

## NUEVOS PARÁMETROS PARA EVALUAR LA FORMA DE LAS PARTÍCULAS MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN II. RESOLUCIÓN DE UN CASO PRÁCTICO.

*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

La fabricación de pelets como formas multiparticulares presenta una gran importancia en Tecnología Farmacéutica debido a las evidentes ventajas tecnológicas y biofarmacéuticas. Hay dos factores que influirán sobre las ventajas de estos sistemas: forma y tamaño, por lo que la caracterización de los pelets reviste de gran importancia. Una de las primeras aproximaciones para caracterizar forma y tamaño, fue la combinación de técnicas como la tamización y la observación microscópica de las partículas. Posteriormente, y como alternativa, surgieron las técnicas de análisis de imagen, a través del cual se calculan una serie de parámetros que permiten relacionar de un modo relativamente sencillo, rápido y reproducible, la forma y tamaño de los pelets con una serie de variables tecnológicas.

El objetivo de este trabajo es la evaluación práctica de dos nuevos parámetros de forma propuestos por Almeida y col (1) y su comparación con dos de los factores morfológicos más empleados: razón de aspectos (AR) y circularidad, así como el recientemente propuesto  $e_r$  (2). Previamente se realizó una validación del método, estudiando la influencia de parámetros relacionados con la captación y procesamiento de la imagen.

### Materiales y Métodos

Los pelets fueron obtenidos a partir de distintas combinaciones de: Avicel pH 101 (FMC int.); talco (J. Escuder); almidón de trigo y de maíz; almidón de maíz modificado dextrina blanca y

dextrina A-2000, que fueron cedidos gratuitamente por Inagarbe S.L., (A Coruña).

Los pelets se obtuvieron mediante extrusión esferonización empleando una malaxadora orbital (Kenwood chef classic) y agua como líquido de humectación. La extrusión (Caleva modelo 10) se realizó a través de un tamiz de 1 mm diámetro. La esferonización (Caleva modelo 120) se llevó a cabo durante 15 min. a una velocidad de 2000 r.p.m.. El producto final se secó a 40°C hasta peso constante. Cada formulación fue repetida por triplicado.

El equipo de AI empleado consta de un estéreo microscopio Olympus SZ-CTV equipado con una cámara de vídeo JVC TK-S350 y un equipo de luz fría Hihghlight 2000 Olympus Europa. La circularidad y diámetro de feret se calcularon empleando el programa PC Image VGA 24 mientras que para el AR, circularidad,  $e_r$ ,  $V_p$  y  $V_r$ , se empleó el Sigma Scan Pro Image Análisis 5.0.0 y Microsoft® Excel 2000.

### Resultados y Discusión

#### 1.- Influencia de los procesos de captación y procesamiento de la imagen.

Un aspecto crítico, que se suele obviar en los sistemas de AI, es que hay que tener en cuenta las condiciones en las que se obtienen las imágenes que posteriormente servirán para la evaluación de forma y tamaño de las partículas. De la selección de las condiciones óptimas de luz, digitalización, o la transformación en una imagen binaria depende la sensibilidad, precisión y exactitud del método de AI.

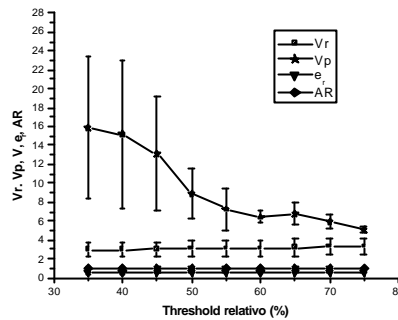
Hay dos aspectos fundamentales con respecto a

