

**Quantificação de sacarose em formulações farmacêuticas líquidas de uso oral pela técnica de RMN de <sup>1</sup>H**

Nathália Vitória Pereira Araújo<sup>1</sup>, Luciano Morais Lião<sup>2</sup>, Glaucia Braz Alcantara<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970, Goiânia, GO

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Muller, 1555, 79074-460, Campo Grande, MS

<sup>1</sup>n.vitoria.araujo@gmail.com, <sup>2</sup>lucianoliao@yahoo.com.br, <sup>3</sup>glabraz@yahoo.com.br

**PALAVRAS-CHAVE:** RMN, quantificação, sacarose, formulações farmacêuticas.

- Revisado pelo orientador -

Nathália Vitória Pereira Araújo – orientanda

Luciano Morais Lião – orientador

Glaucia Braz Alcantara – co-orientadora

## 1 INTRODUÇÃO

Medicamentos líquidos, muitas vezes, apresentam como inconveniente o fato de apresentarem sabor desagradável. Uma alternativa consagrada é o emprego de agentes flavorizantes e de edulcorantes, com objetivo de reduzir o amargor e deixar a composição com sabor mais agradável (SILVA & SANTOS, 1994), principalmente porque há grande rejeição por parte das crianças, que, junto com os idosos, devido às dificuldades de deglutição, são as maiores consumidoras das formas farmacêuticas líquidas orais (NEVES *et al.*, 2006; ANSEL *et al.*, 2007).

A presença de flavorizantes e edulcorantes em medicamentos pediátricos possui também como vantagem a melhoria na adesão (FERREIRA & SOUZA, 2005). Por outro lado, o caráter acidogênico da sacarose, que se destaca entre os açúcares utilizados no mascaramento do sabor (NEVES *et al.*, 2006), promove uma queda de pH uma vez que funciona como substrato para a fermentação da microbiota bucal (REKOLA, 1989). O potencial lesivo de xaropes adocicados pode ser aumentado quando da não higienização bucal após a administração do medicamento (BIGEARD, 2000) e, segundo estudo realizado, quase 80% dos pais não realizava higiene bucal em seus filhos após a administração (NEVES *et al.*, 2006).

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose unida a uma unidade de frutose através de uma ligação O-glicosídica proveniente da reação entre a hidroxila de uma glicose com o carbono anomérico de outra (LEHNINGER *et al.*, 2006). A figura 1 mostra a sacarose e destaca o seu único hidrogênio anomérico, ligado ao carbono anomérico.

O principal método para detecção de carboidratos é a medida do índice de refração (CLEMENT *et al.*, 1992; RAJAKYLA, 1986; FERREIRA & FERREIRA, 1997; FERREIRA & GOMES, 1998; BOUMAHRAZ *et al.*, 1982; NIKOLOV *et al.*, 1985), cujo emprego apresenta desvantagens relevantes como uma perda de sensibilidade e dependência da temperatura (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Análises para quantificação de sacarose na indústria de refrigerantes, por exemplo, são feitas através de métodos tradicionais, e considerados laboriosos, como titulometria, gravimetria, espectrofotometria e HPLC com índice de refração (SILVA *et al.*, 2003). Entretanto, a determinação quantitativa de açúcares já tem sido relatada através métodos mais modernos como a cromatografia gasosa, análises enzimáticas e métodos eletroquímicos e espectrométricos. (CHANG *et al.*, 1995). Dentre estes métodos modernos,

há de se destacar a Ressonância Magnética Nuclear, cujo emprego para fins qualitativos e também quantitativos são descritos em farmacopeias internacionais (HOLZGRABE *et al.*, 2005).

A espectroscopia de RMN tem se mostrado muito importante para a análise de misturas complexas em diversas áreas, como análises de características de combustíveis e biocombustíveis (MONTEIRO *et al.*, 2009), estudo da qualidade alimentícia, para análise de metabólitos e de produtos industriais (WELJIE *et al.*, 2008; LIN & SHAPIRO, 1996; WINDIG *et al.*, 2002), além do subsídio para classificação taxonômica de espécies de diversos reinos, já que diferentes espécies produzem diferentes metabólitos (SCHNEIDER, 2007; ALCÂNTARA *et al.*, 2007). Além disto, a RMN fornece tecnologia e recursos suficientes para análises reprodutíveis nas quais a identificação e a quantificação de compostos podem ser alcançadas (WELJIE *et al.*, 2008).

