

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE PARTÍCULAS MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN. EJEMPLO DE LA NECESIDAD DE HOMOGENEIZACIÓN Y ARMONIZACIÓN DE CRITERIOS

Sergio Almeida Prieto, José Blanco Méndez y Francisco Javier Otero Espinar

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Farmacia. Campus Universitario sur. 15782 Santiago de Compostela.

Introducción

Una de las primeras aproximaciones empleadas para caracterizar la forma y tamaño de las partículas, fue la combinación de técnicas como la tamización y su observación microscópica. Posteriormente, y como alternativa, surgieron las técnicas basadas en el análisis de imagen (AI), a través de las cuales se calculan una serie de parámetros (1) cuya finalidad es relacionar la forma y tamaño de los pelets con una serie de variables tecnológicas.

Para desarrollar un método adecuado de AI es necesario disponer de un equipo mínimo que conste de: un sistema óptico conectado a una cámara de vídeo o fotográfica encargada de enviar una parte del campo de visión a un sistema informático. El programa informático procesa y convierte la imagen en una imagen binaria a partir de la que mide y cuenta el número de píxeles que conforman el borde de la proyección de la partícula, los multiplica por un factor de escala (calibración) obteniendo así el perímetro. De igual modo también cuenta los píxeles "atrapados" dentro de ese perímetro para calcular el área. El cálculo de otro tipo de dimensiones como son los diferentes diámetros de las partículas depende del programa de AI empleado. En general existen tres modalidades de trabajo (2): a) recuento y determinación de las coordenadas de situación de los píxeles que componen la imagen binaria de la proyección de la partícula; b) trazado de cuerdas radiales que pasan por el centro de masas de la imagen de la partícula a diferentes ángulos que interceptan con su perímetro; y c) determinación de

diferentes diámetros de la partícula mientras va girando todas sus coordenadas (caliper).

A la hora de realizar la caracterización morfológica de una partícula a partir de las medidas proporcionadas por los equipos de AI, hay que tener en cuenta que ésta debe realizarse desde tres aspectos diferentes (3-4). En primer lugar debe identificarse la proyección de la partícula con la forma geométrica a la que más se asimile. En segundo lugar, el análisis morfológico debe incluir un examen de la redondez de la partícula que indique lo angulosos o suaves que son sus vértices, aristas y lados que forman los perfiles de la de la partícula. Finalmente debe definirse su textura superficial, entendiéndola como pequeñas rugosidades o irregularidades que afectan a la superficie de la partícula. En definitiva, planteando el problema desde estos tres puntos de vista, podremos hacernos una idea muy aproximada de la forma que la partícula posee realmente.

Hasta este punto, la mayoría de los autores están de acuerdo, sin embargo los problemas comienza cuando se desea seleccionar el o los parámetros encargados de definir los tres aspectos morfológicos y establecer su cálculo.

El objetivo de este trabajo es poner de manifiesto la absoluta falta de homogeneidad a la hora, no sólo de establecer los criterios de selección de los parámetros de forma, sino también de su correcta definición y determinación, sobre todo en lo referido a las dimensiones y ecuaciones empleadas para su estimación.

Resultados y Discusión

Aunque existen estudios en los que se recurre a la determinación de las dimensiones fractales (5) para identificar la textura superficial o rugosidad de las partículas, la tendencia fundamental es proponer una forma ideal y evaluar de algún modo cuanto se acerca o aleja la partícula objeto de estudio de este modelo. En el campo de la Tecnología Farmacéutica y más concretamente en granulación y peletización se recurre a la esfera como modelo, y se evalúa lo que una partícula se acerca o se aleja de ésta.