la iluminación del campo de visión donde se encuentran las partículas a ser medidas por el análisis de imagen, Por un lado nos encontramos con la disyuntiva de donde debe de estar situada la fuente de luz. Podzeck y Newton (3,4) comprobaron una iluminación superior presenta ventajas sobre la inferior, empleada tradicionalmente. El otro factor es la intensidad de iluminación que se utilice. Esto es importante ya que, si es insuficiente, existirá mucho ruido de fondo y si es excesiva, aumenta el contraste de la imagen. Con el equipo de iluminación empleado por nosotros, el estudio de la influencia de intensidad de luz mostró, que una potencia intermedia (valor 3 en una escala arbitraria) es suficiente para que los parámetros morfológicos se mantengan constantes, Otro aspecto fundamental es el establecimiento del valor umbral de la escala de grises durante la conversión binaria de la imagen digitalizada (Threshold) Una buena elección del valor del threshold es fundamental, ya que influye directamente sobre la estimación de los parámetros. La forma de elegirlo depende del programa de AI. En la figura 1 se pone de manifiesto como varían los diferentes factores de forma en función de los distintos valores de threshold relativo para una formulación con partículas de referencia relativamente esféricas. Al igual que sucede con la intensidad de la luz, hay una serie de valores en los cuales el programa no es capaz de distinguir los píxeles que forman parte del fondo de los de la partícula. Como consecuencia se interrumpe el proceso de estimación de las coordenadas del perímetro. Sin embargo, existe un intervalo óptimo en torno a valores de threshold del 50-60% donde el proceso de identificación del perímetro se produce de manera correcta y como consecuencia los parámetros de forma se mantienen constantes.

## 2- Precisión y exactitud del método

Para la estimación de la precisión del método seleccionamos aleatoriamente 20 pelets procedentes de dos lotes diferentes Se fijaron al soporte para impedir su movimiento y se determinaron los parámetros una vez al día durante tres días consecutivos. Los resultados obtenidos indican que hay una variación máxima

de un 6% entre las medidas de los parámetros realizados en diferente día.



**Figura 1:** Influencia del threshold sobre los diferentes factores de forma.

Esta variabilidad está relacionada con la posición relativa que ocupan las partículas en el campo de análisis lo que modifica el ángulo de incidencia de la fuente de iluminación sobre ellas y el balance automático de blancos que realiza la cámara de video. Este tipo de error se minimiza al aumentar el número de partículas medidas ya que la posición de las mismas en el campo de visión va a ser aleatoria.











## 3.- Caso práctico.

En primer lugar, hemos establecido los límites esperados para Vr y Vp (tabla 1) en función de las características morfológicas de las partículas sobre la base de resultados previos (1)

Las primeras diferencias encontradas con respecto a los otros parámetros de forma se refieren a la distribución que adoptan las poblaciones de pelets. Con estos dos nuevos parámetros se obtuvieron distribuciones logarítmico-normales, frente al ajuste normal de la circularidad, e, y AR. Otro aspecto importante es que tanto Vr, Vp y circularidad presentan distribuciones bimodales en dos de las formulaciones estudiadas, indicativo de la existencia de dos poblaciones de partículas con aspectos morfológicos diferenciados. Por el contrario, el ajuste unimodal de AR y e, muestra, desde el punto de vista de estos parámetros, la presencia una sola población homogénea.

Este aspecto es importante ya que indica que los dos nuevos parámetros y la circularidad son capaces de evaluar ciertos aspectos morfológicos diferenciales de las partículas que pasan inadvertidos para AR y e.

**Tabla 2.-** Intervalos de valores que adoptan los factores de forma  $V_r$  y  $V_p$  para diferentes formas geométricas basadas en las proyecciones de las partículas obtenidas durante procesos de extrusión-esferonización:

Forma	Forma del perímetro		$V_r$	$V_p$
Esfera	Circular	 AR = 1	0-2	3-5.3
Esferoide	Casi circular		$E_c < 0.45$	2-4.0
	Elíptica Ligeramente elípticas		$E_c: 0.45-0.55$	4-6
	Elipses		$E_c: 0.55-0.75$	6-13
Cilindro	Muy elíptica o elipses alargadas		$E_c 0.75-0.9$	13-22
	Cuadrada		AR = 1	9-9.8
	Cuadrada suavizada		AR = 1	5.5-9.5
	Rectangular		AR: 1-2	9.8-28
	Rectangular suavizadas		AR: 1-1.5	6-15
	Irregular Fusiformes y curvadas		AR: 1-1.5	7.5-35