O emprego da técnica de RMN quantitativo (qNMR) é também capaz de, concomitantemente, fornecer dados para análise qualitativa (PAULI *et al.*, 2005). E esta característica, aliada ao caráter não destrutivo da espectroscopia e à possibilidade de determinação simultânea de diversos analitos, supera os pontos negativos apontados para a técnica: alto custo e a relativa baixa sensibilidade. Até mesmo porque a sensibilidade pode ser otimizada (sondas, tipo de núcleo, etc). (MALZ & JANCKE, 2005).

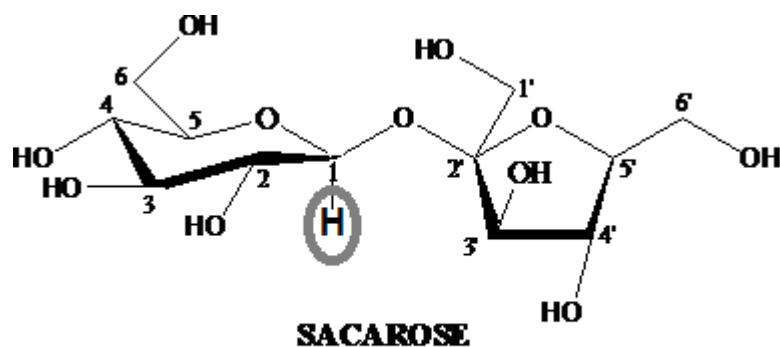


Figura 1 – Estrutura molecular da sacarose com o hidrogênio anomérico em destaque.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi quantificar a sacarose em formulações farmacêuticas líquidas através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ).

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Amostras

As amostras foram adquiridas no comércio local e foram armazenadas em local adequado até o momento das análises. Foram analisados catorze formulações farmacêuticas líquidas de ações diversas, dentre as quais, anti-histamínicos, antitussígenos, anti-inflamatórios, suplementos vitamínicos e anti-anêmicos. Três destes xaropes (7, 8 e 9) foram considerados viscosos e submetidos a diluição especial.

As amostras foram preparadas diluindo-se 300  $\mu\text{L}$  da formulação farmacêutica em 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSPP-d}_4$  (solvente + padrão interno 5%), ambos os volumes com massas conhecidas. Para as formulações farmacêuticas 7, 8 e 9, consideradas viscosas, as amostras sofreram diluição especial (10  $\mu\text{L}$  de xarope, 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSPP-d}_4$  e 290  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ ), a massa para cada volume também foi determinada. A realização das análises destas amostras viscosas sem diluição resultaram em espectros distorcidos, devido aos problemas de homogeneidade do campo magnético (*shimming*), sendo, portanto, crucial a sua diluição especial.

### 3.2 Análises de RMN

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T), equipado com uma sonda de 5 mm de detecção inversa com gradiente de campo (Triple Band Inverse – TBI), situado no Laboratório de RMN, no Instituto de química (IQ-1) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO. O pacote de software usado para aquisição e processamento dos dados foi o Bruker TopSpin (versão 2.1).

As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se a sequência de pulsos CPPR (Composite Pulse Presaturation sequence), para a supressão do sinal do solvente. O número de varreduras acumuladas (NS) foi de 32, o tempo de espera na aquisição (d1) foi de 30 s, a quantidade de pontos empregados na aquisição do espectro (TD) foi de 64k e a temperatura foi mantida constante (298K). O ganho do receptor foi devidamente ajustado automaticamente para cada amostra, utilizando-se uma janela espectral de 16,0214. Os parâmetros utilizados seguem o protocolo padrão desenvolvido por Malz e Jancke (2005).

### **3.3 Quantificação**

Três métodos distintos foram utilizados para a quantificação da sacarose. O primeiro deles baseia-se em um princípio da ressonância no qual a intensidade do sinal é diretamente proporcional à quantidade de núcleos que geram o sinal. Deste modo, foram realizados cálculos diretos utilizando a proporcionalidade do sinal de interesse (hidrogênio anomérico) e o sinal do hidrogênio de um padrão interno, o propionato de tetrametilsilil (TMSP-d<sub>4</sub>).