Haciendo una revisión bibliográfica sobre el tema es fácil darse cuenta de la enorme heterogeneidad en los parámetros propuestos para la evaluación morfológica de las partículas. Entre los numerosos factores de forma propuestos nos encontramos con el o los factores de Heywood (6) que clasifica la forma de las partículas en diferentes categorías o el OPCS (one plane critical stability) de Chapman y col (7) propuesto para caracterizar la esfericidad de los pellets. Otros autores (8; 3) proponen la evaluación conjunta de varios parámetros para ver lo que una partícula se acerca aleja de una esfera, o poder evaluar lo alargada que es. Estos factores son por ejemplo: pelliaps, rectang, modelx, elongacion, relación de aspecto (AR) y la circularidad.

Es precisamente con estos tres últimos donde surgen los mayores problemas a la hora de definirlos o de darles un nombre. Así, por ejemplo la circularidad ($4\pi \cdot \text{area} \cdot \text{perímetro}^{-2}$) es empleada por diferentes autores con distintos nombres –roundness, form factor, sphericity factor, shape factor, appaerance factor etc - (9-11), lista que se amplía si se incluyen aquellos que introducen pequeñas modificaciones en su cálculo – de nuevo roundness, roundness factor, sphericity index... (11-14). Para complicarlo más, muchas de estas denominaciones como roundness ó rundness factor (11, 14) ya habían sido utilizados anteriormente por otros autores para denominar cálculos diferentes, como son la roudness propuesta por Hellen y col. (8) o el roundness index empleado por Baert y col. (15). Curiosamente, estos dos últimos parámetros se basan en medidas totalmente diferentes de las partículas.

Algo similar ocurre con los factores elongación y relación de aspecto (AR). Algunos autores emplean indistintamente las dos denominaciones, o incluso se ha utilizado la denominación de roundness index (15,16) para el mismo cálculo. Por el contrario, con idéntico nombre pueden aparecer estimados a partir de diferentes dimensiones (8, 15,16,17).

Otro aspecto importante que contribuye a aumentar la confusión es que la propia estimación de las dimensiones de las partículas necesarias para calcular los factores pueden ser diferente dependiendo del autor o bien del software de AI empleado, lo que da lugar a resultados completamente diferentes.

Un ejemplo claro es lo que ocurre con el AR o la elongación. Algunos autores los definen simplemente como una relación entre el diámetro máximo y el mínimo de una partícula. En estas condiciones, en el caso de imágenes de partículas no esféricas, se obtendrán resultados diferentes si utilizamos como diámetros los máximos y mínimos de feret, o bien las distancias entre centro de la partícula y su perímetro (fig 1 a y b).

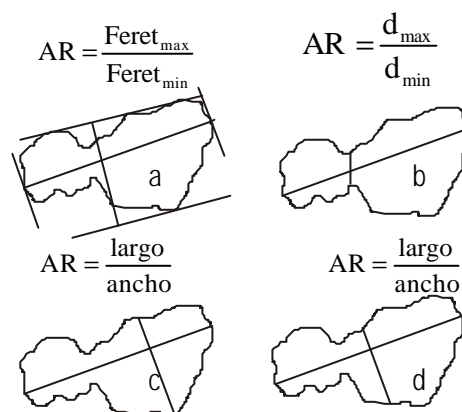






Figura 1. Influencia del modo de estimación de las dimensiones de una partícula sobre el valor de AR.

Más común es calcular el AR como una relación entre la longitud y la anchura de la partícula, lo que implica un cálculo ortogonalizado de las dimensiones y por lo tanto resultados diferentes. Sin embargo, empleando este modo de cálculo, nuevamente pueden presentarse dos tipos de estimación. Mayoritariamente la longitud se

considera la mayor distancia medida entre dos puntos del perímetro de la proyección de la partícula independientemente de su orientación, sin embargo, en el cálculo de la anchura es donde aparecen discrepancias. Dependiendo de los trabajos, la estiman como la mayor distancia entre dos puntos contenidos en la intersección de uno de los ejes perpendiculares a la longitud y perímetro (fig 1c) o bien entre la intersección de la mediatriz a la longitud y el perímetro (fig 1d). Algunos autores incluso, no indican cual es la forma utilizada en el cálculo o bien indican simplemente que la anchura se estima como un diámetro rectangular a la longitud.