El análisis de los valores encontrados, en base a los límites establecidos en la bibliografía, da lugar a conclusiones contradictorias. La circularidad, considera adecuadas todos los lotes salvo los de la F3 (tabla 2). Ésta presenta dos poblaciones, una con circularidad media de 0.85. En cuanto al AR, dependiendo de los límites propuestos en la bibliografía considera adecuadas sólo la F1 o la F1 y la F2, comportándose en este caso como la circularidad. En el extremo contrario se encuentra el  $\phi$ . Ninguna de las formulaciones elaboradas supera el valor de 0.6 establecido como límite inferior, si bien la F1 se encuentra próxima al nivel de aceptación. Este parámetro, de forma similar que los anteriores, ordena las formulaciones en función de su esfericidad como  $F1 > F2 > F3$ .

Sin embargo estos resultados son meramente orientativos que los límites citados han sido establecidos en muchos casos en condiciones totalmente diferentes, empleando otros AI o incluso determinándolos manualmente(4). Además, ninguno de estos factores de forma es capaz, de sugerir que formas son las predominantes y cuales son las causas del rechazo de los lotes.

En cuanto a los nuevos parámetros,  $V_r$  y  $V_p$ , la F1 presenta un valor medio de  $V_r$  de 3.32, que incluye estas partículas en la categoría 2, prácticamente circular, establecida en la tabla 1. El  $V_p$  con un valor de 7.09, ligeramente superior a los asignados para las formas no rugosas, muestra la existencia de cierta textura superficial. En la figura 2a se muestra una de las

imágenes, seleccionada al azar entre las empleadas en el cálculo de los parámetros de la F1, obtenida tras la digitalización y thresholding de las imágenes de los pelets captadas mediante la cámara de vídeo. Observamos que el aspecto de las proyecciones coincide básicamente con los resultados mostrados por nuestros parámetros.

La F2 presenta dos poblaciones diferenciadas. La primera, que constituye el 76-77 % del total de las partículas, presenta valores medios de  $V_r$  y  $V_p$  de 3.98 y 7.72. Nos encontramos al igual que con la F1, ante partículas prácticamente circulares con cierta rugosidad superficial. La segunda población (23-24%) dan lugar a  $V_r$  9.72 y  $V_p$  10.74. A partir del  $V_r$  podríamos asignar varias formas geométricas. Sin embargo, el valor elevado de  $V_p$  descarta los cuadrados, salvo que su textura superficial sea pronunciada. Por tanto, podría tratarse de formas rectangulares con bordes suavizados, aunque  $V_p$  sugiere la presencia de irregularidades por lo que podría tratarse de formas ligeramente fusiformes. La imagen b de la figura 2, confirma estos resultados. Se observan dos poblaciones, una con formas ligeramente elípticas y la segunda que presenta proyecciones con formas próximas a rectángulos con aristas suavizadas y ligeras curvaturas en sus lados mayores..

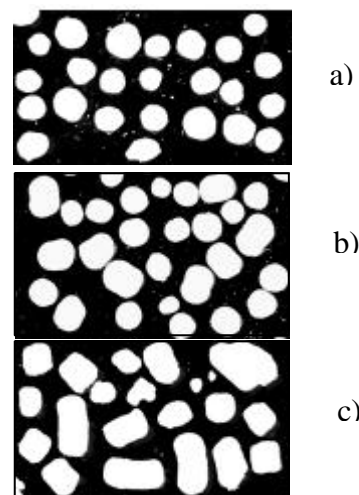
Desde un punto de vista tecnológico, la presencia de ambas poblaciones indica que el mecanismo de formación de los pelets a partir de los extrudidos es por fractura y posterior deformación de los mismos.