O segundo método empregado foi o da curva de calibração, cuja curva padrão foi construída com o padrão de sacarose, de modo a apresentar a relação entre a massa presente da sacarose e a integral fornecida pelo hidrogênio anomérico. A curva de calibração da sacarose foi construída com teores de sacarose (1, 10, 20, 100, 180, 240 e 360 mg) que abrangeram as quantidades deste açúcar presentes nas amostras.

Como terceiro método, o método da adição de padrão foi empregado em algumas amostras, escolhidas aleatoriamente, a fim de comprovar os valores obtidos pelos métodos anteriores. Para a curva de adição de padrão, às amostras foram acrescentadas quantidades crescentes de sacarose padrão (5, 10, 15, 20 e 25 mg), utilizando-se a extrapolação da curva para a predição do teor real de sacarose presente.

O padrão interno, TMSP-d<sub>4</sub>, apresenta nove hidrogênios, cujo valor de integral foi relacionado com o do hidrogênio anomérico presente na sacarose. A integração foi feita automaticamente pelo programa TOPSPIN, software do espectrômetro de RMN.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Cálculos diretos**

A quantidade de sacarose encontrada nos xaropes foi bastante variável: desde 8,48% (amostra 1) a 64,10% (amostra 8), conforme descrito na Tabela 1.

### **4.2 Curva de calibração**

Os valores obtidos para a concentração de sacarose através da curva de calibração estiveram em concordância com os encontrados pelos cálculos diretos, com exceção das

formulações farmacêuticas viscosas (Tabela 1). A curva de calibração obtida com o padrão de sacarose está representada na Figura 2.

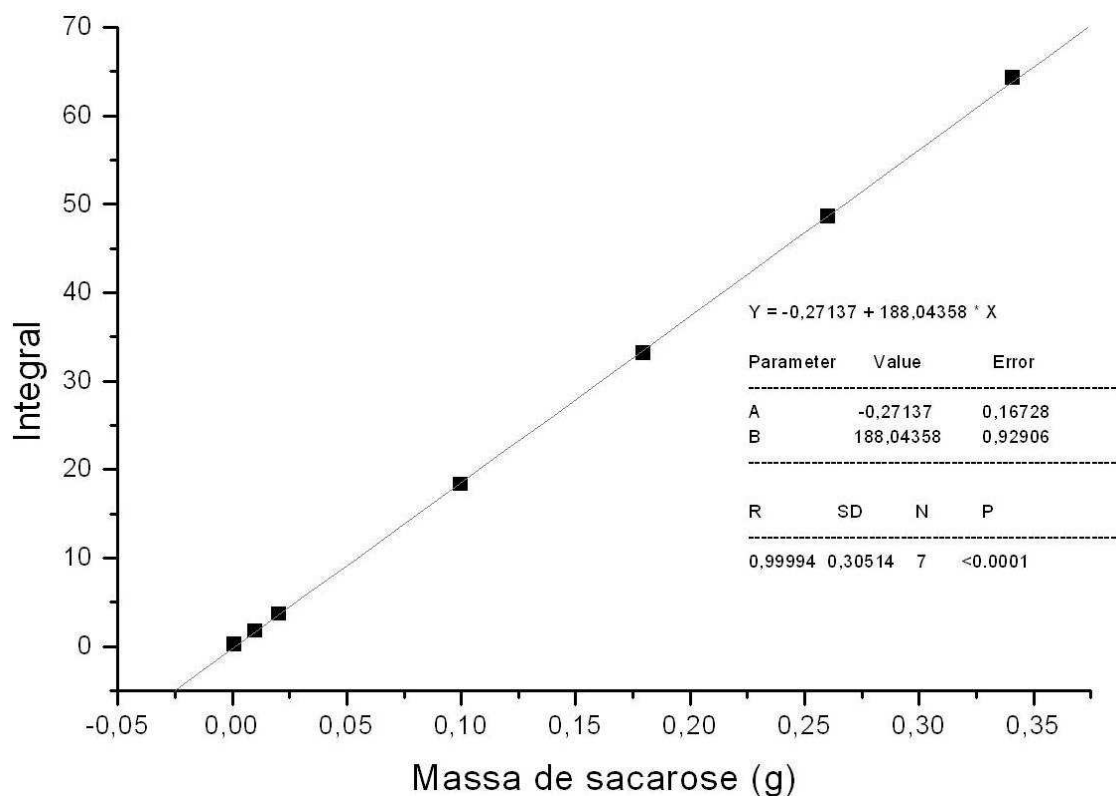


Figura 2 – Curva de Calibração com a massa de sacarose na solução de D<sub>2</sub>O/TMSP-d<sub>4</sub> versus a integral do sinal do hidrogênio anomérico da sacarose.

