-7 ] daha yüksek derecede bağlanmasına ve hücreler tarafından alınmasına katkıda bulunmuş ve bu durum da daha yüksek sitotoksositeye neden olmuştur.

Nanosüspansiyonların hazırlanmasında ağırlıklı olarak ÖY, YBH ve bu iki yöntemin birarada etkin bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Özellikle, bu iki yöntemin birarada kullanılması daha kısa sürede daha küçük partiküllerden oluşan dayanıklı nanosüspansiyonların elde edilmesini sağlamaktadır.

### Stabilizanlar

Nanosüspansiyonların fiziksel stabilitesi (dayanıklılığı, kararlılığı) üzerinde hazırlama yöntemleri, işlem koşulları (sıcaklık vb), etkin madde:stabilizan oranları, stabilizan tipi (etkin madde-stabilizan etkileşimleri) gibi başlıca

faktörler etkili olmaktadır [41].

Stabilizanlar, nanosüspansiyon formülasyonlarına sistemin serbest yüzey enerjisini azaltmak ve elektrostatik/sterik stabilizasyon ile partiküllerin agregasyonunu önlemek ve kararlı bir nanosüspansiyon formülasyonu hazırlamak üzere ilave edilirler. Stabilizan olarak, polimerler [PVP, hidroksipropil metil selüloz (HPMC), hidroksipropil selüloz (HPC), D- $\alpha$ -tokoferol polietilen glikol süksinat (TPGS), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), kitosan vb.]; iyonik sürfaktanlar [sodyum lauril sülfat (SLS), poli (etilen imin) vb.]; iyonize olmayan sürfaktanlar [Tween 80, poli(etilen oksit)-poli (propilen oksit) vb.] kullanılabilir. Bu sıklıkla kullanılan stabilizanlara ek olarak, soya fasulyesi protein izolatu, peynir altı suyu protein izolatu ve  $\beta$ -laktoglobulin gibi gıda proteinlerinin de nanosüspansiyon formülasyonlarında stabilizan olarak kullanıldığı bildirilmiştir [42-45]. Nanosüspansiyonların hazırlanmasında kullanılan stabilizanlar e.m. partiküllerinin yüzeyine adsorbe olarak sterik/elektrostatik engellemeyle nanosüspansiyon kararlılığını sağlamalıdır. Yüzeye adsorbe olan zincir moleküllerinin sürekli termal hareketi dinamik olarak pürüzlü bir yüzey oluşturur ve bu da itici entropik kuvvetler yoluyla agregasyonu engeller [42]. Başarılı bir korumanın sağlanması için stabilizanın partikülün tüm yüzeyine güçlü ve hızlı bir şekilde adsorbe olması gerekmektedir. Sterik stabilizanın molekül ağırlığı arttıkça adsorpsiyon hızı azalır. Polimer uzunluğu ve molekül ağırlığı, partikül yüzeyine fiziksel adsorpsiyon için termodinamik itici güçlerdir. Uygun bir sterik ve elektrostatik koruma sağlayan stabilizanların seçimi ve en uygun konsantrasyonda kullanılması nanosüspansiyon formülasyonlarında kritik bir önem taşımaktadır. Yeni stabilizanların geliştirilmesi ve bulunması nanosüspansiyon teknolojisinin gelişmesi için önemlidir [42]. Nanosüspansiyonların kararlılığını artırmak üzere yardımcı stabilizanlar da kullanılabilir. Örneğin, yapılan bir çalışmada, katyonik bir polimer olan kitosan negatif yüklü nitrendipin nanokristallerini modifiye etmek üzere kullanılmıştır. Öncelikle, PVA kullanılarak çöktürme ve YBH yöntemlerinin kombinasyonu ile nanokristaller hazırlandıktan sonra yüzey modifikasyonunu sağlamak üzere kitosan çözeltisi (%0.2 a/a) içinde dağıtılmış ve kitosanın yüzeye adsorpsiyonu gerçekleştirildikten sonra PB 175 nm olarak saptanmıştır. Kitosan modifikasyonu sonrası PB'de hafif bir artış olduğu, kitosan molekül ağırlığının PB ve dağılımı üzerinde önemli bir etki göstermediği saptanmıştır. Sterik etkinin, adsorbe edilen tabakanın kalınlığındaki artışa (polimer molekül ağırlığı artışı ile artar) bağlı olarak artacağı ifade edilmiştir. Ayrıca, kitosan kullanılmadan hazırlanan nanokristallerin ZP değeri -6.58 mV iken kitosan kullanımıyla bu değer +40 mV'a yükselmiş ve bu da PB'nin artmasını önleyecek kadar yüksek bir elektrostatik itme sağlamıştır. Dahası, nanokristallerin yüzeyine adsorbe olan kitosan, nanokristallerin PB kararlılığını daha da artıran sterik bir engel sağlamıştır [44].

Yapılan diğer bir çalışmada farklı stabilizanlar (polimerler: HPMC, TPGS, hidrokspipil- $\beta$ -siklodekstrin (HP- $\beta$ -CD)); iyonik olmayan sürfaktan: Poloksamer 188 ve iyonik sürfaktanlar: soya lesitini, SLS) ve bunların kombinasyonları kullanılarak mirisetin nanosüspansiyonları çöktürme ve YBH yöntemlerinin birlikte kullanımıyla hazırlanmıştır. Stabilizanların nanosüspansiyon partikül büyüklüğü üzerindeki etkileri incelendiğinde PB değişimi (yaklaşık 300-500 nm) HPMC<HP- $\beta$ -CD<TPGS<SLS<soya lesitini<poloksamer 188 şeklinde tespit edilmiştir. Sürfaktan kullanılan nanosüspansiyonlara göre polimerlerin kullanıldığı nanosüspansiyonların daha küçük boyutlu olduğu saptanmıştır. ZP değerleri (yaklaşık -12 ile -41 mV aralığında) açısından da sürfaktanlar kullanıldığında daha yüksek ZP değerleri elde edilmiştir. Stabilizan tipinin hem PB hem de ZP üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. PB açısından hazırlama yönteminin kritik belirleyici faktör olduğunu ifade eden diğer çalışmalarla bu çalışmanın uyuşmadığı, PB üzerinde stabilizan tipinin önemli bir etkiye sahip olduğu ve bunda stabilizanların sahip olduğu hidrofilik-lipofilik dengenin etkili olduğu ifade edilmiştir. Nanosüspansiyonların stabilitesi açısından sterik olarak stabilize edilmiş nanosüspansiyonların stabilitesi için -20 mV ve elektrostatik olarak stabilize edilen sistemler içinse en az -30 mV'luk ZP değerinin sağlanması gerektiği ifade edilmiştir. Soya lesitini ve soya lesitini+TPGS kullanıldığında elde edilen nanosüspansiyonların ZP değerlerinin -41 mV ve -28.2 mV olarak saptandığı ve dayanıklı formülasyonlar olduğu belirtilmiştir. TPGS ve HB- $\beta$ -CD+TPGS kullanıldığında ise partikül büyüklüğü değerleri sırasıyla yaklaşık 386 nm ve 316 nm olarak bulunmuş ancak ZP değerleri ise < -20 mV olarak saptanmıştır. Bu çalışmada, sıçanlara TPGS, soya lesitini, soya lesitini + TPGS ve HP- $\beta$ -CD + TPGS ile stabilize edilmiş nanosüspansiyonların oral uygulanması sonrası artmış doyunluk çözünürlüğü ve çözünme hızı nedeniyle bu nanosüspansiyonların, mirisetin süspansiyonu ile karşılaştırıldığında daha yüksek Cmax ve AUC değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Soya lesitini+TPGS kullanılan nanosüspansiyonların uygulanması sonrası mirisetin absorpsiyonunun bu stabilizanların tek tek kullanıldığı nanosüspansiyon formülasyonları ile karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiş ve bu sonucun doyunluk çözünürlüğü (soya lesitini+TPGS kullanıldığında 466.28  $\mu$ g/mL; sadece soya lesitini kullanılan nanosüspansiyonlar için bu sonuç 367.15  $\mu$ g/mL iken TPGS kullanıldığında ise 399.68  $\mu$ g/mL) sonuçları ile uyumlu olmadığı ancak, PB sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu iki stabilizan birlikte kullanıldığında ise PB artmıştır. Sonuç olarak, nanosüspansiyonlar için uygun stabilizan/stabilizan karışımı belirlenirken PB, doyunluk çözünürlüğü ve in vivo emilim arasındaki ilişki dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir [46].

