

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Desenvolvimento e validação de métodos de análise de distribuição
de tamanho de partícula e sua importância na Indústria Farmacêutica.**

Mariana Ribeiro Gubitoso

São Paulo
2022

Mariana Ribeiro Gubitoso

**Desenvolvimento e validação de métodos de análise de distribuição
de tamanho de partícula e sua importância na Indústria Farmacêutica.**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Gabriel Lima Barros de Araujo

São Paulo

2022

RESUMO

GUBITOSO, M. R. **Desenvolvimento e validação de métodos de análise de distribuição de tamanho de partícula e sua importância na Indústria Farmacêutica.** 2022. 26 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Tamanho de partícula, Indústria farmacêutica, Solubilidade, Granulometria, Validação.

As formulações farmacêuticas se apresentam em diversas formas, entre elas as sólidas, semissólidas e líquidas. Nessas diversas formulações podem ser encontradas partículas sólidas que correspondem não só ao princípio ativo, mas também aos excipientes. As características dessas partículas podem interferir em muitos aspectos, desde os relacionados à produção, até os que afetam a eficácia do produto. Uma dessas características é o tamanho de partícula, que corresponde a um aspecto físico do material e que pode ser avaliado e modificado trazendo vantagens ou desvantagens. Considerando a importância do controle de tamanho de partículas na indústria farmacêutica, este trabalho teve como intuito revisar e apresentar as técnicas disponíveis e mais utilizadas para tal, além de abordar com maior profundidade o processo de validação de método de análise de tamanho de partícula por difração a laser, à luz das normas técnicas e legislações vigentes. As informações apresentadas no projeto tiveram como base artigos científicos, trabalhos acadêmicos, livros, normas técnicas e legislações. A busca foi feita através de palavras chaves (Tamanho de partícula; Indústria farmacêutica; Solubilidade; Granulometria; Validação) em bases de dados tais como Scientific Electronic Library Online (SciELO), Science Direct, PubMed. Através da revisão foi possível observar a variedade de técnicas existentes e como os princípios e tratamento de dados por trás de uma análise podem influenciar os resultados, sendo necessário conhecer os conceitos envolvidos para que não ocorra uma interpretação errada. Cada técnica possui suas particularidades e a escolha de qual utilizar envolve a avaliação de alguns parâmetros, tais como flexibilidade, faixa de trabalho, tempo de análise, entre outros. A análise por difração a laser apresenta

algumas vantagens nesse aspecto, sendo capaz de avaliar partículas de 0,1 μm a 3mm tanto por via seca quanto por via úmida. Com auxílio de outras técnicas, como microscopia ótica, e um desenvolvimento adequado, pode-se obter uma validação bem sucedida garantindo resultados robustos, precisos e exatos. No entanto, apesar da grande variedade de técnicas disponíveis, ainda há muito a ser desenvolvido principalmente no que diz respeito às partículas não esféricas onde resultados aproximados podem variar muito de acordo com a metodologia utilizada.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonization
USP	Farmacopeia Americana
EP	Farmacopeia Europeia
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MO	Microscopia Ótica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
2	OBJETIVO.....	6
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4	RESULTADOS	7
4.1	Quando a análise de Tamanho de Partícula se faz necessária?	7
4.2	Considerações gerais sobre análise de tamanho de partícula.....	9
4.3	Técnicas	12
4.3.1	Tamisação	12
4.3.2	Microscopia	13
4.3.3	Contador eletrônico de partículas (Coulter Counter)	14
4.3.4	Espalhamento de luz dinâmico.....	15
4.3.5	Difração a laser	16
4.4	Desenvolvimento de método	17
4.5	Validação	20
5	DISCUSSÃO.....	21
6	CONCLUSÃO(ÓES).....	22
	REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

No processo de desenvolvimento da formulação de um medicamento, a matéria-prima utilizada exerce grande influência não só na forma como este medicamento será produzido, mas também nas propriedades físico-químicas do produto final. Diversas formulações como as sólidas, semissólidas e líquidas apresentam materiais particulados em sua composição sejam eles o princípio ativo ou os excipientes (SHEKUNOV et al., 2007; BONIATTI, 2013). Em especial, no caso de formulações sólidas orais, as propriedades das partículas dos insumos farmacêuticos ativos (IFA) de baixa solubilidade requerem especial atenção, pois representam um grande ponto de atenção no desenvolvimento de novas formulações (BONIATTI, 2013).

A baixa solubilidade de um fármaco pode resultar em uma difícil absorção e, consequentemente, a biodisponibilidade é prejudicada comprometendo a eficácia do medicamento. Uma das maneiras de driblar este problema é através da redução do tamanho de partícula proporcionando um aumento da superfície de contato e, portanto, permitindo uma melhor dissolução (BONIATTI, 2013). No entanto, apesar de uma possível melhora no quesito solubilidade, esta redução pode afetar outros aspectos tanto de maneira positiva quanto negativa. Algumas desvantagens que eventualmente podem decorrer deste processo são variações no fluxo de pós, formação de aglomerados, aumento do risco de degradação do material em questão, entre outros (LIMA, 2001; LAMEIRAS, 2019).

Considerando a influência que o tamanho de partícula tem sobre o desenvolvimento, estabilidade, segurança e eficácia do produto, este deve ser rigorosamente controlado (MANSO, 2013). Além disso, o tamanho de partícula, por não ser uma característica intrínseca do material, pode variar de acordo com o fabricante (LIMA, 2001). O controle, então, deve ser feito não só durante o desenvolvimento de uma nova formulação, mas também durante toda a sua produção. Por este motivo, definir os métodos mais adequados para tal, é algo de extrema importância na rotina das indústrias farmacêuticas.

Atualmente há diversas técnicas disponíveis para avaliar o tamanho de partícula como análises por microscopia, espalhamento de luz, tamisação, e muitas outras. Cada técnica possui suas particularidades, algumas exigem quantidades

maiores de amostra, algumas apresentam uma maior precisão, enquanto outras são mais práticas e rápidas de serem feitas. A combinação de duas ou mais técnicas, como espalhamento de luz laser (frequentemente referenciada como “difração a laser”) com auxílio da microscopia, também é muito utilizada (GAMBOA et al., 2016). O método deve ser desenvolvido levando em consideração qual a técnica disponível e qual produto será avaliado (MAHESHWARI et al., 2018).

