

Desenvolvimento de Modelos de Regressão Multivariada para a Quantificação de Benzoilmetronidazol na Presença de seus Produtos de Degradação por Espectroscopia no Infravermelho Próximo

Willian Ricardo da Rosa de Almeida^a, Aline Santos Silva^a, Fávero Reisdorfer Paula^a, Fabiana Ernestina Barcellos da Silva^{a*}, Gabriela Ribas Foresti^a, Marco Flores Ferrão^b

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pampa. BR 472, Km 592. CEP 97500220. Uruguaiana, RS, Brasil.

^bInstituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500, Bairro Agronomia. CEP 9150-970. Porto Alegre, RS, Brasil.

Article history: Received: 07 May 2015; revised: 06 November 2015; accepted: 06 November 2015. Available online: 23 de December 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i4.741>

Abstract: Benzoyl metronidazole (BMZ) is a drug with antiparasitic and antibacterial activity available in the form of pediatric suspensions. The BMZ main degradation products are metronidazole and benzoic acid, and there are no reports in the literature on the determination of BMZ in the presence of its degradation products using near infrared spectroscopy. Therefore, in this study a method for determining the content of BMZ pharmaceutical ingredient in the presence of its main degradation products by near infrared spectroscopy associated with multivariate calibration were to develop. Regression with variable selection methods such as partial least squares regression for interval (iPLS) and partial least squares regression for synergism intervals (siPLS) were applied in order to select spectral regions that produce models with smaller errors. The best model using the iPLS algorithm was obtained when the spectrum was divided into 12 sub-intervals and select a period 11 (RSEP% = 1.37). Once the spectrum has been divided into 16 intervals and combined subintervals 9, 13 and 18 yielded the best model for siPLS algorithm (RSEP = 1.30%). The proposed method can be considered selective; it allows determining the BMZ in the presence of its degradation products.

Keywords: benzoyl metronidazole; near infrared; degradation; PLS

1. INTRODUÇÃO

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) é uma técnica analítica rápida e não destrutiva que tem sido utilizada em laboratórios de análise como substituta de metodologias que apresentam elevado tempo de análise e consumo de reagentes. Para análise de fármacos, a NIRS pode ser aplicada na quantificação de hidroclorotiazida [1], azitromicina [2], aminoglicosídeos [3], entre outros. Entretanto, poucos trabalhos na literatura descrevem o uso desta técnica para quantificação de fármacos na presença de seus produtos de degradação [4-6].

As metodologias analíticas desenvolvidas com este propósito são denominadas “indicativas de estabilidade”, já que podem ser utilizados para monitorar a degradação da substância ativa em insumos ou produtos farmacêuticos. Para o

desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica de escolha devido à capacidade de separação cromatográfica dos analitos, porém apresenta como principais desvantagens a necessidade de preparo da amostra e o uso de reagentes com alto custo e/ou toxicidade elevada [4, 7]. O uso da NIRS como metodologia indicativa de estabilidade tem se mostrado promissora para esta aplicação, já que possui como principais características a rapidez, o baixo custo, a possibilidade de determinações *in line*, além de não exigir qualquer tipo de preparo da amostra ou uso de reagentes tóxicos. Devido à sobreposição das bandas espectrais, o uso da NIRS para quantificação de analitos é possível quando associada a métodos multivariados de calibração [8]. Dentre os métodos mais empregados destaca-se a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least*

*Corresponding author. E-mail: fabianasilva@unipampa.edu.br

Squares) [9], com aplicações em diferentes campos da química analítica [10, 11]. Para melhorar o desempenho de técnicas de calibração multivariada que empregam dados do infravermelho próximo, têm sido utilizados algoritmos determinísticos como iPLS (*interval Partial Least Squares*) e siPLS (*synergical interval Partial Least Squares*) para a seleção das regiões espectrais com relevante informação para a quantificação de determinado analito [12]. Com a aplicação destes algoritmos é possível produzir modelos de regressão com melhor desempenho e menores erros de previsão [13].