Guo ve ark. [47] bisiklik diterpen lakton yapısında olan

ve antienflamatuar, etkiye sahip andrografolit maddesinin akut inflamasyon tedavisinde injeksiyon halinde uygulanmasını kısıtlayan zayıf çözünürlük sorununun aşılması amacıyla nanosüspansiyon formülasyonlarını geliştirmişlerdir. Bu amaçla, yaş öğütme yöntemini ve farklı iyonik özelliklere [iyonize olmayan (poloksamer 188), zwitter/iyonik (yumurta-fosfatidilkolin, sodyum deoksi kolat/sodyum tauroursodeoksi kolat)] sahip stabilizanları %2 oranında kullanarak nanosüspansiyon formülasyonlarını hazırlamışlardır. Nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerinde stabilizan tipinin ve konsantrasyonun etkili olduğu, poloksamer 188 konsantrasyonunun (%3-%6) artırılmasıyla nanosüspansiyon (% 5 poloksamer 188 kullanıldığında ortalama partikül büyüklüğü 301 nm) hazırlanabilirken fosfatidilkolin (% 0.1-0.5) kullanıldığında ise nanosüspansiyon (ortalama partikül büyüklüğü >1527 nm) elde edilememiştir. Poloksamer konsantrasyonunun %6'ya çıkarılmasının partikül büyüklüğünde ileri bir düşüş sağlamadığı da tespit edilmiştir. Stabilizan olarak poloksamer yapısının önemli bir üstünlük sağladığı, poloksamerin hidrofobik polipropilen oksit kısmının etkin madde partiküllerinin yüzeyine stabilizanın tutunmasında etkin olduğu, hidrofilik polietilen oksit kısmının ise partikülü çevreleyerek agregasyona karşı sterik bir engel oluşturduğu ve bundan dolayı da fosfatidilkolin yağ asitlerine göre poloksamerin polipropilen oksit kısmının partikül yüzeyine karşı daha yüksek afiniteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte, uygulama öncesi injeksiyonluk preparatların genellikle seyreltilmesi gerekliliği göz önünde bulundurularak seyreltme sırasında (%5 glukoz çözeltisi ile 10 kat seyreltme) nanosüspansiyonun stabilitesini artırmak üzere iyonik stabilizanlar farklı konsantrasyonlarda kullanılmış ve iyonik stabilizanın konsantrasyonu arttıkça nanosüspansiyonun partikül büyüklüğünde düşüş, zeta potansiyelinin mutlak değerinde ise artış sağlanmıştır.

Ayrıca, e.m. özellikleri de stabilizan seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır. George ve ark. [16], erime noktaları 151.4-244.9 °C, entalpi değerleri 74.0-244.9 J/g, LogP değerleri 1.6-4.5, molekül ağırlıkları 230.26-448.56 g/mol ve çözünürlükleri 0.3-170  $\mu$ g/mL olan 6 farklı bileşiğin nanosüspansiyonlarını hazırlamak üzere elektrostatik (SLS, sodyum dioktil sülfosüksinat (SDOS)) ve sterik (TPGS, Pluronic F127) stabilizanlar kullanmışlardır. Ayrıca, bütün formülasyonlarda sterik stabilizan olarak HPMC'de kullanılmıştır. ÖY ile elde edilen formülasyonların ZP değerleri iyonik stabilizanlar kullanıldığında (SLS ve SDOS) yaklaşık -20 mV civarında bulunmuştur. Yüksek erime noktasına sahip etkin maddelerin sterik stabilizanlar ile kararlı nanosüspansiyonlarının hazırlanamadığı, entalpinin moleküller arası etkileşim kuvvetinin bir göstergesi olduğu, daha düşük entalpiye (88.9 ve 74.0 J/g) sahip olan etkin maddelerin zamanla agregasyona (topaklanmaya) uğradığı raporlanmıştır. Öğütme sonrası hemen ölçülen partikül büyüklüğü verilerine göre,

sterik stabilizanlarla başarısız sonuçlar veren aday bileşiklerin düşük entalpiye (88.9 ve 74.0 J/g) sahip bileşikler olduğu ve öğütme süresinin artırılmasının da bu sistemlerde partikül büyüklüğünü düşürmede faydalı olmadığı saptanmıştır. Stabilizanın partikül yüzeyine adsorpsiyonu çeşitli etkileşimlerle (iyonik etkileşim, hidrojen bağı, van der Waals veya iyon-dipol etkileşimi veya hidrofobik etki) gerçekleşmektedir. Yaş öğütme ile elde edilmiş partiküllerin yüzeyi genellikle hidrofobiktir, böylece, daha yüksek oranda hidrofobik olan stabilizan partikül yüzeyine daha fazla oranda adsorbe olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan stabilizanlar arasında en fazla hidrofobik olan TPGS ile düşük LogP (1.6 ve 1.7) değerlerine sahip bileşikler için en az kararlılığa sahip nanosüspansiyon formülasyonları hazırlanırken SLS ve SDOS'un ise zayıf çözünür özelliğe sahip partiküllerle etkileşimlerinin yüksek olduğu ve bu nedenle artmış kararlılık sağladıkları ifade edilmiştir. Yüksek Log P'ye sahip bileşiğin (LogP: 4.5), sadece SLS kullanılmasıyla kararlı bir nanosüspansiyonunun hazırlanabildiği SDOS kullanımıyla hazırlanamadığı belirtilmiştir. Stabilizanlarda hidrofobik alanların varlığı adsorpsiyon ile ilişkili serbest enerji düşüşünü sağlamak için önemlidir. Ayrıca, çözünme ve çökme risklerinden dolayı, hidrofobik bileşikler nanosüspansiyon formülasyonu için hidrofilik bileşiklere göre daha iyi adaydırlar [16]. Etkin madde adayı bileşiklerin özelliklerine göre uygun stabilizan seçimi Şekil 3'te özetlenmiştir. Çalışma sonucunda, bilyeli öğütme tekniğinde elektrostatik/sterik olarak stabilize edilebilecek en uygun adayın, yüksek entalpiye sahip hidrofobik bileşik olduğu saptanmıştır [16]. E.m.'lerin logP değeri ve entalpisi kararlı bir nanosüspansiyonun hazırlanabilmesi için önemlidir. Kullanılan stabilizandan bağımsız olarak, düşük entalpiye sahip e.m.'ler nanosüspansiyon formülasyonunun geliştirilmesi için zayıf adaydırlar. Ayrıca, düşük logP değerlerine sahip e.m.'ler en az kararlı nanosüspansiyon formülasyonlarını oluştururlar [41].