Com um desenvolvimento de método apropriado pode-se prosseguir para a etapa de validação. A validação visa verificar fatores como precisão, exatidão, reproducibilidade e outras fontes de erro a fim de garantir que uma análise feita por diversos analistas, em diferentes equipamentos e condições, gere um mesmo resultado e que este seja condizente com o valor real (SHEKUNOV et al., 2007). Os modelos a serem seguidos para validação de processos analíticos são disponibilizado em farmacopeias, guias e normas. No que se refere a análise de tamanho de partícula e ainda mais especificamente, tamanho de partícula por difração a laser, há disponível a ISO 13320. Com auxílio de documentos como estes e um desenvolvimento de método adequado, pode-se obter um método validado com precisão e robustez (BONIATTI, 2013).

2 OBJETIVO

Considerando a importância do controle de tamanho de partículas na indústria farmacêutica, este trabalho visa revisar e apresentar as abordagens e técnicas disponíveis para tal atualmente utilizadas na indústria farmacêutica, além de abordar com maior profundidade o processo de validação de método de análise de tamanho de partícula por difração a laser, à luz das normas técnicas e legislações vigentes.

Espera-se com este projeto, obter um panorama atual dos métodos disponíveis mais utilizados para avaliação do tamanho de partículas na indústria farmacêutica. Em particular, será feita uma análise crítica sobre validação de método utilizando a técnica de difração a laser, levando em consideração as legislações vigentes e a importância que este tipo de análise tem na indústria.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As informações apresentadas no projeto tiveram como base artigos científicos, trabalhos acadêmicos, livros, normas técnicas e legislações. A busca foi

feita através de palavras chaves (Tamanho de partícula; Indústria farmacêutica; Solubilidade; Granulometria; Validação) em bases de dados tais como Scientific Electronic Library Online (SciELO), Science Direct, PubMed e Google Scholar. As informações também foram obtidas de farmacopeias como a brasileira e a europeia e normas como a ISO 13320 e o ICH Q2R1. O período estabelecido para inclusão foi de 1990 em diante.

4 RESULTADOS

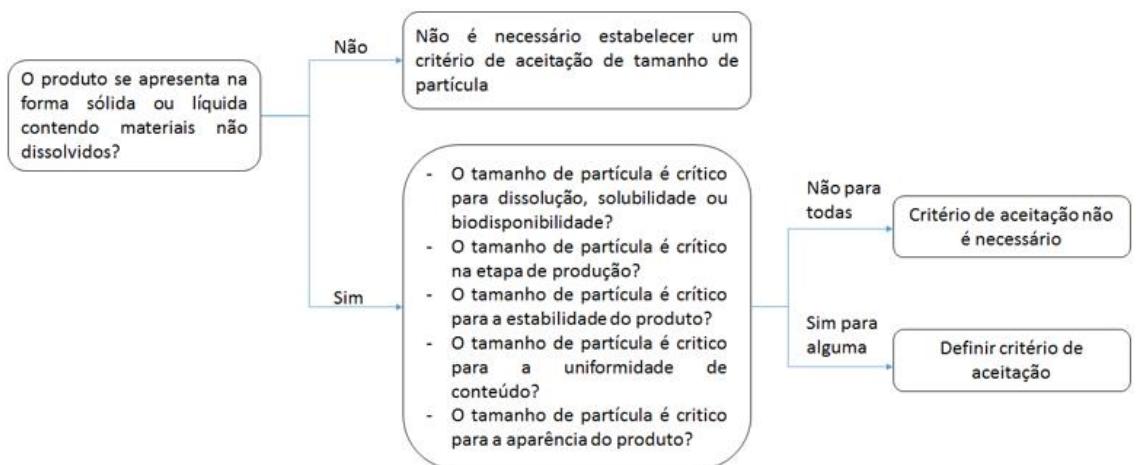
4.1 Quando a análise de Tamanho de Partícula se faz necessária?

Durante o processo de desenvolvimento e produção de uma formulação diversas características, tanto biológicas quanto físico-químicas, das matérias-primas exercem influência. Estas características devem ser avaliadas para que a biodisponibilidade ideal seja atingida permitindo o efeito terapêutico desejado. No caso de formulações farmacêuticas que apresentam em sua composição materiais particulados, como as formas sólidas (comprimidos e cápsulas), as formas semissólidas, como cremes e pomadas, e até mesmo nas formas líquidas como é o caso das suspensões, fatores como solubilidade, forma cristalina, tamanho de partículas, estrutura molecular e grau de ionização, características de difusão e dissolução e higroscopidade do princípio ativo irão influenciar sua biodisponibilidade (MAHESHWARI et al., 2018; SHEKUNOV et al., 2007). A solubilidade do fármaco é um dos fatores mais influentes na biodisponibilidade. Atualmente cerca de 40% dos novos fármacos apresentam problemas de biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água. Isso ocorre pois para que o fármaco seja absorvido ele tem que primeiramente ser dissolvido (FANGUEIRO et al., 2012).

No caso de fármacos classificados como II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade, um fator que ganha especial atenção é o tamanho de partícula. Com a redução do tamanho de partícula obtém-se uma maior área superficial de contato com o meio de dissolução aumentando então a velocidade deste processo permitindo que o fármaco seja mais rapidamente dissolvido e então absorvido (BONIATTI, 2013).

Além de influenciar diretamente na velocidade de dissolução do fármaco, o tamanho de partícula é um parâmetro de processo crítico na pré-formulação e produção de medicamentos, podendo influenciar em diversas etapas como mistura, granulação, compressão, revestimento, uniformidade de conteúdo, taxa de liberação do fármaco da formulação, estabilidade físico química das formulações, fluxo e segregação de pós. Pode também interferir nas características reológicas de formulações líquidas e semi-sólidas e em aspectos sensoriais como dureza de partículas sólidas em comprimidos mastigáveis, pomadas dérmicas, cremes e possível irritabilidade no caso de preparações oftálmicas (SHEKUNOV et al., 2007). Portanto, ao se alterar o tamanho de partícula para obter um aumento de solubilidade, deve-se levar em conta que outros aspectos também serão afetados, para melhor ou pior, sendo necessário encontrar um equilíbrio, uma redução adequada de tamanho que não afete os processos de produção de maneira negativa. Em alguns casos a redução de tamanho exacerbada pode, por exemplo, propiciar a formação de agregados de partícula comprometendo os possíveis benefícios que seriam obtidos através de uma redução adequada (LIMA, 2001). Portanto, para cada caso deve-se avaliar a necessidade ou não de alteração do tamanho de partículas e definir a especificação aceitável que trará benefícios. A ICH Q6A fornece uma árvore de decisão sobre quando o tamanho de partícula deve ser controlado.