O benzoilmetronidazol (BMZ) é um fármaco do grupo dos imidazóis amplamente utilizado no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. O BMZ é um sal insolúvel do metronidazol (MZ), com elevada lipofilia e que possui como principais produtos de degradação o MZ e o ácido benzóico (AB) [7, 14, 15]. Este fármaco foi introduzido na terapêutica como alternativa em formulações de uso pediátrico, devido ao sabor amargo do MZ. As estruturas químicas do BMZ, MZ e AB estão representadas na Figura 1 [16]:

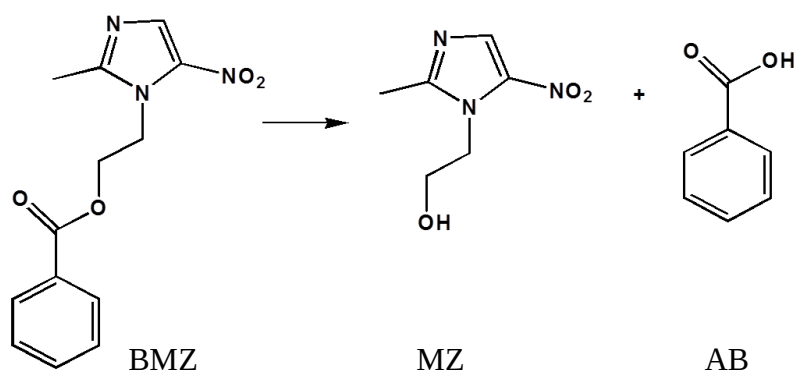


Figura 1. Estruturas químicas do BMZ, MZ e AB.

Segundo a Farmacopéia Brasileira, a determinação do teor de BMZ no insumo farmacêutico deve ser realizada por titulometria [17] e a quantificação do BMZ na presença de seus produtos de degradação é descrita na literatura a partir de metodologias utilizando CLAE [7, 18-20].

Como alternativa ao método farmacopéico, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método para a determinação do teor de BMZ em insumo farmacêutico, na presença de seus principais produtos de degradação (MZ e AB) por NIRS associado à calibração multivariada. Métodos de seleção de variáveis como iPLS e siPLS foram aplicados com o objetivo de determinar as regiões do espectro que produzem modelos com menores erros na previsão do BMZ.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O insumo farmacêutico BMZ com teor declarado de 99,60% foi gentilmente cedido pela indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi Ltda (Toledo, PR). Os insumos MZ e AB foram submetidos aos testes de controle de qualidade exigidos pela Farmacopéia

Brasileira [17] e utilizados como padrões secundários. Para a construção dos conjuntos de calibração e previsão foram preparadas vinte e quatro misturas sintéticas contendo BMZ, MZ e AB em diferentes proporções, conforme Tabela 1.

Equipamentos e softwares

Os espectros foram coletados na faixa de 10000 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 32 varreduras (modo de refletância) utilizando o Espectrômetro no Infravermelho Próximo Frontier da Perkin Elmer, com acessório de esfera de integração (NIRA). Os modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos utilizando o software MATLAB [21] versão 7.10 (The Math Works). As rotinas dos modelos de regressão foram realizadas através do pacote PLS Toolbox versão 2.0, que opera em ambiente MATLAB. O software foi executado em um Microcomputador Dell, com processador core i7 3.40 GHz e 2 GB de memória RAM. Para a construção dos modelos, os dados foram tratados através da correção de espalhamento de luz (MSC) e como pré-processamento os dados foram centrados na média (MEAN) ou autoescalados (AUTO).

Tabela 1. Concentração das amostras do conjunto de calibração e validação (mg g⁻¹).