Yaş öğütme yöntemiyle nanosüspansiyon formülasyonları hazırlanan etkin maddeler (ibuprofen, naproksen, prednisolon asetat, nifedipin, hidrokortizon asetat, itrakonazol) ile stabilizanlar (HPC ve PVP) arasındaki etkileşimler de incelenmiştir. HPC'nin stabilizan olarak kullanıldığı prednisolon asetat ve hidrokortizon asetat nanosüspansiyonları için önemli bir PB düşüşü elde edilememiştir. Sadece bu iki etkin maddenin HPC gibi hidroksil (-OH) fonksiyonel grupları vardır. Bu nedenle, iki hidroksil grubu arasında hidrojen bağı oluşumu söz konusudur. Etkin maddelerin taşıdığı fonksiyonel gruplar ve polimerler arasındaki özgün etkileşimler, polimerlerin stabilizasyon aktivitesine etki etme eğilimindedir. Polar fonksiyonel grupları içermeyen hidrofobik bir yüzey, HPC ve PVP'nin fiziksel adsorpsiyonu ve sterik stabilizasyonu sağlaması için idealdir [41].

Sonuç olarak, dayanıklı bir nanosüspansiyon formü-

lasyonu geliştirilirken başlıca, e.m.'nin fizikokimyasal özelliklerine, stabilitesine, stabilizanın tipine, stabilizanın konsantrasyonuna, partikülün stabilizanla etkileşim durumuna (e.m.'nin yüzey özelliklerine göre) ve uygun hazırlama yönteminin seçimine dikkat edilmelidir.

### **Nanosüspansiyonların Stabilitesi**

Nanosüspansiyonlarla ilgili olarak gerek akademik gerekse endüstri alanında önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, çekirdeklenme ve partikül büyümesi nedeniyle stabilite problemleri söz konusudur. Nanosüspansiyonlardaki partiküllerin artmış yüzey alanı, onlara eşsiz biyofarmasötik özelliklerini kazandırır, ancak, aynı zamanda sistemi termodinamik açıdan kararsız hale getirerek agregasyon ve kristal büyümesini teşvik eder. Nanosüspansiyon teknolojisinin geliştirilmesi sırasında ve farmasötik uygulamalarda stabilite konuları kaçınılmaz olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu nedenle bu alanlardaki gelişmelerde sınırlayıcı adım olmaktadır. Uygun stabilizan maddeler kullanılmadığında yüksek serbest yüzey enerjisi PB'nin artmasına neden olmaktadır [41]. "Ostwald ripening" (partiküllerin farklı büyüklüklere sahip olması ve buna bağlı olarak gelişen çözünürlük farkından dolayı partiküllerin büyümesidir) etkisi kristal büyümesi sebeplerinden birisidir. Sistemin polidispers olması ve dispers fazın dispersiyon ortamında sınırlı bir çözünürlüğe sahip olması bu etkinin görülmesinde iki ön koşulu oluşturmaktadır. Bu iki koşula farmasötik nanosüspansiyonlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Ayrıca, nanosüspansiyon hazırlanmasında kullanılan stabilizanların çoğunluğu çözünürlüğü artırarak "Ostwald ripening" etkisini artırabilir. Daha küçük partiküllerin çözünmesi ve küçük partiküllerden büyük partiküllere doğru gerçekleşen kütle transferinden dolayı partikül büyümesi gerçekleşmektedir. Bu nedenle, nanosüspansiyonların ayrılmaz bir parçasını oluşturan stabilizanların, nanosüspansiyonların fiziksel stabilitesinin sağlanması açısından özelliklerinin ve sistem üzerindeki etkilerinin çok iyi anlaşılması gerekmektedir [44]. Nanosüspansiyonların üretimi sırasında veya raf ömrü süresince kristal büyümesinin meydana gelmesiyle spesifik yüzey alanının azalması e.m.'nin çözünme özelliklerini ve in vivo performansını doğrudan etkiler. Stabilizanlar, yüksek enerjili nanosüspansiyonların agregasyonunu önlemek için son derece önemlidir. Ancak, farklı etkin maddeler farklı stabilizanlar gerektirir ve tüm etkin maddeler ve hazırlama yöntemleri için tek bir stabilizan sistemi yoktur [16,41]. Ne yazık ki, stabilizan seçimi ve optimizasyonu için sistematik ampirik veya teorik bir kılavuz bulunmamaktadır. Dolayısıyla, belirli bir formülasyon için uygun stabilizanın belirlenmesi çoğunlukla zordur ve genellikle zaman alıcı ve verimsiz olan basit bir deneme-yanılma yaklaşımı izlenmektedir. Dahası, stabilizanın tipi ve miktarı, nanosüspansiyonların fiziksel stabilitesi ve in vivo davranışları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yukarıda bahsedilen sorunlara ek olarak, büyük miktarlarda stabilizanın uzun süreli kullanımı

ile ilgili potansiyel toksisite endişeleri, nanosüspansiyonların terapötik uygulanımını da kısıtlamaktadır. Örneğin, nanosüspansiyonların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan ticari bir yüzey aktif madde olan Tween® 80, ciddi nörotoksisiteye, nefrotoksisiteye ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilmektedir [41].

İbuprofen nanosüspansiyonlarının stabilizasyonu üzerinde partikül yüzeyindeki stabilizan moleküllerinin (Pluronic F68, Pluronic F127, PVP K30, HPC ve HPMC) düzenlenmesinin/konformasyonunun etkisi Atomik Kuvvet Mikroskopu kullanılarak incelenmiştir. İbuprofen yüzeyine HPMC tamamen açık ve uzun bir konformasyonda [zincir yüksekliği (Y) ve genişliği (G) sırasıyla 2.7 ve 43 nm] adsorbe olmuşken, PVP, partikül yüzeyine küresel yapılar halinde (Y:12-28 nm, G:100-200 nm) adsorbe olmuştur. Pluronic F68 ise hafifçe uzatılmış yapılar şeklinde (Y:1.5 nm, G:42 ve 70 nm uzunluğunda) partikül yüzeyine adsorbe olurken HPC, ibuprofen yüzeyine HPMC'ye benzer olarak açık zincir (Y:3 nm ve G:40 nm) şeklinde adsorbe olmuştur. Bu sonuçlar, etkili bir yüzey kaplamanın sağlanması için ibuprofen yüzeyiyle etkileşim açısından araştırılan stabilizanlar arasında HPMC'nin en iyisi olduğunu göstermiştir. HPMC'nin hidrofobik omurgası ile ibuprofen yüzeyinde bulunan hidrofobik gruplar arasındaki etkileşimlerin yoğun ve güçlü adsorpsiyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir [42].