Figura 1 - Necessidade ou não de critério de aceitação de tamanho de partículas.



Fonte: Adaptado de ICH Q6A, 1999.

Vale-se ressalta que avaliar e alterar, se necessário, o tamanho de partícula da matéria prima não é algo que deve ser feito apenas na etapa de desenvolvimento

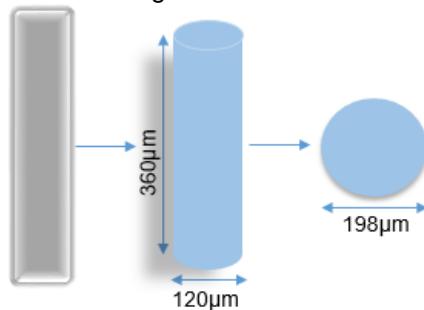
de um novo medicamento. Esta característica deve ser controlada sempre que o medicamento for produzido utilizando novas matérias primas já que diferentes fabricantes podem fornecer materiais com características variáveis, que se não forem controlados, podem gerar um impacto inesperado no produto final (SILVA, 2013).

4.2 Considerações gerais sobre análise de tamanho de partícula

Avaliar o tamanho de partícula de uma amostra não é tão simples e direto como pode parecer. Quando se tratam de partículas esféricas a medição de apenas um parâmetro como o diâmetro, por exemplo, fornece informação suficiente sobre seu tamanho. Porém, quando se trata de partículas não esféricas a medição simples do diâmetro já não é mais suficiente. Com exceção da análise por microscopia, as outras técnicas não são capazes de medir o tamanho diretamente, fornecendo resultados influenciados pelo tipo de instrumento e tratamento de dados (MAHESHWARI et al., 2018; SHEKUNOV et al., 2007).

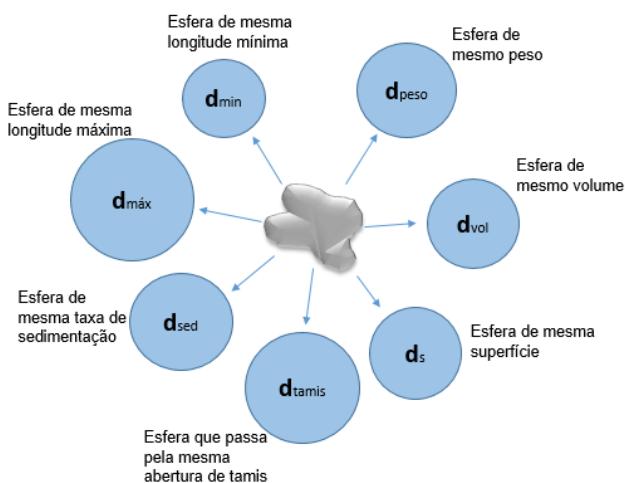
Considerando esta limitação que acomete a maior parte das técnicas, utilize-se o conceito do diâmetro equivalente de partícula que pode ser calculado através de parâmetros como comprimento, volume, massa, área projetada, velocidade de sedimentação, entre outros. O diâmetro por volume equivalente, por exemplo, representa o diâmetro de uma partícula esférica com volume semelhante à da partícula não esférica que está sendo avaliada. Portanto, a partir do volume da partícula estima-se o diâmetro de uma esfera com mesmo volume como mostra a Figura 2 (PAPINI, 2003; SHEKUNOV et al., 2007). Dependendo do parâmetro selecionado para avaliar o tamanho de partícula, diferentes resultados podem ser obtidos, como exemplifica a Figura 3 (PAPINI, 2003). Por este motivo é importante que ao comparar diferentes amostras se utilize a mesma técnica para que uma mesma propriedade de partícula seja avaliada gerando resultados comparáveis.

Figura 2 - Representação de uma esfera de volume equivalente de uma partícula na forma de agulha.



Fonte: Adaptado de MALVERN, 2015

Figura 3 - Representação dos diferentes diâmetros por esfera equivalente que podem ser obtidos a partir de uma mesma partícula irregular



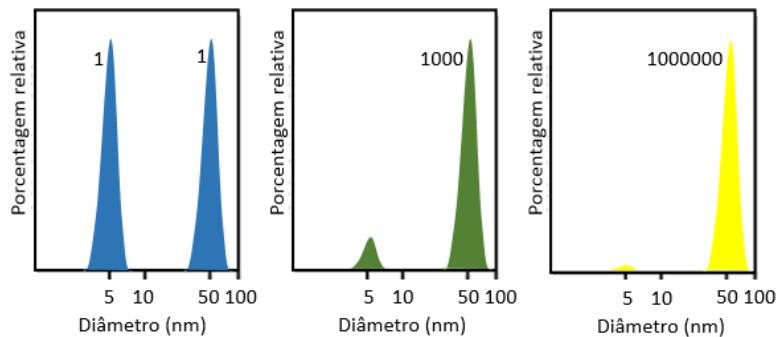
Fonte: Adaptado de BONIATTI, 2013

Para que o resultado de uma análise de tamanho de partículas seja representativo, apenas um valor como diâmetro médio não é suficiente (MAHESHWARI et al., 2018; PAPINI, 2003). Um resultado fornecendo apenas um diâmetro médio pode ser o mesmo para uma amostra monodispersa, em que a maioria das partículas apresentam tamanhos pouco variáveis por volta de 100 micrometros, por exemplo, e uma amostra polidispersa com populações distintas variando de 50 a 150 micrômetros. Por este motivo utiliza-se um valor central e mais um ou dois valores para representar a distribuição, normalmente através de gráficos de distribuição de frequência acumulada ou incremental (BONIATTI, 2013). Os dados estatísticos mais comumente utilizados para facilitar a interpretação do perfil de distribuição costumam ser a média, a moda e a mediana onde a média apresenta o tamanho médio da amostra, a moda o tamanho que mais aparece na amostra e a

mediana o tamanho em que 50% da população está acima ou abaixo (MALVERN, 2015).