**Tabla 3.-** Factores de forma estimados mediante análisis de imagen para 3 formulaciones de pelets con diferente composición y forma. Los valores representan la media de tres lotes por formulación.

	Formulación											
	1				2				3			
	Población 1		Población 2		Población 1		Población 2		Población 1		Población 2	
	media±s	%	media±s	%	media±s	%	media±s	%	media±s	%	media±s	%
<b>C</b>	0.96±0.02	100	-	-	0.96±0.02	66	0.93±0.01	34	0.91±0.03	31	0.85±0.06	69
<b>AR</b>	1.10±0.00	100	-	-	1.20±0.04	100	-	-	1.32±0.05	100	-	-
<b>e<sub>r</sub></b>	0.54±0.01	100	-	-	0.44±0.05	100	-	-	0.34±0.05	100	-	-
<b>Vr</b>	3.32±0.23	100	-	-	3.98±0.91	76	9.72±3.31	24	5.72±2.43	29	12.80±5.98	71
<b>Vp</b>	7.09±0.09	100	-	-	7.72±1.03	77	10.74±1.78	23	11.44±4.64	37	19.71±10.56	63

Sin embargo la masa empleada para la fabricación de estos pelets carece de la plasticidad suficiente como para que se complete el proceso de esferonización, por lo que además de las partículas esferoides se obtienen los típicos cilindros deformados sólo en los extremos.

Finalmente, en la F3 nos encontramos nuevamente ante dos poblaciones de partículas diferentes en cuanto a forma. La primera, que constituye un 71% del total, presenta Vr de 5.72 y Vp de 11.44. por lo que esta población estará compuesta mayoritariamente por cilindros. El valor bajo de Vr sugiere que se tratan de formas poco alargadas y el elevado de Vp la presencia de una textura irregular. La segunda población posee valores elevados de ambos parámetros lo que indica la presencia de formas muy alargadas y, salvo que exista una gran rugosidad superficial, que las partículas son irregulares tipo fusiforme o cilindros curvados. Si se observan las proyecciones de las partículas en la figura 2c, comprobamos la existencia de dos poblaciones de partículas. Una de ellas constituida por formas muy alargadas y ligeramente curvadas, que se identifican con los cilindros de masa típicos obtenidos tras su extrusión y que permanecen prácticamente intactos tras la esferonización. La otra población esta constituida por partículas con una relación de aspectos menor, con forma de pequeños cilindros con los bordes suavizados y en algún caso muy irregulares. La presencia de estas dos poblaciones indica que la mezcla empleada posee unas propiedades plásticas y viscoelásticas tan deficientes que impide que todos los cilindros procedentes de la extrusión se fracturen y posteriormente se deforme durante la esferonización para dar lugar a partículas esféricas.



**Figura 5.-** Ejemplo de microfotografías obtenidas mediante el sistema de AI: a) F1; b) F2 y c) F3.

### Bibliografía

1. S. Almeida Prieto, J. Blanco Méndez y F.J Otero Espinar, Nuevos parámetros para evaluar la forma de las partículas mediante técnicas de análisis de imagen. VI Congreso SEFIG, Granada 2003
2. F. Podczeczek y M.J. Newton. A shape factor to characterize the quality of spheroids J. Pharm. Pharmacol. 46, 82 (1994).
3. F. Podczeczek, S.H. Rahman, y M.J. Newton. Evaluation of a standardised procedure to assess the shape of pellets using image analysis Int. J Pharm. 19,123 (1999).
4. S. Almeida Prieto, J. Blanco Méndez y F.J Otero Espinar, Evaluación morfológica de partículas mediante análisis de imagen. Ejemplo de la necesidad de homogeneización y armonización de criterios VI Congreso SEFIG, Granada 2003

*Autor de contacto:*

Francisco: J Otero Espinar. e-mail ffrotero@usc.es  
Dpto de Farmacia e Tec. Farmacéutica. Universidade de Santiago de Compostela  
Telf.: 981 563100 ext 14878. Fax: 981547148