Farklı stabilizanlar, nanosüspansiyon kararlılığını etkileyecek şekilde farklı morfolojilere ve bundan dolayı da farklı yüzey alanlarına ve dağılılabirlik özelliklerine neden olurlar [41,48]. Selekoksisib nanosüspansiyonları Tween 80, PVP K-30 ve SLS kullanılarak emülsiyon-difüzyon yöntemi ile hazırlanmış ve Taramalı Elektron Mikroskopu kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik özellikleri incelenmiş ve stabilizanların morfolojik özellikleri etkilediği saptanmıştır. Mikronize selekoksisibinin (2-100 µm) iğne şekilli kristaller halinde olduğu görülürken, Tween® 80'in stabilizan olarak kullanılmasıyla elde edilen selekoksisib partiküllerinin bazılarının 200 nm'nin altında boyutlara sahip olduğu ancak, bunların yanısıra plaka şeklinde daha büyük yapıların da olduğu gözlenmiştir. Bu durumda, kurutulan nanokristallerin agregasyona uğramış olabileceği belirtilmiştir. PVP veya SLS kullanıldığında ise nanoboyutlu ince plakaların agregasyona uğrayarak küresel yapılar oluşturduğu görülmüştür. PVPK-30 ve SLS kullanılarak hazırlanmış selekoksisib nanosüspansiyonlarının kurutulan ürünün yapışması ve DSC termogramları üzerindeki beklenmedik değişiklikler nedeniyle Tween® 80'in stabilizan olarak kullanıldığı nanosüspansiyonlara göre üstünlük sağladığı raporlanmıştır [49].

### **Nanosüspansiyonlarda stabilite problemleri:**

#### **✓ Agregasyon (Topaklanma)**

Nanosüspansiyonlar, uygun bir stabilizan kullanılmadığında, saklama sırasında veya katı hale getirilme

durumunda agregasyona uğrayabilir. Uygun olmayan stabilizanların kullanımı ve PB dağılımının geniş olması durumları partiküllerin agregasyonuna neden olmaktadır. Farklı büyüklüklere sahip partiküllerin birarada bulunması çözünürlük açısından farklılıklara neden olmaktadır. Agregasyonu ve "Ostwald ripening" etkisini azaltmak için, nanosüspansiyon hazırlanması sırasındaki çözünürlük farklılıklarının sınırlandırılması sağlamak üzere zayıf çözünür etkin maddeler kullanılmalıdır. Ayrıca, sistemin polidispersite indeksinin küçük olması gerekmektedir. Bununla birlikte, nanosüspansiyonların termodinamik olarak kararsız olması, "Ostwald ripening" etkisi ve nano-boyutlu sistemin Gibbs serbest enerjisini azaltma eğilimi bu sistemlerde agregasyon riskini artırmaktadır. Bu nedenle, agregasyonu önlemek/azaltmak, dayanıklı nanosüspansiyonların geliştirilmesi için önemlidir ve bu nedenle, uygun stabilizanların kullanılması gerekmektedir. Bir stabilizanın etkinliği, etkin madde ile etkileşim potansiyeline bağlıdır. Agregasyon, hazırlama sırasında veya raf ömrü boyunca gerçekleşebilir. Nanosüspansiyon hazırlanmasında yukarıdan aşağıya yaklaşımları kullanıldığında yüzey alanı arttıkça nano-boyutlu partiküller termodinamik etki nedeniyle agregasyona uğrar, bu durum yöntemin etkinliğini azaltmaktadır. Bundan dolayı, öğütme veya YBH sırasında stabilizan kullanılması kritik öneme sahiptir. Uygun stabilizanın ve konsantrasyonunun seçilmesi dayanıklılık için kritik parametrelerdir. TPGS gibi amfifilik polimerler, partiküllerin yüzeyine adsorbe olur ve yüzeyde adsorbe olan zincir moleküllerinin devamlı termal hareketi sonucu dinamik bir yüzey oluştururlar ve itici entropik kuvvetler nedeniyle agregasyon önlenir [41,44].

Ghosh ve ark. [50] stabilizan olarak TPGS'yi kullanarak yaş öğütme yöntemiyle nanosüspansiyon formülasyonları hazırlamışlar ve etkin madde:TPGS oranlarının (4:1; 2:1; 1:1) nanosüspansiyon stabilitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Altı haftalık stabilite çalışması sırasında, 4:1 oranı kullanıldığında önemli derecede partikül büyümesi saptanırken, 2:1 ve 1:1 oranları kullanıldığında ise kristal büyümesinin en aza indirildiği ve daha dayanıklı nanosüspansiyonların hazırlandığı ifade edilmiştir. Ayrıca, TPGS kullanılan formülasyona HPMC'nin dahil edilmesi durumunda sistemin viskozitesinin arttığı ve kristal büyümesinin engellenmesinde katkı sağladığı bildirilmiştir [51].

Paklitaksel nanokristallerini hazırlamak üzere stabilizan olarak Pluronic F127 seçilmiş ve nanokristal kararlılığı üzerinde misel oluşumunun etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, nanosüspansiyon hazırlanması sırasında. Pluronic F127 miktarı artırılmıştır (e.m.:stabilizan oranı: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 a/a), 1:5 a/a oranı kullanıldığında misel oluşumu gözlenmezken, 1:20 ve 1:30 a/a oranlarında ise misel oluşumu görülmüştür. Pluronic F127'nin düşük konsantrasyonlarında, monomerler partikül yüzeyine yüksek afinite ile adsorbe olurken yüksek konsantrasyonlarında

monomerler agregasyona uğrar ve yüzeye düşük afinite ile adsorbe olur. Yüzey adsorpsiyonu için yarışan misel oluşumu söz konusudur. CMC'nin altındaki ve üzerindeki konsantrasyonlarda sürfaktan partikül yüzeyleri için farklı adsorpsiyon afiniteleri göstermiştir. CMC'nin altında monomerler, partikül yüzeyi için yüksek afiniteye sahipken CMC'nin üzerindeki konsantrasyonlarda partikül yüzeyine düşük afinite göstermiştir Pluronic F127 konsantrasyonu arttıkça monomerlerin partiküllere olan yüksek afinitesi azalmaya başlamakta ve bunun yerine birbirleriyle daha fazla etkileşime girmekte ve sonuç olarak misel oluşumu nanosüspansiyon stabilitesini azaltmaktadır [52]. Uygun bir polimer:e.m. oranının (sterik stabilizan) 0.05:1 ile 0.5:1 aralığında olduğu bildirilmiştir [41].

Stabilizan konsantrasyonuna ek olarak sıcaklıkta, nanosüspansiyon stabilitesinin belirlenmesinde önemli bir faktördür. Partikül ve stabilizan arasındaki hidrofobik etkileşimlerin oluşumu negatif entropik bir süreçtir. Bundan dolayı, daha yüksek nanosüspansiyon sıcaklığı, termodinamik açıdan nanosüspansiyon kararlılığı için olumsuz bir durum oluşturur. Dolayısıyla, hidrofobik nanosüspansiyonlarda, agregasyon eğilimi yüksek sıcaklıkta artar [41]. Yeni hazırlanan paklitaksel nanosüspansiyonlarının partikül boyutu yaklaşık 176 nm iken 37 °C'de 2 saat inkübasyon sonrası daha uzun kristaller oluşarak partikül boyutu 258 nm'ye yükselmiştir. Partikül yüzeyindeki stabilizan daha yüksek sıcaklıklarda partikül yüzeyinden ayrılır ve sonuçta, partikül büyüklüğü artar [52].