Os resultados podem ser obtidos a partir de diferentes parâmetros de distribuição como número de partículas, volume, intensidade, entre outros, sendo volume a mais comumente utilizada (BONIATTI, 2013; CHRISTOFOLETTI; MORENO, 2017). Quando o parâmetro de distribuição selecionado é o número, cada partícula terá a mesma importância independente de seu tamanho, já que neste caso, o que importa é a quantidade e não o tamanho. Por outro lado, quando o parâmetro é volume, partículas com volumes maiores terão maior importância no gráfico de distribuição, assim como para o parâmetro de intensidade. Os resultados obtidos podem variar bastante de acordo com o parâmetro selecionado, como mostra a Figura 4. Por isso ao se comparar diferentes amostras é importante que o parâmetro de distribuição utilizado para obtenção do resultado seja o mesmo.

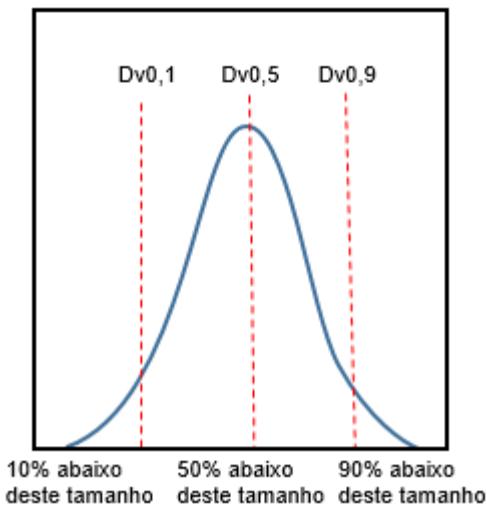
Figura 4 - Distribuições de tamanho de partícula por número, volume e intensidade de uma mesma amostra.



Fonte: Adaptado de MALVERN, 2015

Os resultados de uma distribuição normalmente apresentam quantos por cento da amostra está abaixo de determinados tamanhos de partícula. Os percentis que costumam ser usados são 10, 50 e 90% representados por Dv10, Dv50 e Dv90, respectivamente, onde o “D” indica que o parâmetro avaliado é o diâmetro e “v” indica que o parâmetro de distribuição é o volume (BONIATTI, 2013).

Figura 5 - Percentis mais utilizados nas distribuições granulométricas.



Fonte: Adaptado de BONIATTI, 2013

4.3 Técnicas

Diversas técnicas estão disponíveis para análise de tamanho de partículas, cada uma com suas particularidades. Os resultados fornecidos por cada uma variam de acordo com os princípios da técnica e até mesmo de acordo com o equipamento, por isso a escolha, não só da técnica mas também do equipamento deve ser feita levando em consideração fatores como quantidade de amostra necessária para análise, tempo de análise, parâmetro da partícula a ser avaliado, parâmetro de distribuição, sensibilidade, entre outros.

4.3.1 Tamisação

Considerada uma técnica simples e de baixo custo, a análise por tamisação é uma das mais utilizadas. Ela é utilizada para amostras com tamanhos de partícula entre $20\mu\text{m}$ e 125mm (LIMA, 2001). A análise é feita através do uso de tamises, malhas de arame com aberturas de diâmetro conhecido, colocados uns sobre os outros com o tamis de maior abertura no topo, onde a amostra é adicionada. O conjunto, normalmente de 6 a 8 tamises, é colocado sob vibração. De acordo com o tamanho, as partículas menores vão passando pela malha enquanto as maiores vão ficando retidas. Após o término deste processo, as partículas retidas em cada nível são pesadas para estimar a distribuição granulométrica da amostra (BONIATTI, 2013; MANSO, 2013; LIMA, 2001). Apesar de ser baseada em conceitos simples e ter seus resultados provenientes exclusivamente do tamanho da partícula, a tamisação pode gerar resultados com certo desvio. Algumas partículas, como as

agulhas ou cilíndricas, que são alongadas porém finas, dependendo da posição que se encontram, podem acabar passando pelas aberturas dos tamises após serem submetidas a vibração alterando o resultado da distribuição. Além disso esta técnica é considerada longa quando comparada com outras, utiliza grandes quantidades de amostra, apresenta baixa sensibilidade e não é adequada para amostras que se aglomeraram facilmente ou muito eletrostáticas (BONIATTI, 2013).

4.3.2 Microscopia

A microscopia, muito utilizada quando combinada com outras técnicas, é uma técnica de medida direta. Através dela pode-se observar não só o tamanho mas também a morfologia e a textura das partículas, algo que as outras técnicas não permitem (BONIATTI, 2013).

As técnicas de microscopia apresentam algumas limitações gerais como dificuldade na obtenção de imagens que sejam representativas já que baixas quantidades de amostra são utilizadas, em amostragens com faixa de tamanho muito variada, as partículas maiores acabam sobressaindo, a existência de aglomerados pode gerar interpretações erradas e amostras que não se apresentam no estado sólido dificultam a avaliação (SHEKUNOV et al., 2007).

As técnicas de microscopia podem ser divididas entre microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (MAHESHWARI et al., 2018).

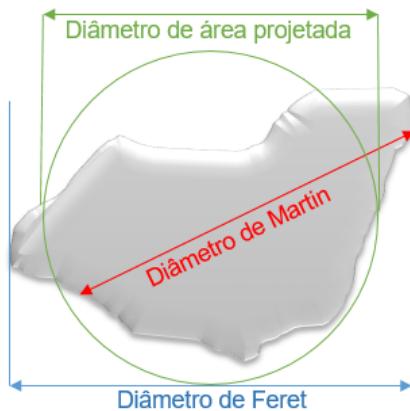
A microscopia ótica é utilizada para medição de partículas que variam de 0,25 μm a 100 μm . Nesta técnica as partículas são medidas individualmente através da incidência de um feixe de luz sobre a amostra que pode ser transmitido ou refletido (MAHESHWARI et al., 2018). Por meio de lentes ópticas se obtém a imagem ampliada e bidimensional com um aumento máximo por volta de 2000 vezes.