### 4.3 Adição de padrão

A curva de adição de padrão, mostrada na Figura 3, foi realizada para as amostras 3 e 8 (viscosa). A extrapolação da curva forneceu um valor para a concentração de sacarose que corrobora com os obtidos pelos dois métodos anteriores. O mesmo não ocorreu com o xarope viscoso.

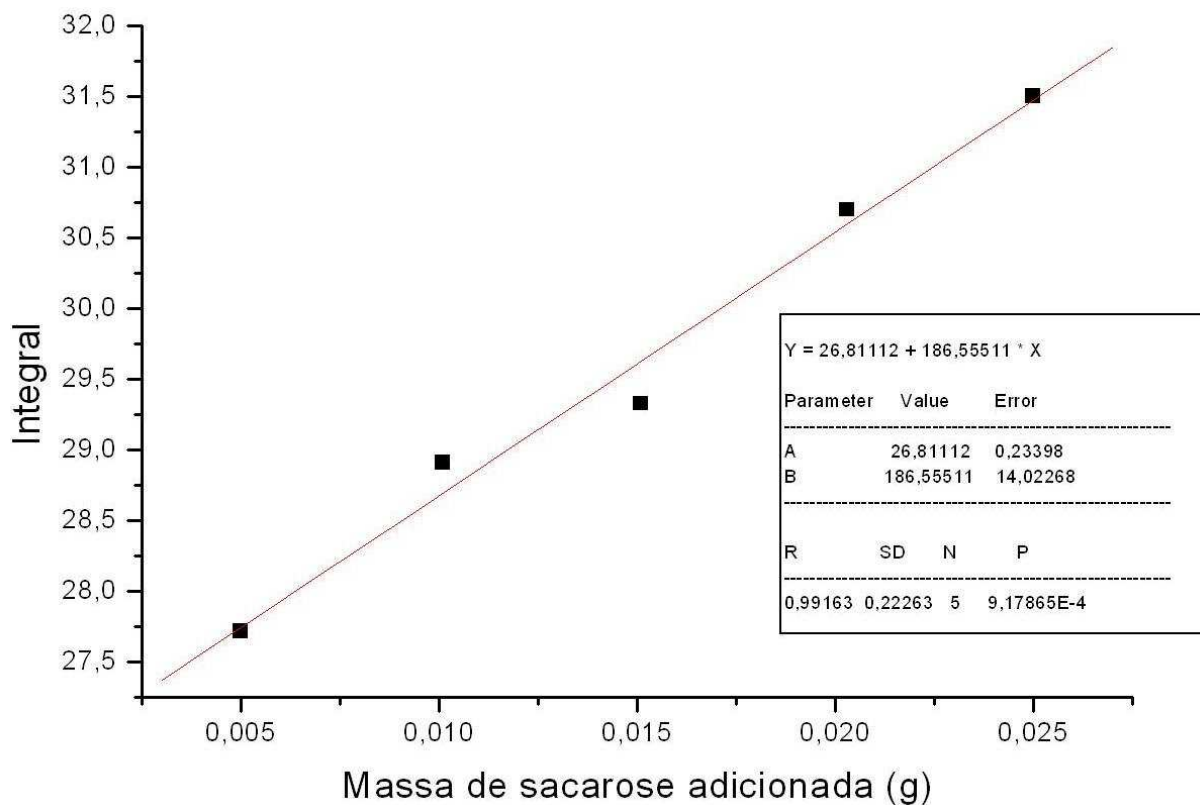


Figura 3: Curva de adição de padrão com a massa de sacarose adicionada na solução de D<sub>2</sub>O/TMSP-d<sub>4</sub> versus a integral do sinal do hidrogênio anomérico da sacarose.

Tabela 1 – Teor de sacarose nas formulações farmacêuticas pediátricas analisadas.