#### ✓ Çökme (Sedimentasyon)

Çökme, nanosüspansiyon stabilitesi açısından oluşabilecek sıra dışı bir sonuçtur. Moleküler dağılımlardan kolloidlere veya kolloidlerden kaba dağılımlara kadar boyut aralıklarının geçişi çok yavaştır. Bununla birlikte, partiküllere etkileyen yerçekimi, yüzme kuvvetinden daha büyük olduğunda çökme kaçınılmazdır [41]. Yapılan bir çalışmada, asetaminofen nanosüspansiyonları, mikroakışkan reaktörlerde nano-çöktürme tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Sürfaktan konsantrasyonu, çözücü ve çözücü olmayan sıvının akış hızı, çözücü sıcaklığı değişkenlerinin çökme süresi üzerindeki etkileri incelendiğinde sıcaklığın ve çözücü olmayan sıvının akış hızının çökme süresi ile doğrudan ilişkili olduğu çözücü akış hızının ise ters orantılı olduğu saptanmıştır [53].

Bununla birlikte, flokülasyon (kümelenme), partiküller arasındaki çekim kuvvetlerinden kaynaklanan kolloidal dağılımlardaki diğer bir dengesizlik olayıdır. Bu durum DLVO teorisi ile açıklanmaktadır. Flokülasyon durumunda, partiküller gevşek agregatlar oluşturur, çökme hızı yüksektir ve partiküller sıkı bağlanmadığı içinde çökelti gevşektir [5,41]. Nanosüspansiyonlarda flokülasyon, polimer köprüleri, yük nötralizasyonu, polimer-partikül yüzey kompleks oluşumu veya bu mekanizmaların birarada görülmesiyle oluşabilir. Polimerin özelliğine ve partikül

yüzeyi ile etkileşimine bağlı olarak, flokülasyon için iki olası mekanizma vardır: (1) nanokristallerin yüzeyine bir makromolekülün adsorpsiyonu sonucu köprü oluşumu ve (2) yüzey yükü nötralizasyonu [41].

Flokülasyon, yüksek miktarda etkin madde içeren ve hızlı çözünen ıslanabilir nano-boyutlu tozların hazırlanması için bir ara adım olarak da kullanılabilir. Örneğin, oral yolla kullanıma yönelik naproksen nanosüspansiyonları, stabilizan olarak PVP-K15 ve/veya poloksamer 407 ve flokülasyon ajanı olarak sodyum sülfat kullanılarak çöktürme yöntemiyle hazırlanmış, süzölmüş ve daha sonra vakum altında kurutularak sistem katı hale getirilmiştir. Flokülasyon ve süzme işlemlerinin çeşitli üstünlüklere sahip olduğu belirtilmiştir. Bu üstünlükler; flokların defloküle süspansiyondan çok daha hızlı ve verimli bir şekilde süzölebilmesi, süzmenin püskürterek kurutma ve diğer çözücü buharlaştırma tekniklerine göre düşük sıcaklıklarda kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi (çünkü, yüksek sıcaklıklarda kurutma, istenmeyen partikül büyümesine neden olabilir), süzme ile ayırma, örneğin su ile azeotrop oluşturan etanol gibi çözücülerin ortamdan uzaklaştırılması sırasında karşılaşılan zorlukların önlenmesi ve kısa süreli işlemler olması şeklinde özetlenmiştir. Kurutma sonrası yeniden süspand edilen dağılımın partikül büyüklüğünün, flokülasyon öncesi hazırlanmış olan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü ile karşılaştırılabilir olduğu, 300 nm partikül boyutuna sahip partiküllerin 2 dakikada %95'inin çözüldüğü tespit edilmiştir. Sonuçlar, flokülasyon, süzme ve vakumla kurutma işlemleri sonrası yüksek etkin madde verimine sahip, kolayca disperse edilebilen, çözünme hızı yüksek olan, ıslanabilir nano-boyutlu partiküllerin elde edildiğini göstermiştir [54].

#### ✓ Kristal yapı dönüşümü

Dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma gibi katı hale getirme işlemleri, nanosüspansiyonların fiziksel ve kimyasal stabilitesini daha da artırmak için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardır. Bununla birlikte, bu işlemler sırasında, amorf yapının oluşumu, kristal oluşumundan çok daha az enerji gerektirir. Genel olarak, nanokristallerde, çözünmeyen etkin maddelerin tamamen veya kısmen amorf halde bulunması, çözünme hızını daha da artırmak için teorik olarak ideal bir yöntem gibi görülmekte amorf haldeki partiküller kristal haline göre termodinamik olarak kararsızdır. Kristal yapılar ise daha kararlıdır ve bu nedenle sıklıkla daha elverişlidirler. Bundan dolayı, üretim yöntemi ile amorf bir yapı elde edildiyse depolama ya da serbest bırakma sırasında amorf yapının kristal şekle dönüşme riski vardır ve bu durumda, nanosüspansiyonun saklanması sırasında kristal dönüşümü kaçınılmaz bir problemdir. Kristal dönüşümü, çözünürlüğü ve dolayısıyla terapötik etkinliği değiştirir ve sistemin kararsızlığına yol açabilir. Bu nedenle, katı hale getirme işlemi sırasında nanokristallerin kristal yapısının izlenmesi ve titizlikle kontrol edilmesi çok önemlidir [41].

de Waard ve ark. [55], lipofilik bir e.m.'nin (fenofibrat) çözünme davranışlarını iyileştirmek amacıyla aşağıdan yukarıya yöntemini kullanarak ve dondurarak kurutma sırasında kontrollü kristalizasyon sağlayarak bu maddenin nanokristallerini hazırlamışlardır. Öncelikle, e.m. tert-butil alkol (TBA) içinde, mannitol ise su içerisinde çözüldürülmüştür. Daha sonra bu çözeltiler yaklaşık 60 °C'ye getirilerek sulu çözelti e.m.-TBA çözeltisi ile karıştırılmış ve daha sonra dondurarak kurutma yöntemi ile kurutulmuştur. Farklı su/TBA oranlarında (6:4; 8:2; 7:3 ve 3:7; h/h) hazırlanan karışımda etkin maddenin kristalinite derecesi değişmiştir. 8/2 (h/h) su/TBA oranına sahip karışımdan hareketle hazırlanan örnek sadece %67 kristalinite derecesine sahipken su miktarı azaltılarak (6:4; 7:3 ve 3:7 (h/h)) hazırlanan örneklerde ise e.m.'nin kristalinite derecesinin % 80-91 arasında değiştiği saptanmıştır. Daha hızlı bir dondurma süreci ve ayrıca daha düşük su miktarı kullanımı sonucu kristal büyüklüğü küçülmüştür. Fenofibratın kristalleştirilmesi, dondurarak kurutma işleminin farklı aşamalarında (donma sırasında, kurutma sırasında veya her ikisinde de) meydana gelebilmektedir. Dondurma sırasında kristalleşme meydana geldiğinde, daha hızlı dondurma veya daha küçük bir su içeriği daha yüksek bir çekirdeklenme oranına neden olur. Sonuç olarak, daha fazla çekirdek ve böylece daha küçük kristaller oluşur. Kurutma esnasında kristalleşme, sıcaklığın en yüksek derecesinde dondurularak yoğunlaştırılmış kısmın camı geçiş sıcaklığının üzerinde ve ötektik sıcaklığın altında olduğu durumda gerçekleşebilir. Kristallerin büyümesi, çözücü kristalleri arasındaki boşlukların büyüklüğü ile sınırlanır. Bu boşlukların büyüklüğünün, dondurma hızının veya su/TBA oranının değiştirilmesiyle ayarlanabileceği, yavaş bir dondurmada (veya su/TBA oranı yüksek olduğunda), büyük çözücü kristalleri oluşacağı ve bunun da büyük ara boşluklara neden olacağı bildirilmiştir. Bununla birlikte, daha hızlı dondurmanın (veya çözeltideki su miktarının düşürülmesinin) ise küçük çözücü kristallerinin oluşumuna ve bunun da küçük ara boşluklara yol açacağı ifade edilmiştir. E.m. kristalizasyonu dondurularak yoğunlaştırılmış kısımda meydana geldiğinden, çözücü kristallerinin arasındaki boşlukların büyüklüğü e.m. kristallerinin nihai büyüklüğünü belirlemektedir. Sonuç olarak, dondurma hızının ve dondurarak kurutma öncesi su/TBA oranının, e.m. kristalleşme derecesini kontrol etmek için kullanılabileceği ifade edilmiştir [57].