Como discutido anteriormente, no caso de partículas esféricas, o tamanho é definido pelo diâmetro observado. Já para partículas não esféricas aplica-se o conceito do diâmetro equivalente de partícula.

Na microscopia ótica a orientação das partículas dispostas sobre a lâmina interfere nas imagens bidimensionais que o microscópio fornece. Partículas com orientação estável tendem a ficar dispostas de maneira que suas maiores dimensões sejam apresentadas, sobressaindo em relação as dimensões menores. Já no caso de partículas irregulares, devido ao grande número de dimensões lineares que

podem apresentar, as dimensões observadas variam muito de acordo com a orientação da partícula. Nestes casos, os diâmetros observados são chamados de estatísticos e só são aceitos quando a distribuição em uma determinada orientação é a mesma quando medida em outra orientação. Na microscopia ótica os diâmetros equivalentes mais utilizados são o diâmetro de Feret, distância máxima entre duas paralelas que tangenciam a partícula em uma direção determinada, diâmetro de Martin, comprimento da linha que bissecciona a partícula em duas metades de mesma área, e diâmetro de área projetada, diâmetro de um círculo com mesma área observada da partícula, como mostra a Figura 6 (PAPINI, 2003; ALLEN, 2020).

Figura 6 - Diâmetros equivalentes mais utilizados nas análises por microscopia.



Fonte: Adaptado de DIAS, 2014.

Já nas microscopias eletrônicas, a amostra é irradiada por um feixe de elétrons fornecendo uma imagem com maior resolução e ampliação. A MET apresenta maior resolução dentre as três permitindo a análise de partículas de 2 nm a 1 μm . A MEV, apesar de não possuir resolução tão alta, podendo medir partículas de 20nm a 1mm, apresenta grande profundidade de foco fornecendo imagens tridimensionais (RAMOS, 2013; PAPINI, 2003). Entretanto, as microscopias eletrônicas são técnicas mais caras e exigem maior treinamento do operador (MAHESHWARI et al., 2018).

4.3.3 Contador eletrônico de partículas (Coulter Counter)

O método Coulter Counter é também muito utilizado para medição de tamanho de partícula e é considerado atualmente o método mais rápido e preciso sendo capaz de medir 4000 partículas por segundo. Ele pode ser utilizado para medição de partículas que vão de 0,1 a 1000 μm (MAHESHWARI et al., 2018).

Nesta técnica as partículas são dispersas em uma solução, em que não sejam solúveis, contendo eletrólitos. A solução é submetida à uma agitação para desfazer possíveis aglomerados, caso necessário pode-se adicionar dispersantes para ajudar a desagregação de partículas. A solução contendo as partículas fica dentro de um reservatório ao qual é adicionado um pequeno tubo contendo um orifício. A presença de eletrodos de platina na parte interna e externa do tubo geram uma corrente elétrica que atravessa o orifício. Devido ao diferencial de pressão entre o interior e exterior do tubo, as partículas adentram o tubo pela abertura perturbando a corrente elétrica devido à alteração que provocam na resistência entre os eletrodos. Esta alteração é proporcional ao volume da partícula (conceito do diâmetro esférico equivalente por volume, d_v). A solução deve ser bem diluída para que não mais de uma partícula atravesse o orifício simultaneamente. Quando este tipo de problema ocorre, o diâmetro de esfera equivalente acaba sendo calculado baseando-se no volume de duas partículas como se fossem uma. O tamanho do orifício pode ser alterado para atender diferentes faixas de tamanho de partículas para que não ocorra problemas como o bloqueio do orifício por partículas demasiadamente grandes (AULTON, 2018).

Apesar de considerado excelente, o contador eletrônico de partículas é um método caro e que exige calibração. Além disso apresenta algumas limitações quando as partículas a serem analisadas são altamente hidrofóbicas, altamente solúveis em água, porosas e com formatos alongados como agulhas e placas.

4.3.4 Espalhamento de luz dinâmico

Conhecido também como espalhamento de luz quase-elástico é um método muito utilizado para análise de partículas na faixa nanométrica (de 0,001 a 1 μm) como proteínas, polímeros, carreadores de fármacos, entre outras (AULTON, 2018; SHEKUNOV et al., 2007).

A técnica consiste na incidência de um feixe de luz monocromático sobre um meio contendo partículas suspensas que geram uma taxa de variação da intensidade de luz espalhada sob determinado ângulo em função do tempo e da quantidade de amostra (MALVERN, 2015).

A maioria dos equipamentos utilizam laser néon de Hélio para emissão do feixe de luz. As partículas suspensas sofrem movimento browniano, resultante da colisão entre elas e as moléculas do fluido, gerando flutuações na intensidade da luz

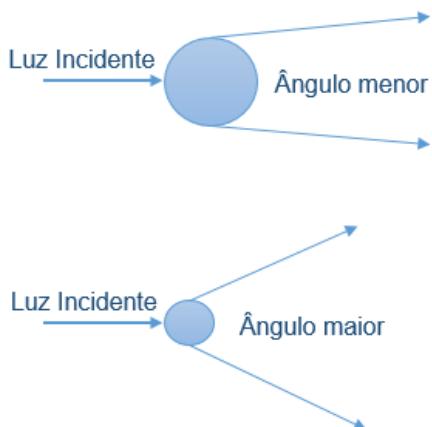
espalhada que variam de acordo com o tamanho da partícula. Partículas menores sofrem maior impacto das moléculas do fluído se movendo então mais rapidamente. O movimento browniano é aleatório e independe de variações externas. A viscosidade e temperatura do fluido podem alterar a velocidade de movimentação das partículas mas a amplitude dos movimentos se mantém (AULTON, 2018; MALVERN, 2015). O espalhamento de luz dinâmico fornece como resultado o diâmetro hidrodinâmico já que esta técnica avalia a forma como a partícula se movimenta em um fluido (AULTON, 2018).