Amostra	BMZ	MZ	AB
1 ^c	933	41	25
2 ^c	933	46	20
3 ^c	933	36	30
4 ^c	866	82	50
5 ^c	866	66	67
6 ^p	866	99	66
7 ^p	800	124	76
8 ^p	800	148	51
9 ^p	800	99	100
10 ^p	733	165	101
11 ^c	733	196	70
12 ^p	733	134	132
13 ^c	666	206	126
14 ^p	666	248	85
15 ^c	666	165	168
16 ^p	600	248	152
17 ^c	600	297	102
18 ^c	600	198	201
19 ^p	533	289	177
20 ^c	533	346	119
21 ^c	533	231	234
22 ^c	466	330	202
23 ^c	466	246	268
24 ^c	466	396	136

C: Calibração; P: Previsão

A seleção das amostras que compõem os conjuntos de calibração e previsão foi realizada através do algoritmo Kennard-Stone [22].

A regressão por PLS foi aplicada para a construção dos modelos de calibração para quantificação do BMZ, na presença de MZ e AB. Na aplicação do algoritmo iPLS o espectro foi dividido em 6, 12 e 18 intervalos e para o algoritmo siPLS o espectro foi dividido em 6, 12 e 18 intervalos e testadas combinações de 2 a 2 e 3 a 3 intervalos.

Os modelos foram escolhidos a partir dos menores valores do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) e erro quadrático médio de previsão (RMSEP) e maiores coeficientes de correlação (R²) [10]. O RMSECV foi utilizado para avaliar o erro dos modelos de calibração propostos e para selecionar o número de variáveis latentes. O RMSEP foi utilizado para avaliar a capacidade de previsão entre os diferentes modelos obtidos. O desempenho dos modelos foi avaliado através do erro relativo de previsão (RSEP, do inglês *Relative Standart Error of Prediction*) [23].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção dos conjuntos de calibração e validação

A seleção das amostras para a composição do

conjunto de calibração e validação foi obtida a partir da aplicação do algoritmo Kennard-Stone e distribuídas nos respectivos conjuntos de calibração e validação conforme descrito na Tabela 1.

Modelo PLS

Com base no conjunto de dados obtidos, inicialmente foi desenvolvido um modelo de regressão por PLS utilizando toda a região espectral. Os valores de RMSECV, RMSEP, R² e número de variáveis latentes dos modelos desenvolvidos estão dispostos na Tabela 2, referentes a cada tratamento e/ou pré-processamento utilizados.

Nos modelos propostos neste trabalho foi escolhido o tratamento de MSC e o pré-processamento AUTO. Como a determinação do número de VLs é também uma etapa crítica no desenvolvimento dos modelos, a mesma foi orientada pelo menor valor de RMSECV [24]. O modelo PLS obtido para o conjunto de dados em estudo apresentou RMSECV de 17,8 mg g⁻¹ para 3 VLs. Quando o desempenho do modelo PLS foi avaliado para as amostras de previsão, o RMSEP obtido foi de 17,1 mg g⁻¹ (r² = 0,9969; RSEP = 1,70%).

Modelos iPLS

A regressão por iPLS tem como princípio

dividir o espectro em regiões equidistantes e desenvolver um modelo para cada subintervalo. Em seguida, os valores de RMSECV, RMSEP, R^2 e o número de VLs são comparados aos do modelo PLS. O modelo iPLS indica qual é a região do espectro onde está contida a informação mais seletiva e também elimina as regiões do espectro que apresentam pouca

informação sobre o analito em questão. Para o desenvolvimento dos modelos iPLS para o BMZ, o espectro foi dividido em 6, 12 e 18 intervalos. Os valores de RMSECV, RMSEP, R^2 , VLs e o intervalo selecionado para cada modelo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Tratamentos e pré-processamentos para o modelo PLS.

Tratamento e/ou pré-processamento	VLs	RMSECV BMZ (mg g ⁻¹)	R ² _{cal}	RMSEP BMZ (mg g ⁻¹)
MEAN	5	18,8	0,994	18,4
AUTO	5	22,7	0,991	15,5
MSC-MEAN	3	15,5	0,995	19,0
MSC-AUTO*	3	17,8	0,996	17,1

VLs: Variáveis Latentes, * Modelo Selecionado.

Tabela 3. Parâmetros dos modelos iPLS para BMZ utilizando NIRS.