Amostra/ Formulação	Cálculos diretos		Curva de calibração	
	Concentração de Sacarose (% p/p)*	Desvio Padrão	Concentração de Sacarose (% p/p)*	Desvio Padrão
1	8,48	0,621	9,54	0,379
2	41,88	4,213	42,02	4,478
3	41,84	0,488	44,60	5,322
4	29,31	0,153	29,77	0,563
5	49,74	0,434	50,91	2,268
6	15,27	0,122	15,52	0,094
7**	20,83	0,755	36,85	2,168
8**	54,71	0,666	64,10	1,666
9**	24,23	0,973	38,03	1,516
10	12,36	1,148	11,99	1,086

11	44,86	1,195	55,62	1,307
12	51,68	0,181	52,24	0,759
13	47,32	8,854	56,95	8,311
14	22,96	0,081	21,88	0,075

\*Obtida através da média aritmética entre os valores encontrados em triplicata.

\*\*Xaropes viscosos

## 5 DISCUSSÃO

A quantificação, realizada através do método absoluto (cálculo direto - que fornece não apenas a proporção do analito na amostra, como também quantidade e concentração), requer adição de um padrão interno (MALZ & JANCKE, 2008). Este, dentre outras características, deve ser não higroscópico, inerte e estável, apresentar boa solubilidade na maioria dos solventes de RMN e apresentar-se como um simpleto no espectro (LARIVE, 1997). O padrão escolhido, embora higroscópico, preenche tais requisitos além da facilidade, uma vez que já era utilizado na rotina do laboratório. Quanto à higroscopicidade do TMSP-d<sub>4</sub>, este foi previamente seco em estufa e armazenado em dessecador antes da preparação da solução utilizada nas análises. O sinal do TMSP-d<sub>4</sub> ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>COONa) apresentou-se bem definido, em uma região limpa e de deslocamento químico igual a  $\delta$  0,00. O valor obtido de integral foi calibrado para 1,000, referindo-se aos nove hidrogênios equivalentes do TMSP-d<sub>4</sub>.

Para a atribuição dos sinais da sacarose e escolha do melhor sinal para a quantificação, primeiramente, foram realizadas algumas análises de RMN de um padrão de sacarose, obtido em uma indústria farmacêutica da região, com 99,99% de pureza.

Na análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da sacarose, um dissacarídeo composto por frutose e glicose que apresenta um único hidrogênio anomérico, verificam-se sinais típicos de hidrogênios de carboidratos (entre  $\delta_H$  3,2 e 4,0) além do hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  5,42, apresentado como um duplete de constante de acoplamento (J) igual a 3,85 Hz em uma região desimpedida tanto no espectro do padrão, quanto especialmente nos espectros das diversas amostras analisadas (Figura 4).

A análise do espectro de <sup>13</sup>C confirma a estrutura do padrão ( $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo): 12 sinais de carbono, sendo três deles atribuídos aos carbonos metilênicos



$\delta_{\text{CH}_2}$  61.24 (C-6), 63.44 (C-6') e 62.46 (C-1') e um ao carbono quaternário em  $\delta_{\text{C}}$  103.7 (C-2'). Para uma atribuição indubitável, correlação heteronuclear à longa distância (HMBC) foi realizada e, nela, apenas o hidrogênio anomérico se correlacionava com o carbono quaternário da frutose ratificando, assim, o proposto para atribuição. Os sinais de escolha estão destacados na Figura 4.