4.3.5 Difração a laser

A técnica por difração a laser é a mais utilizada para análises de partículas que vão de $0,1\mu\text{m}$ a 3mm . (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2019) É considerada uma técnica rápida e confiável com alta resolução, reproducibilidade e precisão (GONZAGA et al., 2021). Uma grande quantidade de partículas são medidas em cada análise gerando resultados representativos. Esta técnica exige pouca calibração, sendo facilmente verificada (MAHESHWARI et al., 2018; MALVERN, 2015).

O equipamento é constituído por um laser neon de Hélio que emite um feixe de luz monocromático que ilumina a célula contendo as partículas. As partículas podem ser analisadas dispersas em um fluido (líquido dispersante) sob constante agitação para que a suspensão se mantenha homogênea ou na forma de pó suspensas no ar. As partículas difratam a luz incidida e o sistema de detectores do equipamento medem a intensidade e ângulo da luz espalhada. O ângulo de difração é inversamente proporcional ao tamanho das partículas.

Figura 7 - Espalhamento de luz gerado por partículas de diferentes tamanhos



Fonte: Adaptado de MALVERN, 2015

Para obtenção da curva de distribuição de tamanho de partículas modelos ópticos são utilizados baseando-se principalmente em duas teorias: Mie e Fraunhofer (CHRISTOFOLETTI; MORENO, 2017). A teoria de Mie determina o tamanho de partícula através do diâmetro esférico equivalente por volume. Esta teoria demanda o conhecimento de algumas propriedades ópticas, como índice de refração e componente imaginário, da amostra que está sendo analisada e do líquido dispersante. A teoria de Mie gera resultados mais próximos da realidade e pode ser utilizada para medir uma ampla faixa de tamanho de partículas (LING; KASSIM; KARIM, 2012). A teoria de Fraunhofer, por outro lado, não leva em consideração propriedades do material analisado, fornecendo então resultados aproximados (GONZAGA et al., 2021). Partículas muito pequenas, menores que 50 μm , planas ou transparentes são uma limitação para esta teoria gerando resultados com maior erro (MALVERN, 2015).

4.4 Desenvolvimento de método

Diversas organizações como FDA, ICH, ISO e as farmacopeias fornecem informações como características técnicas e princípios teóricos dos métodos disponíveis para análise de tamanho de partículas. Os métodos apresentados variam entre uma farmacopeia e outra. Na farmacopeia brasileira a técnica descrita é a tamisação, já na americana outras técnicas como difração a laser e microscopia ótica também são descritas. Entretanto, isso não impede que os métodos que não estão listados em determinada farmacopeia sejam utilizados, contanto que o uso de uma técnica diferente seja justificado e que resultados apresentados sejam consistentes (SHEKUNOV et al., 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O desenvolvimento de uma metodologia de análise adequada contribui para a obtenção de resultados confiáveis, robustos e precisos. Na técnica por difração a laser, método mais utilizado, alguns aspectos devem ser analisados como:(ISO 13320, 2020)

- **Amostragem:** A obtenção de uma amostra que seja representativa é essencial para que os resultados obtidos estejam de acordo com as características reais do material. Quando o produto está bem homogêneo as amostragens em diferentes pontos serão semelhantes. Porém,

devido as características de alguns pós como presença de partículas com tamanhos muito variados, pode ocorrer a segregação da amostra, neste caso a amostragem feita em um certo ponto pode ser completamente diferente em outro ponto. Partículas maiores, e mais pesadas, tendem a ir para o fundo deixando as partículas menores na parte superior. Neste caso uma amostragem feita na parte superior apresentaria uma maior proporção de partículas pequenas, e uma amostragem na parte inferior teria maior proporção de partículas maiores, portanto os resultados obtidos pela análise de cada uma das amostras seriam completamente diferentes. Para evitar este tipo de problema é essencial que o material esteja bem misturado e que a amostragem seja feita em diferentes pontos e momentos já que mesmo com uma mistura adequada ainda pode haver algumas diferenças entre as porções (AULTON, 2018; USP 40, 1999).

- **Análises complementares:** após a realização da amostragem, a amostra pode ser avaliada por técnicas como a microscopia ótica que pode fornecer informações como faixa de tamanho estimada, morfologia e presença de aglomerados. Estas informações auxiliam a definir o meio de dispersão e modo de preparo da amostra. Partículas muito pequenas (menores que 20µm) tendem a apresentar maiores forças superficiais de coesão e portanto acabam se aderindo e formando os aglomerados. Se este fenômeno não é identificado previamente, durante a análise por difração a laser os aglomerados podem ser lidos e interpretados como partículas primárias (menor divisão) gerando resultados não condizentes com a realidade. Porém se a presença de aglomerados é detectada, a interpretação dos resultados deve levar em conta que o que está sendo medido são os aglomerados e não as partículas primárias ou então o preparo e meio de dispersão da amostra devem ser feitos de maneira que ocorra a desagregação para que as partículas sejam lidas individualmente (SHEKUNOV et al., 2007; BONIATTI, 2013).

- **Meio de dispersão:** a amostra pode ser analisada em via úmida ou via seca (normalmente ar) (MALVERN, 2015). A escolha do meio leva em conta fatores como, tamanho estimado, quantidade de amostra disponível, solubilidade de amostra, meios de dispersão líquidos disponíveis e objetivo da análise (leitura de partículas primárias ou de aglomerados). A via seca é mais