#### ✓ *Kimyasal stabilite*

Fiziksel stabiliteye ek olarak, kimyasal stabilite de farmasötik alanda, ilaç şekillerinin geliştirilmesinde önemli bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Susuz ortamlarda hazırlanan nanosüspansiyonlar olmasına rağmen, genellikle, nanosüspansiyonlar sulu ortamlardaki dispersiyonlar halinde hazırlanmaktadır. Bundan dolayı, hidroliz ve oksidasyon gibi kimyasal reaksiyonlar, nanosüspansiyonların formülasyonu ve etkin maddenin

kimyasal stabilitesi açısından önemli sorunlardır. Bununla birlikte, nanosüspansiyonlar kimyasal olarak kararsız e.m.'lerin kimyasal kararlılığını arttırmak üzere potansiyel bir yaklaşım olarak da karşımıza çıkmaktadır, çünkü nanosüspansiyonların katı hale getirilebilmeleri sonucu e.m. foto-oksidasyona/fotolize, hidrolize ve oksidasyona karşı korunabilmektedir [41]. Flavonoid yapısından dolayı, kuersetin kimyasal ve termal olarak kararsız, alkali ortama, ışığa ve orta derecelerdeki sıcaklığa maruz kaldığında renk değişimine uğrayan bir bileşiktir. Bu nedenle, yüzey aktif madde veya yardımcı çözücü (etanol, Cremophor EL vb.) içeren çözelti formülasyonları halinde kuersetin üretim ve saklama sırasında değişime uğrayabilmektedir [56]. Kimyasal olarak kararlı kuersetin nanosüspansiyonlarını hazırlamak üzere çöktürme ve YBH yöntemleri kullanılmış, hazırlanan formülasyonlar için vakum altında kurutma işlemi uygulanmış ve kararlılığı iyileştirme açısından bu iki yöntem karşılaştırılmıştır. Çöktürme ve YBH ile hazırlanan nanosüspansiyonların PB'si sırasıyla 251.56±24.6 ve 192.47±31.8 nm bulunurken, kuru partiküllerin yeniden süspand edilmesi sonucu partikül büyüklükleri bu yöntemler için sırasıyla 282.6±50.3 ve 213.6±29.3 nm olarak saptanmıştır. Kimyasal ve foto-kararlılık çalışmalarında, kuersetin kararlılığı nanosüspansiyon formülasyonları ve sulu ortamdaki çözeltisi kullanılarak 1 ay boyunca değerlendirilmiştir. Işığa maruziyetin engellendiği koşullarda ve 25 °C'de, 1 ayda çözelti kuersetin içeriği %28.3 azalırken aynı koşullarda, nanosüspansiyon formülasyonlarındaki kuersetin içeriğinde önemli bir değişimin olmadığı saptanmıştır. Foto-kararlılık çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiş ve çözelti kuersetin içeriğinde %19.9'luk bir azalma olurken nanosüspansiyon formülasyonlarının e.m. içeriğinde önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Stabilizanların nanopartiküllerin yüzeyini kaplamasının koruyucu bir etki sağladığı ve ayrıca, nanosüspansiyon halinde sadece partiküllerin yüzeyinin su ve ışığa maruz kaldığı bu nedenle partiküllerin iç kısmı korunurken dış yüzeyinin bozunmaya uğradığı ifade edilerek e.m. stabilitesinin nanosüspansiyon halinde iyileştirildiği belirtilmiştir [56].

Antioksidan ve antienflamatuvar özelliklere sahip polifenolik bir bileşik olan glabridinin deriden penetrasyonunu artırmak üzere hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonu (ortalama partikül büyüklüğü: 149.2 nm) önemli bir partikül agregasyonu görülmeyen ve glabridin kaybının da sadece % 5.46 olduğu oda sıcaklığında 3 ay boyunca bekletildiğinde dayanıklı bir nanosüspansiyon formülasyonu hazırlandığı belirtilmiştir [58].

Andrografolit nanosüspansiyonları dondurarak kurutma yöntemiyle katı hale getirilerek farklı sıcaklıklardaki (60±2, 40±2, 25±2, 4±2 °C) kimyasal stabilitesi incelendiğinde, 6 ay boyunca bu sıcaklıklarda andrografolit maddesinin degradasyona uğramadığı, çünkü dondurarak kurutma yöntemi ile suyun ortamdan uzaklaştırıldığı, bu şekilde etkin maddenin hidrolizden korunduğu, aynı

zamanda, partikül yüzeyindeki stabilizan varlığının ve kristal yapıların da formülasyonun stabilitesini artırdığı belirtilmiştir. Andrografolit nanosüspansiyonları sıçanlara uygulandıktan sonra kan ve doku örneklerinde etkin maddenin stabilitesi de değerlendirilmiş ve 4 saat boyunca anlamlı bir etkin madde degradasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür. Biyolojik örneklerdeki andrografolit stabilitesi gittikçe azalan sıralamayla akciğer>dalak>karaciğer>kan olarak belirlenmiş ve bozunmanın özgül olmayan esterazlar ve laktonazlar tarafından ester bağının kırılması sonucu gerçekleştiği, ayrıca, degradasyon hızının ve derecesinin, bu enzimlerin kan ve dokulardaki çeşitlerine ve düzeylerine bağlı olduğu da belirtilmiştir [47].

### **Hazırlama yöntemlerinin stabilite üzerindeki etkileri**

Tüm nanosüspansiyon hazırlama yöntemleri, termodinamik ve kinetik kararsızlığı azaltmalıdır. Ancak, farklı yöntemler, PB'nin azaltılması ve yüzey alanının artırılması üzerine farklı teorileri içermektedir. Bu nedenle, farklı nanosüspansiyon hazırlama yaklaşımlarının kararlılık üzerindeki potansiyel etkisi, hazırlama yönteminin seçilmesinde kritik bir faktördür. Genel olarak, nanosüspansiyonun morfolojisi ve stabilitesi, hazırlama yöntemi ve işlem parametrelerinden etkilenir. YBH, "Ostwald ripening" etkisi nedeniyle saklama esnasında uzunluğunu arttıran kısa, iğne şeklinde partiküllere neden olabilmektedir. Homojenizasyon basıncı, bu yöntemle hazırlanan nanosüspansiyonların sonuçtaki partikül büyüklüğünü ve kristal şeklini belirleyen ana değişkendir. Hazırlama sırasında basınç etkisiyle e.m.'de kristal dönüşümleri görülebilir. Diğer taraftan, YBH yöntemi, kimyasal olarak kararsız e.m.'lerin korunması amacıyla nanosüspansiyon formülasyonlarının geliştirilmesinde uygun alternatif bir yaklaşımdır [41,59].