Modelo	Intervalo	VLs	RMSECV BMZ (mg g ⁻¹)	R ²	RMSEP BMZ (mg g ⁻¹)
PLS	Todos	3	17,8	0,9969	17,1
iPLS 6	4	4	14,5	0,9965	16,2
iPLS 12*	11	5	12,7	0,9974	8,5
iPLS 18	16	4	13,2	0,9972	8,5

* Modelo Selecionado.

Todos os modelos iPLS apresentaram menores valores de RMSECV e RMSEP quando comparados ao modelo PLS. Na Figura 2, a linha tracejada representa o valor de RMSECV para o modelo que empregou toda a informação do espectro, as barras indicam os subintervalos do espectro e sua altura o valor de RMSECV para cada intervalo. O número de VLs utilizado para a construção de cada modelo é identificado na base de cada barra.

O modelo construído com o intervalo 11 para o espectro dividido em 12 partes produziu os menores valores de RMSECV (Figura 2) e RMSEP (RSEP =

1,30%). Este intervalo corresponde a faixa 5000 - 4500 cm⁻¹, onde estão presentes o primeiro sobretom dos estiramentos das ligações N-H e O-H e o sobretom de combinações das vibrações de estiramento da ligação C-H da molécula dos compostos [25, 26]. Estas vibrações não são específicas da estrutura química do BMZ, estando presentes também na estrutura química do MZ. Desta forma, não é possível inferir que o modelo proposto utilizou uma região específica de absorção do analito, entretanto a mesma demonstrou ser seletiva, possibilitando a quantificação do analito na presença dos interferentes.

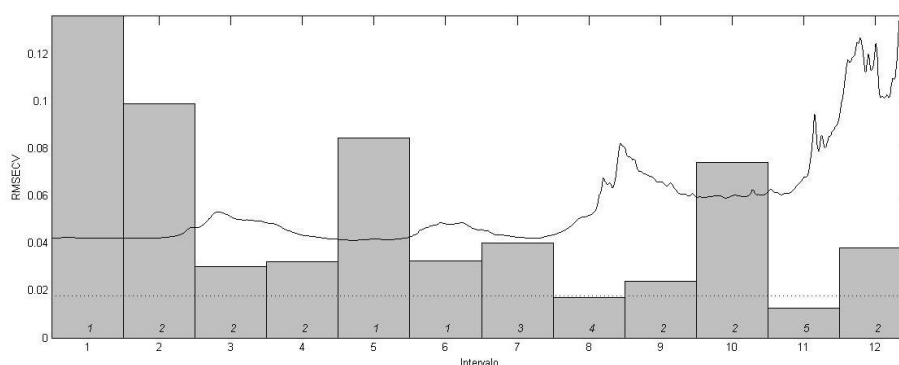


Figura 2. Valores de RMSECV (mg g⁻¹) para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de BMZ (divisão em 12 intervalos).

A Figura 3 apresenta os valores de referência versus os valores previstos para o modelo iPLS

desenvolvido com o intervalo 11.