indicada para partículas maiores, acima de 50µm, e que apresentem um bom fluxo. O uso de energia eletrostática ou sistema a vácuo auxiliam a dispersão das partículas no ar. O meio dispersante na via seca deve ser um gás comprimido com ausência de óleos, agua ou partículas (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2019). Em meio líquido, as partículas são suspensas em um dispersante capaz de reduzir a atração entre elas permitindo que sejam lidas individualmente. O meio líquido escolhido não pode solubilizar a amostra, se isso ocorrer deve-se utilizar uma solução saturada e filtrada para não alterar os tamanhos de partícula, e deve ser capaz de formar uma suspensão estável. Além disso, deve ser compatível com os materiais do equipamento, deve apresentar ausência de bolhas de ar ou partículas e índice de refração diferente do índice do material em análise (COSTA et al., 2015; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2019). O uso de dispersantes e surfactantes apropriados pode auxiliar na dispersão do pó (PAPINI; NETO, 2006). A via úmida apresenta algumas vantagens como menor risco de toxicidade já que neste método a amostra não fica na forma de pó livre e portanto não se espalha pelo ar com tanta facilidade além disso, há um menor risco de alteração das características da amostra como quebra das partículas, algo que pode ocorrer na via seca devido à pressão do ar (MALVERN, 2015). No entanto a via úmida exige uma maior investigação das condições de preparo da amostra diferentemente da via seca em que um preparo prévio não é necessário, sendo o pó lido na sua forma natural. A quantidade de amostra utilizada em uma análise varia de acordo com a via, sendo necessário maiores quantidades na via seca. De certo modo, isto pode ser um ponto positivo já que maiores quantidades tendem a ser mais representativas entretanto, quando a disponibilidade de material é reduzida, o uso de menores quantidades se torna vantajoso (PAPINI; NETO, 2006).

- **Parâmetros de análise:** A faixa de concentração da amostra no meio dispersante deve ser definida avaliando qual a concentração mínima de partículas capaz de gerar uma relação sinal-ruído aceitável e qual a concentração máxima, que caso excedida levaria à leitura de múltiplas partículas simultaneamente. A concentração ideal varia de acordo com o laser, com o tamanho do caminho da zona de medida, com a sensitividade dos detectores e com as propriedades óticas das partículas. O tempo de

leitura e o número de aquisições são determinados experimentalmente de acordo com a precisão desejada (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2019). A escolha do modelo óptico varia de acordo com as características do material, e disponibilidade ou não de informações como índice de refração da amostra, como já mencionado anteriormente (USP 35, 2012).

4.5 Validação

Após o desenvolvimento, a metodologia deve passar por uma validação afim de garantir que alguns parâmetros sejam atendidos. De acordo com o ICH Q2(R1), uma validação de método analítico deve contemplar os seguintes parâmetros:

- **Exatidão:** nível de correspondência entre um resultado obtido e o valor real ou de referência.
- **Precisão:** média da proximidade entre diversos resultados obtidos de uma mesma amostra sob determinadas condições.
 - Repetibilidade: precisão entre diversos resultados sob as mesmas condições e entre um intervalo de tempo pequeno.
 - Intermediária: precisão entre resultados obtidos com equipamentos ou analistas diferentes sob as mesmas condições.
 - Reprodutibilidade: precisão entre resultados obtidos por diferentes laboratórios.
- **Especificidade:** capacidade de detectar inequivocadamente o analito de interesse na presença de outros componentes.
- **Limite de detecção:** menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectado, não necessariamente quantificado.
- **Limite de quantificação:** menor quantidade de analito que pode ser quantificado com precisão e exatidão.
- **Linearidade:** capacidade gerar resultados que são proporcionalmente condizentes às concentrações de analito nas amostras.
- **Faixa:** intervalo entre menor e maior concentração de analito na amostra que o método pode medir com precisão, exatidão e linearidade.
- **Robustez:** capacidade de manter os mesmos resultados sob condições variadas (ICH Q2R1, 1994).

Entretanto, devido as particularidades da análise de tamanho de partícula por difração a laser nem todos estes parâmetros se aplicam. De acordo com a Farmacopeia europeia, a especificidade é um dos parâmetros que não são avaliados pela técnica já que ela não é capaz de diferenciar diferentes componentes em uma mesma amostra, nem diferenciar aglomerados de partículas primárias sem auxílio de outra técnica como microscopia. A linearidade também não é avaliada, apesar de a concentração da amostra interferir nos resultados, o método não é capaz de fornecer resultados como concentração de um analito. A exatidão pode ser avaliada com auxílio de um microscópio e a precisão através dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade. A robustez pode ser obtida durante a optimização do método onde diferentes condições são testadas (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2019). Portanto, a validação de métodos de análise de tamanho de partícula por difração a laser é um pouco diferente de outros métodos analíticos. Apesar de os guias de validação publicados pelo ICH serem os recomendados pelo FDA, o compendio mais utilizado atualmente como guia para técnica de difração a laser é a ISO 13320, sendo um guia mais específico do que a ICH que apresenta uma validação analítica em termos gerais (GOSAR et al., 2017; SHEKUNOV et al., 2007; BONIATTI, 2013).

5 DISCUSSÃO

Considerando a influência que o de tamanho de partícula possui na rotina da indústria farmacêutica, saber identificar quando seu controle é necessário e qual metodologia utilizar para tal é extremamente importante. Atualmente existem diversas técnicas disponíveis para a análise de distribuição granulométrica, cada uma com suas particularidades. Decidir qual equipamento utilizar quando se trata de uma aplicação específica é uma tarefa razoavelmente simples, basta olhar na literatura qual método mais adequado para tal. Entretanto, quando se busca um equipamento para analisar amostras dos mais variados tipos a escolha se torna mais difícil. Equipamentos com maior flexibilidade e faixa de trabalho mais ampla merecem certa atenção nesses casos. Alguns fatores como quantidade de amostra necessária para análise, tempo de análise, parâmetro da partícula a ser avaliado, parâmetro de distribuição, sensibilidade, entre outros também são levados em consideração no momento de escolha da técnica.

A difração a laser é uma técnica escolhida por muitas empresas devido às diversas vantagens que apresenta como velocidade de análise, facilidade de uso e

flexibilidade podendo avaliar partículas em suspensão líquida e também na forma de pó suspensas no ar. O desenvolvimento do método deve ser feito cautelosamente para que problemas como presença de aglomerados, quebra de partículas durante a análise, concentração de amostra elevada, entre outros, não gerem resultados incompatíveis com a realidade. Com auxílio de outras técnicas como microscopia ótica e um desenvolvimento adequado, pode-se obter uma validação bem sucedida garantindo resultados robustos, precisos e exatos.

Deve-se ressaltar que os resultados fornecidos por cada metodologia variam consideravelmente de acordo com os princípios da técnica e modelos de tratamento de dados. Adaptar ou comparar resultados obtidos através de diferentes técnicas apresentam uma grande barreira na análise de tamanho de partícula principalmente no que diz respeito às partículas não esféricas onde resultados aproximados podem variar muito dependendo da metodologia utilizada. Os dados até podem ser manipulados para se aproximarem de resultados já existentes mas essa limitação deve ser levada em consideração na hora de escolher uma técnica.