Algo similar ocurre con el perímetro de las proyecciones, del que se pueden obtener valores diferentes en función de su modo de cálculo.

Tabla 2. Valores de AR obtenidos para diferentes formas geométricas para el parámetro AR en función de las dimensiones empleadas en su cálculo

forma	Relación de aspectos AR			
	F_{max}/F_{min}	d_{max}/d_{min}	Largo/ancho (modo 1)	Largo/ancho (modo 2)
	1.78	5.30	5.30	1.78
	2.24	2.24	2	2
	1.41	1.41	1.00	1.00
	1.00	1.00	1.00	1.00

Una contribución muy importante a la gran heterogeneidad de cálculos esta motivada por los propios programas de AI empleados en el análisis de la forma. Basta con echar un vistazo a las principales características de los más empleados para darnos cuenta que cada uno proporciona medidas diferentes de los objetos a estudiar, a veces con idéntica denominación para cálculos diferentes. Además hemos detectado incluso el empleo de términos erróneos para la denominación de parámetros clásicos en la evaluación del tamaño y morfología de las partículas. Todo ello contribuye a que en muchos casos no sea posible comparar los resultados obtenidos empleando diferentes sistemas de AI. Esto reviste de gran importancia ya que dificulta o imposibilita el establecimiento de los límites objetivos de los parámetros para clasificar una forma como esférica. Este hecho hay que tenerlo muy en cuenta cuando se consulta parte de la

bibliografía publicada hasta el momento ya que puede invalidar en gran medida las conclusiones en ellas establecidas. Un ejemplo podemos verlo en uno de los trabajos en los que Podczek y col (17) proponen el uso del factor de forma e . En este artículo se pone en entredicho algunos de los límites establecidos por otros autores para ciertos parámetros de forma en base a sus propias experiencias. Así por ejemplo, consideran invalido el valor de 0.88 establecido como límite de circularidad por Hellen y col (18) para sus pelets, e indican que son valores muy bajos que deberían corresponder a partículas claramente alejadas de la forma esférica. Sin embargo, si se acude a la bibliografía original (18), y observamos las microfotografías de las partículas analizadas por Hellen y col podemos ver como la proyección de la imagen de la partícula que presenta el valor de circularidad de 0.88 es muy próxima a la de un círculo. Por lo tanto, la causa de obtener valores bajos seguramente este relacionado con el modo empleado para el cálculo del perímetro, no en un mal establecimiento de los propios límites.

De manera similar, en el mismo artículo (17) se rechazan los valores de AR de 1.2 propuestos por Baert y col (15,19) y establecen como nuevo límite máximo valores de 1.1. Nuevamente, si acudimos a los artículos originales, observamos que, a parte de la diferente denominación del parámetro establecido por estos autores (E value y no AR), éstos lo calculan como una relación entre el mayor y el menor diámetro estimado manualmente sobre las fotografías de las partículas, método que difiere sensiblemente del empleado por Podczek y col (17) basado este en medidas ortogonalizadas de longitud y anchuras similares a las de la figura 1d obtenidas mediante un sistema de AI.

Por lo tanto, como principal conclusión, puede extraerse la gran necesidad de establecer criterios rigurosos a la hora de desarrollar un método de análisis morfológico de partículas basados en técnicas de AI. En concreto los aspectos más importantes a normalizar son los relacionados con:

- Redefinición y normalización de los parámetros de forma existentes, o bien

- propuesta de nuevos parámetros independientes de los sistemas de medida.
- b) Estandarización de las dimensiones proporcionadas por los programas de AI, en cuanto a modo de cálculo y definición.
- c) Estandarización de los procedimientos de medida de los factores de forma

Mientras no se las establezcan medidas oportunas en este sentido, cualquier resultado que no incluya una definición exhaustiva de la metodología utilizada, incluyendo condiciones de media, procedimientos de estimación de las dimensiones necesarias y de los factores de forma empleados, carecerá del rigor y valor suficiente, impidiendo además su utilización de forma generalizada.