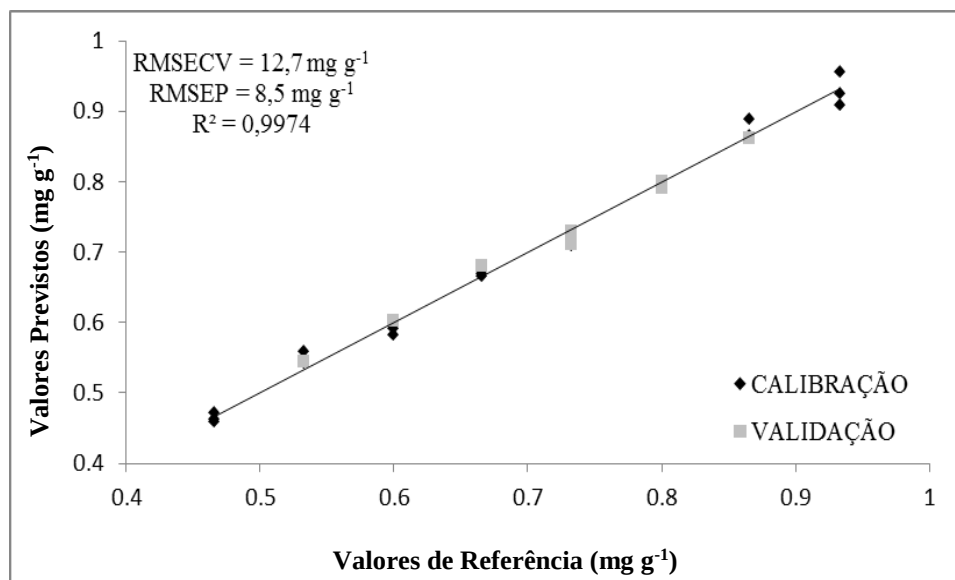


Figura 3. Valores de referência vs. valores previstos do modelo iPLS usando o intervalo 11.

Modelos siPLS

Como a regressão por iPLS apresenta uma limitação, já que não avalia a informação distribuída em mais de um intervalo simultaneamente, a regressão siPLS se constitui uma alternativa, pois permite a combinação de intervalos que não são contíguos. Desta forma, os modelos são obtidos com base no sinergismo

de intervalos e podem apresentar menores erros quando comparados aos modelos desenvolvidos com apenas um subintervalo. Para a construção dos modelos usando a regressão siPLS, os espectros foram divididos em 6, 12 e 18 intervalos, com combinações de 2 e 3 intervalos. Os valores de RMSECV, RMSEP, R², VL e os intervalos utilizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros dos modelos siPLS para BMZ.

Modelo	Intervalo	VLs	RMSECV BMZ (mg g ⁻¹)	R ²	RMSEP BMZ (mg g ⁻¹)
PLS	Todos	3	17,8	0,9969	17,1
siPLS 6 ^A	4 e 6	4	15,1	0,9963	15,7
siPLS 6 ^B	1, 5 e 6	5	14,0	0,9969	14,4
siPLS 12 ^A	4 e 8	4	12,8	0,9974	14,7
siPLS 12 ^B	1, 8 e 12	5	11,9	0,9977	16,7
siPLS 18 ^A	2 e 12	4	12,9	0,9973	16,0
siPLS 18 ^{B*}	9, 13 e 18	6	10,2	0,9983	14,1

A: combinação de 2 intervalos; B: combinação de 3 intervalos; * Modelo Selecionado.

Todos os modelos siPLS desenvolvidos apresentaram os valores de RMSECV e RMSEP menores que os valores do modelo PLS. O modelo que dividiu o espectro em 18 partes e combinou os subintervalos 9, 13 e 18 apresentou os menores valores de RMSECV e RMSEP (Figura 4). O intervalo 9 corresponde a faixa de 7337 - 7000 cm⁻¹, sendo a determinação nesta região baseada na combinação de vibrações de estiramento das ligações N-H e O-H. O

intervalo 13 corresponde a faixa de 6000 - 5677 cm⁻¹, sendo a determinação nesse intervalo baseada no primeiro sobretom da absorção do grupo C-H. O intervalo 18 corresponde a faixa de 4334 - 4000 cm⁻¹, sendo a determinação baseada no segundo sobretom da absorção do grupo C-H [25, 26]. Da mesma forma que o modelo iPLS proposto, não é possível inferir que os intervalos selecionados utilizaram uma região específica de absorção do BMZ. Entretanto, a região

selecionada pode ser considerada seletiva, já que interferentes MZ e AB. permitiu a quantificação do BMZ na presença dos