6 CONCLUSÃO(ÕES)

O controle de tamanho de partícula tem sido cada vez mais incorporado na indústria farmacêutica frente à influência que exerce tanto nas etapas de produção quanto na qualidade final do medicamento. As técnicas disponíveis são diversas e evoluíram bastante desde as mais simples como a tamisação até as mais complexas como espalhamento de luz dinâmico. No entanto, ainda há muito a ser desenvolvido principalmente no que diz respeito às partículas não esféricas onde resultados aproximados podem variar muito de acordo com a metodologia utilizada.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, T. (1990) Particle size, shape and distribution. **Particle Size Measurement**. 4 ed. Springer, Dordrecht. 2020.
- AULTON, M. E. **Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines**. 5. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone: Elsevier, 2018. 933 p. ISBN 978-0-7020-7005-1.
- BONIATTI, J. **Desenvolvimento e validação de metodologia de distribuição granulométrica por espalhamento de luz laser do insumo farmacêutico ativo efavirenz**. 2013. 191 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/17723/2/16.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2021
- CHRISTOFOLETTI, S. R.; MORENO, M. M.T. Granulometria por difração a laser e sua relação com a faciologia das rochas argilosas da Formação Corumbataí-SP. **Cerâmica**, [S. I.], v. 63, n. 367, p. 303-310, 7 jan. 2017.
- COSTA, M. A. B. *et al.* Development, characterization and evaluation of the dissolution profile of sulfasalazine suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. I.], v. 51, n. 2, p. 449-459, jun. 2015.
- DIAS, J.A. **A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos**. Versão Preliminar. Licenciatura em Oceanografia, Universidade do Algarve, 2014. E-book.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA - EP. General Tests. **Particle Size Analysis by Laser Light Diffraction**. E.P.6.0. Cap. 2.9.31. 2019. p. 6320-6323.
- FANGUEIRO, J. F. *et al.* Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1848–1853, 2012.
- Farmacopeia Brasileira. 5 ed, volume 1, Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.
- GAMBOA, M. *et al.* Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Granulometria para Cloridrato de Metformina. **Revista Processos Químicos**, v. 10, n. 20, p. 271-280, 1 jul. 2016. Disponível em: http://ojs.rpqsenai.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/375/363 . Acesso em: 20 fev. 2021.
- GONZAGA , L. M. *et al.* Medidas de distribuição do tamanho de partícula combinado com os dados do peneiramento convencional. **Brazilian Journal of Development** , Curitiba, v. 7, n. 5, p. 52259-52271, 25 maio 2021.
- GOSAR, A. *et al.* Development and Validation of New Analytical Method for the Determination of Particle Size Distribution of Metformin Hydrochloride Using Laser

Based Particle Size Analyzer. **Journal of Pharmaceutical Research International**, [S. I.], v. 17, n. 5, p. 1-9, 5 jul. 2017.

ICH Q6A - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use; **Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A**, October, 1999.

ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH - Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology**, 1994.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 13320. **Particle size analysis - Laser diffraction Methods**. 2020.

LAMEIRAS, B. F. M. **Importância das características farmacotécnicas na preparação de formas farmacêuticas sólidas**. 2019. 34 p. Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. Disponível em:
https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/43406/1/MICF_Bernardo_Lameiras.pdf. Acesso em: 21 fev. 2021.

LIMA, C. M. **Influência do tamanho de partículas sólidas de Isoniazida, Rifampicina e Hidroxipropilmetylcelulose na liberação dos fármacos, a partir de sistemas matriciais**. 2001. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. Disponível em:
<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-08052015-115321/publico/CLAUDIO MOREIRA LIMA MESTRADO.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2021.

LING, Felix, N. L.; KASSIM, Khairul A.; KARIM, Ahmad T. Size Distribution Analysis of Kaolin using Laser Diffraction Technique. **Advanced Materials Research**, Suíça, v. 341-342, p. 108-112, 2012.

MAHESHWARI, R. et al. Micromeritics in Pharmaceutical Product Development. [S.I.] **Dosage Form Design Considerations**. Academic Press, 2018. Cap. 17, p. 599-635. DOI: 10.1016/B978-0-12-814423-7.00017-4. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Piyush-Sharma/publication/326819850_Dissolution_Profile_Consideration_in_Pharmaceutical_Product_Development/links/5c39c85692851c22a36f5c5d/Dissolution-Profile-Consideration-in-Pharmaceutical-Product-Development.pdf. Acesso em: 22 fev. 2021.

MALVERN. A basic guide to particle characterization. **Malvern whitepaper**, p. 1–24, 2015.

MANSO, J. P. M. F. **Caracterização Física das Formas Farmacêuticas Sólidas**. 2013. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto,

2013. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/7007/3/PPG_15116.pdf . Acesso em: 21 fev. 2021.

PAPINI, C. J.; NETO, R. M. L. Análise granulométrica de pós metálicos por difração de laser via seca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS MATERIAIS, 17º, 2006, Foz do Iguaçu. p.5024 - 5035.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula.** São Paulo. 2003. 129 p. Dissertação de Mestrado. Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares.

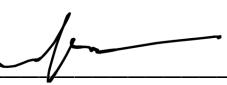
RAMOS, T. M. **Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas.** 2013. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SHEKUNOV, B. Y. et al. Particle size analysis in pharmaceutics: Principles, methods and applications. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 203–227, Fev. 2007. DOI: 10.1007/s11095-006-9146-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17191094/> . Acesso em: 20 fev. 2021.

SILVA, J. A. **Dissolução de comprimidos: estudo comparativo de apresentações genéricas contendo diazepam.** Rio de Janeiro. 2013. 41 p. Monografia (Pós-Graduação Lato Sensu) – Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ.

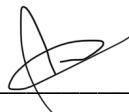
UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. General Chapters. **Laser Light Diffraction Measurement of Particle Size.** 35. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 2012.

UNITED States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.945-946.



22/06/2022

Data e assinatura do aluno(a)



23/06/2022

Data e assinatura do orientador(a)