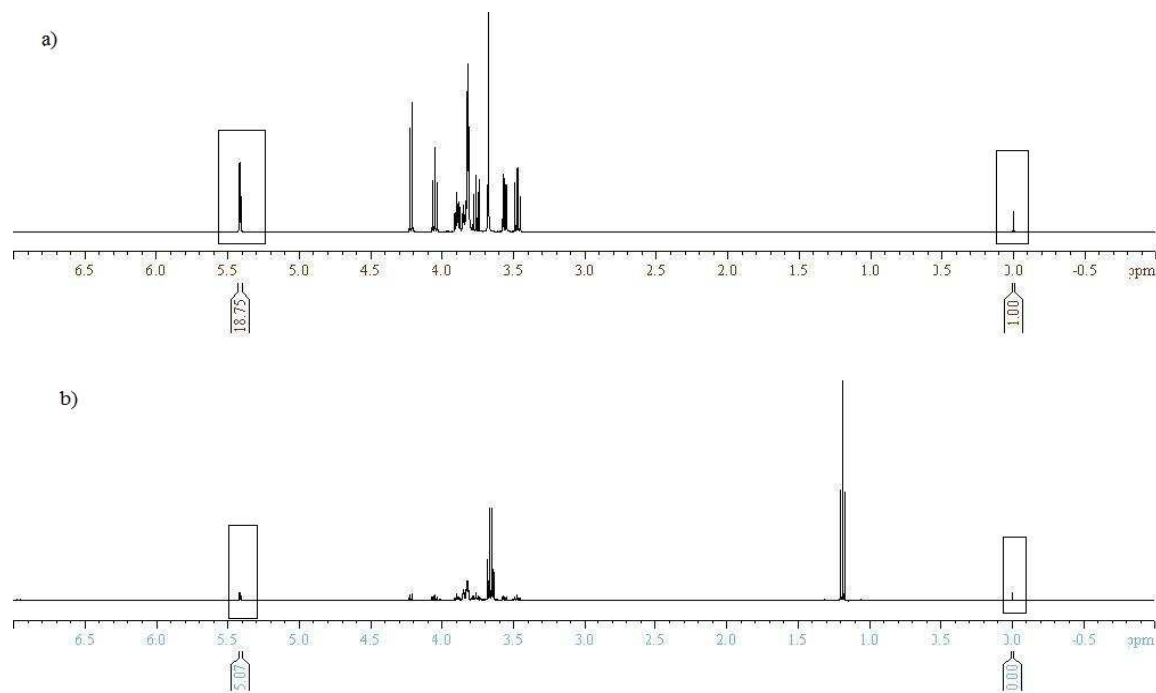


Figura 4: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do padrão de sacarose (a) e da amostra 1 (b), com os sinais integrados em destaque: à direita, em  $\delta$  0,00, o sinal do padrão interno (TMS- $\text{d}_4$ ) e, à esquerda, em  $\delta$  5,42, o sinal do hidrogênio anomérico da sacarose.

A sequência de pulsos utilizada neste estudo (CPPR) não foi a mesma definida pelo protocolo desenvolvido por Malz e Jancke (2005), ZG30, pois a supressão do sinal do solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ) foi imprescindível. Considerando-se que a supressão do sinal se dá, em linhas gerais, pela irradiação contínua de radiofrequência na região do solvente, quando a CPPR é empregada a magnetização não é devolvida (processo de relaxação impedido) e, portanto, não há captação do sinal no espectro.

Desta forma, a troca da ZG30 pela CPPR se justifica pelo fato de que, quando a primeira foi empregada, o sinal de integração do hidrogênio anomérico da sacarose se sobrepunha a outros sinais, correspondentes aos hidrogênios das hidroxilas da sacarose, cujo deslocamento químico, de modo geral, é bastante variável e dependente do ambiente em que se encontra (concentração, pH e temperatura) (PAVIA, 2010). Assim, quando a sequência de

pulsos CPPR foi utilizada, a supressão da água através da irradiação contínua em sua frequência, ocasionou especialmente a supressão das hidroxilas da sacarose, em virtude das fortes ligações de hidrogênio entre elas e a água, afetando drasticamente a sua relaxação. Deste modo, além da supressão do sinal da água, o emprego da CPPR permitiu a adequada quantificação do hidrogênio anomérico da sacarose. Os espectros com supressão (CPPR) e sem supressão (ZG30) do sinal da água estão representados na Figura 5.