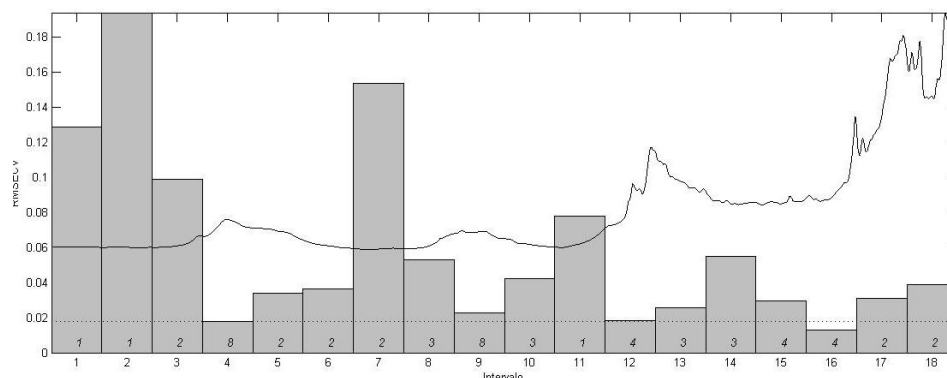


Figura 4. Valores de RMSECV (mg g^{-1}) para o modelo global (linha tracejada) e para os intervalos (barras) na determinação de BMZ por NIRS (divisão siPLS 18 intervalos).

A Figura 5 mostra a correlação entre o valor real e o valor previsto para o modelo siPLS desenvolvido com os subintervalos 9, 13 e 18.

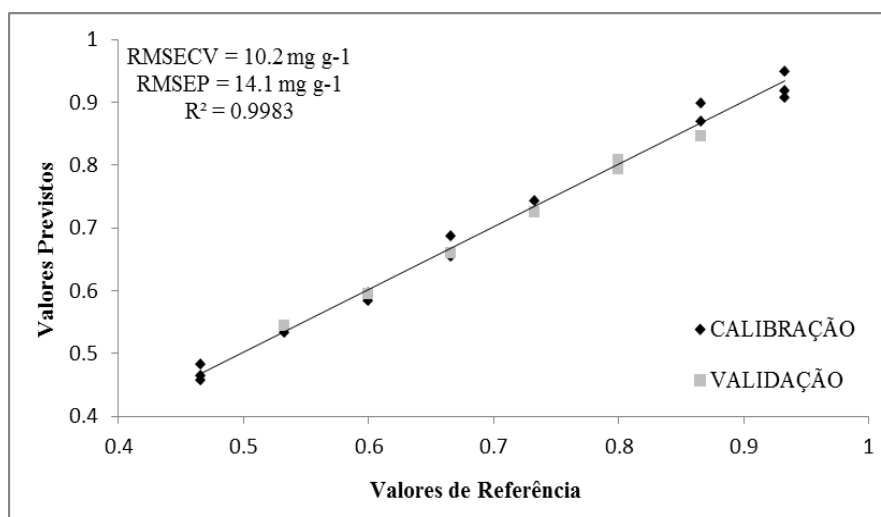


Figura 5. Valores de referência vs. valores previstos do modelo siPLS para BMZ usando os intervalos 9, 13 e 18.

Com base nos resultados encontrados, o modelo siPLS desenvolvido com os subintervalos 9, 13 e 18 apresentou os menores valores de RSEP(%). Dessa

forma, o modelo siPLS apresentou a melhor capacidade preditiva em relação aos demais modelos estudados, conforme dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados para os diferentes modelos PLS.

Modelo	Variáveis totais	Intervalos	VLs	RSEP BMZ (%)	R^2_{cal}
PLS	3000	-	3	1,70	0,9969
iPLS	250	11	5	1,37	0,9974
siPLS	500	9, 13 e 18	6	1,30	0,9983

4. CONCLUSÃO

Através da combinação de NIRS e algoritmos de regressão como PLS, iPLS e siPLS foi possível desenvolver modelos multivariados para a determinação de BMZ na presença de seus produtos de degradação em insumo farmacêutico. As técnicas de seleção de variáveis utilizadas neste trabalho produziram modelos com uma melhor capacidade preditiva em relação ao modelo PLS que empregou toda a faixa espectral. O algoritmo siPLS demonstrou ser mais adequado para a seleção de variáveis, combinando as regiões com informações mais relevantes na quantificação de BMZ na presença de seus produtos de degradação. O método proposto pode ser considerado seletivo, simples, rápido, não necessita de uso de reagentes químicos, sendo útil para indicar a estabilidade da matéria-prima.