Bibliografía

- Lövgren, K., Lundberg, P.J.. Determination of sphericity of pellets prepared by extrusion/spheronization and the impact of some process parameters. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, 2375.(1989)
- Barber, T.A.. Image Analysis (Automated Microscopy) for Particle analysis in *Liquid and Surface Borne Particle measurement Handbook*. Ed. by Knapp, J.Z., Barber, T.A., Lieberman, A. New York, pp 61 (1996)
- P.J. Barret. The shape of rock particles, a critical review, *Sedimentology* 27:291 (1980).
- E.T. Bowman, K. Soya, and T.W. Drummond. Particle shape characterization using Fourier analysis, *Geotechnique* 51(6):545 (2001).
- J. Vertommen, P. Rombaut, and R. Kinget.. Shape and surface smoothness of pellets made in rotary processor, *Int. J. Pharm.* 146:21 (1997).
- H. Heywood, M.I. Mech, and M.I.Chem. The evaluation of powders, *J. Pharm. Pharmacol.* 15:56T (1963).
- S.R. Chapman, R.C. Rowe, and J.M. Newton. Characterization of the sphericity of particles by the one plane critical stability, *J. Pharm. Pharmacol.* 40:503 (1988).
- M. Riksson, G. Alderborn, F. Podczek, and J.M. Newton. Comparison between and evaluation of some methods for the assesment of the sphericity of pellets, *Int. J. Phar.* 148:149 (1997).
- H.E. Exener, and E. Link. Image analysis for characterization of size and shape distribution of load powders, *Pow. metal. Int.* 9:131 (1977).
- L.S.C.Wan, W.P.W. Heng, and C.V. Liew. Spheronization conditions on spheroid shape and size, *Int. J. Pharm.* 96:59 (1993).
- P.B. Deasy, and M.F.L. Law. Use of extrusion-spheronization to develop an improved oral dosage form of indomethacin, *Int. J. Phar.* 148:201 (1997).
- R.D.Shah, M. Kabadi, D.G. Pope, and L.L. Augsburger. Physico-mechanical characterization of the extrusion-spheronization process. Part II: Rheological determinants for successful extrusion and spheronization, *Pharm. Res.* 12(4):496 (1995).
- R.M. Iyer, L.L. Augsburger, D.G. Pope, and R.D. Shah. Extrusion/spheronization-Effect of moisture content and spheronization time on pellet characteristics, *Pharm. develop. technol.* 1(4):325 (1996).
- G.A. Hileman, S.M. Upadrashta, and S.H. Neau. Drug solubility effects on predicting optimum conditions for extrusion and spheronization of pellets, *Pharm. dev. technol.* 2(1):43 (1997).
- L. Baert, H. Vermeersch, J.P. Remon, J. Smeyers-Verbeke, and D.L. Massart. Study of parameters important in the spheronization process, *Int. J. Pharm.* 96:225 (1993).
- K Lövgren, and P.J. Lundberg. Determination of sphericity of pellets prepared by extrusion/spheronization and the impact of some process parameters, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 15:2375 (1989).
- F. Podczek, S.H. Rahman, and M.J. Newton. Evaluation of a standardised procedure to assess the shape of pellets using image analysis, *Int. J. Pharm.* 19:123 (1999).
- L. Hellén, and J. Yliruusi. Process variables of instant granulator and spheroniser: III. Shape and shape distributions of pellets, *Int. J. Pharm.* 96:217 (1993).
- L. Baert, D. Fanara, J.P. Remon, and D. Massart. Correlation of extrusion forces, raw materials and sphere characterization. *J.Pharm.Pharmacol.* 44 676(1992).

Autor de contacto:

Francisco J Otero Espinar
 ffrotero@usc.es
 Dpto de Farmacia e Tec. Farmacéutica.
 Universidad de Santiago de Compostela
 Campus sur s/n
 Santiago de Compostela
 Telf.: 981 563100 ext 14878
 Fax: 981547148