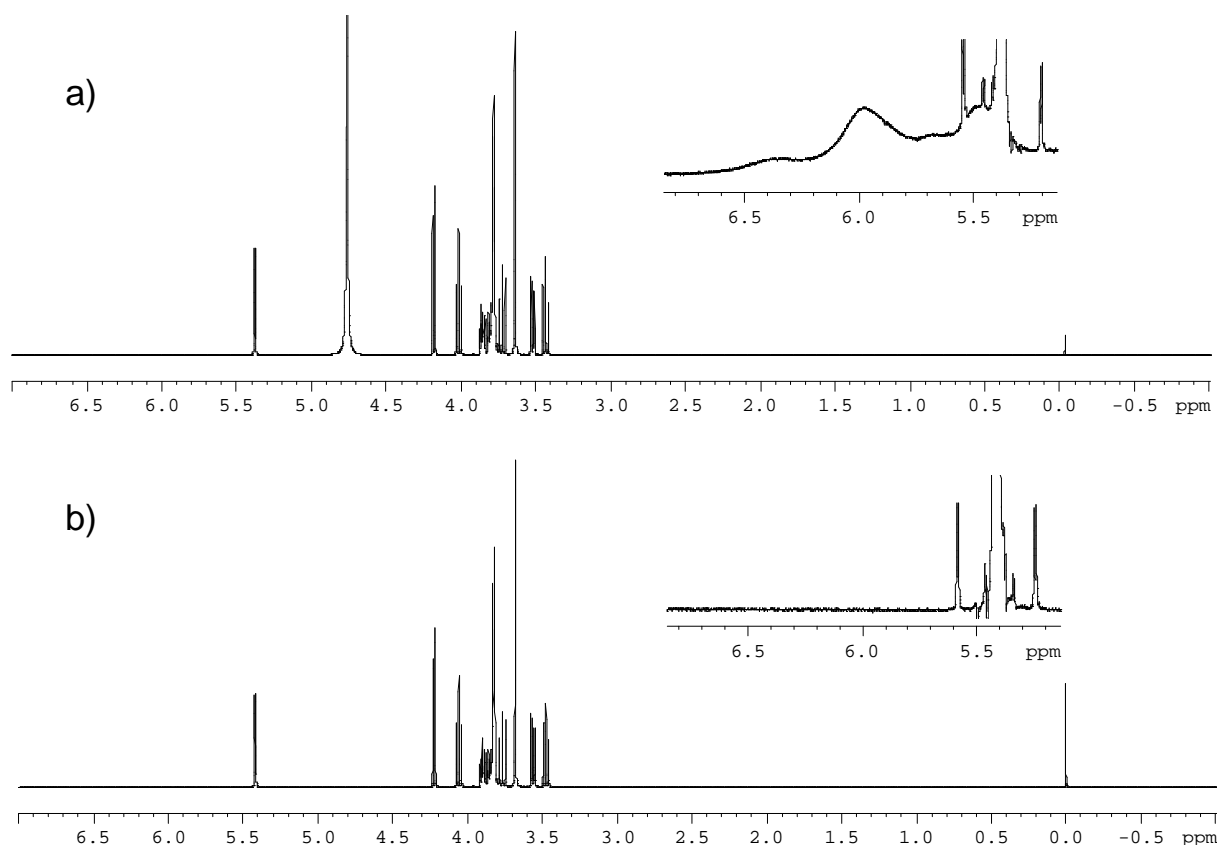


Figura 5: Espectros de RMN de <sup>1</sup>H do padrão de sacarose. E em (a), o espectro adquirido sem supressão do solvente (ZG30) e, em (b), com supressão (CPPR). Note a sobreposição do sinal do hidrogênio anomérico a outros sinais (a).

Com relação aos teores de sacarose encontrados, segundo a farmacopéia brasileira, não há exigências em relação à concentração máxima permitida de açúcares/adoçantes em soluções orais (apenas para xaropes, há um limite mínimo de 45% p/p de sacarose e outros açúcares). Todavia, sabe-se que a presença de carboidratos fermentáveis, ainda aliada ao pH ácido que os medicamentos em questão são apresentados, propicia o aparecimento de cáries dentárias e, deste modo, torna-se aconselhável a substituição de tais carboidratos por

adoçantes análogos (como sacarina e ciclamato sódico) e higienização bucal logo após utilização de tais soluções orais (NEVES, *et al.*, 2006).

Deste modo, os valores encontrados para os teores de sacarose foram bastante expressivos, especialmente nos casos das formulações 4, 6, 12 e 14 cujas concentrações de sacarose variam menos de 0,6% entre os dois métodos expostos na tabela 1 (cálculos diretos e da curva de calibração). As formulações 1, 4, 6, 12 e 14 apresentam desvio padrão abaixo de 1% para os dois métodos.

A adição de padrão, realizada para a formulação 3 a fim de confirmar os teores encontrados na quantificação, consolida os resultados obtidos através dos cálculos diretos e da curva de calibração. A extrapolação da curva (Fig. 3) fornece quantidade de sacarose igual a 0,1437g, que bastante assemelha à média de 0,1449g e 0,1553g obtidas pelos cálculos diretos e curva de calibração respectivamente. Esta análise sugere que, embora estes os valores estejam em concordância entre si, há maior precisão relacionada aos cálculos diretos e à adição de padrão.

Já para as formulações viscosas, os valores encontrados para os teores de sacarose foram bastante divergentes entre o método de cálculo direto e o método da curva de calibração. A adição de padrão realizada para a formulação 8 forneceu concentração de sacarose semelhante à encontrada pelo cálculo direto. Deste modo, é possível inferir que os cálculos diretos de quantificação a partir dos dados de Ressonância Magnética Nuclear se estabelecem como um método confiável para análises quantitativas, inclusive, com resultados mais precisos que os de curva de calibração tradicional.