5. AGRADECIMENTOS

À indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi Ltda por ceder a matéria-prima e ao Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos (LDCQ) da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguiana, por disponibilizar a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Ferreira, M. H.; Braga, J. W. B.; Sena, M. M. *Microchem. J.* **2013**, 109, 158. [\[CrossRef\]](#)
- [2] Li, P.; Du, G.; Cai, W.; Shao, X. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2012**, 70, 288. [\[CrossRef\]](#)
- [3] Sarraguça, M. G.; Soares, S. O.; Lopes, J. A. *Vib. Spectrosc.* **2011**, 56, 184. [\[CrossRef\]](#)
- [4] Souza, M. G.; Soares, S. O.; Lopes, J. A. *Vib. Spectrosc.* **2012**, 62, 35. [\[CrossRef\]](#)
- [5] Naguib, I. A. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **2011**, 49, 91. [\[CrossRef\]](#)
- [6] Kao, J. Y.; McGoverin, C. M.; Graeser, K. A.; Rades, T.; Gordon, K. C. *J. Vib. Spectrosc.* **2012**, 58, 19. [\[CrossRef\]](#)
- [7] Bempong, D. K.; Manning, R. G.; Mirza, T.; Bhattacharyya, L. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2005**, 38, 776. [\[CrossRef\]](#)
- [8] Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Martinez, C. L.; Edmond, A.; Jent, N. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2007**, 44, 683. [\[CrossRef\]](#)
- [9] Wold, S. *Technometrics* **1978**, 20, 397. [\[CrossRef\]](#)
- [10] Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, **2009**.
- [11] Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, 58, 109. [\[CrossRef\]](#)
- [12] Norgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J. P.; Munck, L.; Engelsen, S. B. *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 413. [\[CrossRef\]](#)
- [13] Müller, A. L. H.; Flores, E. M. M.; Müller, E. I.; Silva, F. E. B.; Ferrão, M. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 10, 1903. [\[CrossRef\]](#)
- [14] Finkel, R.; Cubedou, L. X.; Clark, M. A. *Farmacologia Ilustrada* 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, **2010**.
- [15] Silva, A. S. Desenvolvimento e validação de método de dissolução de suspensões de Benzoilmetronidazol e perfil de dissolução. [Dissertação] Uruguiana, Brasil: Universidade Federal do Pampa, **2014**. [\[Link\]](#)
- [16] British Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationary Office, **2009**.
- [17] Farmacopeia Brasileira 5ª ed. São Paulo: Atheneu, **2010**.
- [18] Matthew, M.; Gupta, V. D.; Bethea, C. *J. Clin. Pharm. Ther.* **1994**, 19, 31. [\[CrossRef\]](#)
- [19] Pashankov, P. P.; Kostova, L. L. *J. Cromatogr.* **1987**, 394, 382. [\[CrossRef\]](#)
- [20] Baeyens, W. R.; Van der Weken, G.; Van Overbeke, A.; De Meyer, S.; Campaña, A. M. G.; Kiekens, P.; Remon, J. P.; Dewaele, C. *Biomed. Chromatogr.* **1998**, 12, 164. [\[CrossRef\]](#)
- [21] MATLAB - The language of technical computing, version 7.10, The Mathworks Inc., Estados Unidos, **2010**.
- [22] Kennard, R.W.; Stone, L.A. *Technometrics* **1969**, 11, 137. [\[CrossRef\]](#)
- [23] Silva, F. E. B.; Ferrão, M. F.; Parisotto, G.; Müller, E. I.; Flores, E. M. M. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, 49, 800. [\[CrossRef\]](#)
- [24] Parisotto, G.; Marques, M.; Hermes, A. L.; Flores, E. M. M.; Ferrão, M. F. *Orbital The electronic Journal of Chemistry* **2009**, 1, 38. [\[Link\]](#)
- [25] Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de Análise Instrumental* 6ª ed. Porto Alegre: Bookman, **2009**.
- [26] Pasquini, C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 2, 198. [\[CrossRef\]](#)