E.m.'lerin, stabilizan varlığında öğütme yöntemi ile kararlı nanosüspansiyonlarının hazırlanması, oluşan yeni yüzeylerle ilişkili olarak ortaya çıkan serbest enerjinin telafi edilmesi ile ilgilidir ve bu da öğütme sırasında partikül yüzeyi ile stabilizanlar arasındaki etkileşimlere bağlıdır ve e.m. kristalinitesinin korunması, e.m. kararlılığı için önemlidir. Ancak, öğütme işlemi zaman zaman ve önemli ölçüde partiküllerin kristal yapısına zarar verebilir. Bu nedenle, öğütmede en büyük endişe amorf yapı oluşumudur. Öğütme işlemlerinde, ısı artışı hassas e.m.'lerin bozunmasına neden olabilir [41]. Aşağıdan-yukarıya yaklaşımında ise, partiküller "Ostwald ripening" etkisine daha fazla maruz kalmakta ve partikül büyüklüğü artmaktadır [41,57,60]. Kakran ve ark. [60] kuersetin nanosüspansiyonlarını YBH, bilyalı değirmende öğütme ve çöktürme yöntemlerini kullanarak hazırlamışlardır. Stabilizan olarak ise Tween 80 kullanılmıştır. PB ve ZP değerleri sırasıyla 276-694 nm ve -31.7 ile -18.3 mV aralığında saptanmıştır. Partikül büyüklüğü en düşük olarak öğütme yönteminde elde edilirken en büyük değerler ise çöktürme yönteminde elde edilmiştir. Tüm kuersetin nanosüspansiyonlarında kuersetinin kristal

şeklini koruduğu saptanmıştır. YBH ve öğütme yöntemleri ile hazırlanan kuersetin nanosüspansiyonlarının 4 ve 25 °C'de 180 gün boyunca fiziksel stabilitesini koruduğu, ancak, sıcaklığın 40 °C'ye çıkmasıyla fiziksel kararsızlık gösterdikleri saptanmıştır. Çöktürme yöntemiyle hazırlanan nanokristallerin uzun süreli olarak iyi bir fiziksel stabilite göstermediği, "Oswald ripening" etkisi, yeniden kristallenme/aglomerasyon sonucu partikül büyüklüğünün arttığı tespit edilmiştir [60]. Ayrıca, aşağıdan-yukarıya yaklaşımı, işlem sırasında çeşitli kararsız polimorflar, hidratlar ve solvatlar üreterek nanosüspansiyon formülasyonlarını olumsuz şekilde etkileyebilir. Bu yaklaşımda, organik çözücü kalıntısı formülasyonun fiziksel ve kimyasal kararsızlığına neden olabilir. Dahası, bu yaklaşımda, genellikle bir yöndeki hızlı büyümeye bağlı olarak iğne şeklinde partiküller oluşur ve bu da nanosüspansiyonların fiziksel stabilitesini etkiler [41,61].

## **2. Sonuç**

Sonuç olarak, nanosüspansiyon teknolojisi, sulu veya organik ortamda çözünürlüğü düşük etkin maddelerin doygunluk çözünürlüğünün artırılması ve düşük biyoyararlanıma sahip hidrofobik etkin maddelerin biyoyararlanım sorunlarının giderilmesi/iyileştirilmesi amacıyla kullanılan ticarileştirilebilir bir yaklaşımdır. Bilyeli öğütme ve YBH gibi yöntemler nanosüspansiyonların hazırlanması için başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Stabilizanlar, nanosüspansiyonların hazırlanmasında, stabilitesinde ve genel performansında çok önemli bir rol oynamaktadır. Nanosüspansiyonların stabilitesi açısından kullanılacak olan stabilizanın/stabilizanların tipi ve konsantrasyonu uygun şekilde seçilmelidir. Aynı zamanda, nanosüspansiyon formülasyonu geliştirilirken etkin maddenin özellikleri de (Log P, entalpi, erime noktası vb.) göz önünde bulundurulmalıdır.

## **Kaynaklar**

1. Agarwal V, Bajpai M: Nanosuspension technology for poorly soluble drugs: Recent researches, advances and patents. *Recent Patents on Nanotechnology* 2015, 9(3):178-194.
2. Yadollahi R, Vasilev K, Simovic S: Nanosuspension technologies for delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Nanomaterials* 2015, 2015. doi:10.1155/2015/216375
3. Shid RL, Dhole SN, Kulkarni N, Shid SL: Nanosuspension: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2013, 22(1):98-106
4. Patel VR, Agrawal YK: Nanosuspension: an approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 2011, 2(2):81-87.
5. Acartürk F. Süspansiyonlar. In: Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Takka S, Turnaksız F (eds), *Modern Farnasötik Teknoloji. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, Türkiye. 2009: 301-316.*
6. Sutradhar KB, Khatun S, Luna IP: Increasing possibilities of nanosuspension. *Journal of Nanotechnology* 2013, 2013. doi:10.1155/2013/346581
7. Wang L, Du J, Zhou Y, Wang Y: Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine* 2017, 13(2):455-469.

8. Banshraj B, Chaudhury S, Sharma S, Rajput G: A review on nanosuspensions in drug delivery. *International Journal of Pharma Professional's Research* 2013, 4(3):898-904.
9. Schweitzer A, Sucker H: Hydrosols-alternatives for the parenteral application of poorly water soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1994, 40(2):64-72.
10. Müller RH, Jacobs C, Kayser O: Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 47(1):3-19.
11. Kumar BS, Saraswathi R, Kumar KV, Jha SK, Venkates DP, Dhanaraj SA: Development and characterization of lecithin stabilized glibenclamide nanocrystals for enhanced solubility and drug delivery. *Drug Delivery* 2014, 21(3):173-184.
12. Müller RH, Peters K, Becker R, Kruss B: Nanosuspensions for the i.v. administration of poorly soluble drugs: stability during sterilization and long-term storage. *Proceedings of the Controlled Release Society* 1995, 22:574-575.
13. Yang L, Hong J, Di J, Guo Y, Han M, Liu M, Wang X: 10-Hydroxycamptothecin (HCPT) nanosuspensions stabilized by mPEG1000-HCPT conjugate: high stabilizing efficiency and improved antitumor efficacy. *International Journal of Nanomedicine* 2017, 12:3681-3695.
14. Sattar A, Chen D, Jiang L, Pan Y, Tao Y, Huang L, Liu Z, Xie S, Yuan Z: Preparation, characterization and pharmacokinetics of cyadox nanosuspension. *Scientific Reports* 2017, 7(1):2289. doi: 10.1038/s41598-017-02523-4.
15. Gera S, Talluri S, Rangaraj N, Sampathi S: Formulation and evaluation of naringenin nanosuspensions for bioavailability enhancement. *AAPS PharmSciTech* 2017. doi: 10.1208/s12249-017-0790-5.
16. George M, Ghosh I: Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013, 48(1-2):142-152.
17. Yao L, Zhao X, Li Q, Zu Y, Fu Y, Zu B, Meng X, Liu C: In vitro and in vivo evaluation of camptothecin nanosuspension: a novel formulation with high antitumor efficacy and low toxicity. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, 423(2):586-588.
18. Wang YC, Liu ZP, Zhang DR, Gao XH, Zhang XY, Duan CX, Jia LJ, Feng FF, Huang YJ, Shen YM, Zhang QA: Development and in vitro evaluation of deacety mycoepoxydiene nanosuspension. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2011, 83(2):189-197.
19. Chin WW, Parmentier J, Widzinski M, Tan EH, Gokhale R: A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, 103(10):2980-2999.
20. Junghanns J-UAH, Müller RH: Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine* 2008, 3(3):295-310.
21. Malamatarı M, Somavarapu S, Taylor KM, Buckton G: Solidification of nanosuspensions for the production of solid oral dosage forms and inhalable dry powders. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2016, 13(3):435-450.
22. Kavitha VB, Neethu CS, Dineshkumar B, Krishnakumar K, John A: Nanosuspension formulation: an improved drug delivery system. *Nanoscience and Nanotechnology: An International Journal* 2014, 4(1):1-5.
23. Öner L, Gürsoy RN. Nanokristaller. In: Gürsoy AZ (ed), *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul, Türkiye.* 2014: 125-133.
24. Velmula M, Pavuluri P, Rajashekar S, Rao VUM: Nanosuspension technology for poorly soluble drugs - a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015, 4(7):1612-1625.
25. Ye L, Miao M, Li S, Hao K: Nanosuspensions of a new compound, ER-β005, for enhanced oral bioavailability and improved analgesic efficacy. *International Journal of Pharmaceutics* 2017, 531(1):246-256.
26. Talekar M, Ganta S, Amiji M, Jamieson S, Kendall J, Denny WA, Garg S: Development of PIK-75 nanosuspension formulation with enhanced delivery efficiency and cytotoxicity for targeted anti-cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, 450(1-2):278-289.
27. Gao Y, Li Z, Sun M, Guo C, Yu A, Xi Y, Cui J, Lou H, Zhai G: Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension. *Drug Delivery* 2011, 18(2):131-142.
28. Pyo SM, Hespeler D, Keck CM, Müller RH: Dermal miconazole nitrate nanocrystals – formulation development, increased antifungal efficacy&skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics* 2017, 531(1): 350-359.
29. Sinico C, Pireddu R, Pini E, Valenti D, Caddeo C, Fadda AM, Lai F: Enhancing topical delivery of resveratrol through a nanosizing approach. *Planta Medica* 2017, 83(5):476-481.
30. Rabinow BE: Nanosuspensions in drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004, 3(9):785-796.
31. Shegokar R, Singh KK: Surface modified nevirapine nanosuspensions for viral reservoir targeting: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 421(2):341-352.
32. Kayser O: A new approach for targeting to *cryptosporidium parvum* using mucoadhesive nanosuspensions: research and applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 214(1-2):83-85.
33. Müller RH, Jacobs C: Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2002, 237(1-2):151-161.
34. Krause KP, Kayser O, Mäder K, Gust R, Müller RH: Heavy metal contamination of nanosuspensions produced by high-pressure homogenisation. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 196(2):169-172.
35. Itoh K, Pongpeerapat A, Tozuka Y, Oguchi T, Yamamoto K: Nanoparticle formation of poorly water-soluble drugs from ternary ground mixtures with PVP and SDS. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 2003, 51(2):171-174.
36. Kulkarni RR, Phadtare DG, Saudagar RB: A novel approach towards nanosuspension. *Asian Journal of Pharmaceutical Research* 2015, 5(4):186-194.
37. Salazar J, Müller RH, Möschwitzer JP: Combinative particle size reduction technologies for the production of drug nanocrystals. *Journal of Pharmaceutics* 2014, 2014. doi:10.1155/2014/265754.
38. Pireddu R, Sinico C, Ennas G, Marongiu F, Muzzalupo R, Lai F, Fadda AM: Novel nanosized formulations of two diclofenac acid polymorphs to improve topical bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015, 77:208-215.
39. Kanthamneni N, Valiveti S, Patel M, Xia H, Tseng Y-C: Enhanced bioavailability of danazol nanosuspensions by wet milling and high-pressure homogenization. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2016, 6(4):218-224.
40. Liu T, Müller RH, Möschwitzer JP: Systematical investigation of a combinative particle size reduction technology for production of resveratrol nanosuspensions. *AAPS PharmSciTech* 2017, 18(5):1683-1691.
41. Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D: Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2013, 172(3):1126-1141.
42. Verma S, Huey BD, Burgess DJ: A scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection. *Langmuir* 2009, 25(21):12481-12487.
43. Verma S, Kumar S, Gokhale R, Burgess DJ: Physical stability of nanosuspensions: investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 406(1-2):145-152.
44. Quan P, Shi K, Piao H, Piao H, Liang N, Xia D, Cui F: A novel surface modified nitrendipine nanocrystals with enhancement of bioavailability and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, 430(1-2):366-371.
45. Verma S. Effect of process parameters and the role of stabilizers in nanosuspension stability-Doctoral Dissertations, AAI3401983-2009.; 2017 May 14. Available from: <http://digitalcommons.uconn.edu/dissertations/AAI3401983>. [Website]



46. Hong C, Dang Y, Lin G, Yao Y, Li G, Ji G, Shen H, Xie Y: Effects of stabilizing agents on the development of myricetin nanosuspension and its characterization: an in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2014, 477(1-2):251-260.
47. Guo L, Kang L, Liu X, Lin X, Di D, Wu Y, Kong D, Deng Y, Song Y: A novel nanosuspension of andrographolide: Preparation, characterization and passive liver target evaluation in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017, 104:13-22.
48. Choi JY, Yoo JY, Kwak HS, Nam BU, Lee J: Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. *Current Applied Physics* 2005, 5(5):472-474.
49. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinsek O: Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 376(1-2):204-212.
50. Ghosh I, Schenck D, Bose S, Ruegger C: Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: Effect of Vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 47(4):718-728.
51. Ghosh I, Bose S, Vippagunta R, Harmon F: Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 409(1-2):260-268.
52. Deng J, Huang L, Liu F: Understanding the structure and stability of paclitaxel nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 390(2):242-249.
53. Aghajani M, Shahverdi AR, Rezayat SM, Amini MA, Amani A: Preparation and optimization of acetaminophen nanosuspension through nanoprecipitation using microfluidic devices: an artificial neural networks study. *Pharmaceutical Development Technology* 2013, 18(3):609-618.
54. Chen X, Matteucci ME, Lo CY, Johnston KP, Williams RO 3<sup>rd</sup>: Flocculation of polymer stabilized nanocrystal suspensions to produce redispersible powders. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2009, 35(3):283-296.
55. de Waard H, Hinrichs WL, Frijlink HW: A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: Controlled crystallization during freeze-drying. *Journal of Controlled Release* 2008, 128(2):179-183.
56. Gao L, Liu G, Wang X, Liu F, Xu Y, Ma J: Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 404(1-2):231-237.
57. Möschwitzer J, Achleitner G, Pomper H, Müller RH: Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 58(3):615-619.
58. Wang WP, Hul J, Sui H, Zhao YS, Feng J, Liu C: Glabridin nanosuspension for enhanced skin penetration: formulation optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Pharmazie* 2016, 71(5):252-257.
59. Maulidin R, Müller RH: Preparation and storage stability of rutin nanosuspensions. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 2013, 43(5):395-404.
60. Kakran M, Shegokar R, Sahoo NG, Gohla S, Li L, Müller RH: Long-term stability of quercetin nanocrystals prepared by different methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012, 64(10):1394-1402.
61. Mahesh KV, Singh SK, Gulati M: A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nanosuspensions of glipizide. *Powder Technology* 2014, 256(1):436-449.