## **6 CONCLUSÃO**

A omissão de informações específicas do teor de sacarose (e de edulcorantes em geral) e a falta de conhecimento acerca do potencial cariogênico de formulações pediátricas apontam para uma necessidade de maior controle das agências de vigilância, de implementação de metodologias de análise, bem como, de uma política pública de esclarecimento.

Através do trabalho realizado foi possível demonstrar que a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  é capaz de, aliada a métodos analíticos e ao seguimento de protocolo para análises, fornecer resultados quantitativos confiáveis. A praticidade na realização das análises, assim como o pequeno tempo necessário para a obtenção dos resultados, são características que favorecem a utilização da RMN em detrimento a técnicas clássicas ou mesmo às demais técnicas espectrométricas.

## 7 REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. “Chemometric analysis applied in <sup>1</sup>H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples”, *Analytica Chimica Acta*, 595: 3-8, 2007.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L. V. “Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos”, 8º ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BIGEARD L. “The role of medication and sugars in pediatric dental patients”. *Dental Clinics of North America*, 44:443-456, 2000.

BOUMAHRAZ, M.; DAVYDOV, V.Y.; KISELEV, A.V. “Separation of carbohydrates by liquid-chromatography on silica-fel, adding adsorption modifiers to the eluent”. *Chromatographia* 15: 751, 1982.

CHANG, S.K.C.; HOLM, E.; SCHWARZ, J.; RAYAS-DUARTE, P. “Food”. *Analytical Chemistry*, 67(12): 127, 1995.

CLEMENT, A., YOUNG, D., BRECHET, C. “Simultaneous identification of sugars by HPLC using Evaporative Light-Scattering Detection (ELSD) and refractive-index detection (RI) - Application to plant-tissues”. *Journal of Liquid Chromatography*, 15: 805, 1992.

Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il.

FERREIRA, A.O.; SOUZA, G.F. “Preparações orais líquidas”, São Paulo: *Pharmabooks*. P. 309. 2005.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O. ; FERREIRA, M.A. “Simultaneous determination of sugars, uric and orotic acids in infant formulae by HPLC-UV/RI”. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 20: 3419. (1997).

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; GOMES, A.M.P.; FERREIRA, M.A. “Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI”. *Carbohydrate Polymers*, 37: 225, 1998.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. “Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38: 806–812, 2005.

LARIVE, C.K.; JAYAWICKRAMA, D.; ORFI, L. “Quantitative analysis of peptides with NMR Spectroscopy”. *Applied Spectroscopy*, 51: 1531–1536, 1997.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. 4th ed. New York: Worth Publishers, 2006.

LIN, M; SHAPIRO, M. J. “Mixture analysis in combinatorial chemistry. Application of diffusion-resolved NMR spectroscopy”, *J. Org. Chem.*, **61**: 7617-7619, 1996.

MALZ, F.; JANCKE H. “Validation of quantitative NMR”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38: 813–823, 2005.

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; BOFFO, E.F.; TAVARES, L.A.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, A.G. “Study of Brazilian Gasoline Quality Using Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (H NMR) Spectroscopy and Chemometrics”. *Energy & Fuels*, **23**: 272-279, 2009.

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G. “Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by <sup>1</sup>H NMR”. *Fuel* (Guildford), 88: 691-696, 2009.

NEVES, B.G.; PIERRO, V.S.S.; MAIA, L.C. “Percepções e atitudes de responsáveis por crianças frente ao uso de medicamentos infantis e sua relação com cárie e erosão dentária”. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*. P. 1295 – 1300, 2006.

NIKOLOV, Z.L.; MEAGHER, M.M.; REILLY, P.J. “High-performance liquid-chromatography of disaccharides on amine-bonded silica columns”. *Journal of Chromatography* 319: 51, 1985.

NOGUEIRA, L. C.; SILVA, F.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. TRUGO, L.C. “Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection”. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2005) 207–210.

PAULI, G.F.; JAKI, B.U., LANKIN, D.C. “Quantitative <sup>1</sup>H NMR: development and potential of a method for natural products analysis”, *Journal of Natural Products* 68: 133-149, 2005.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. *Introdução à espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: LTC, 2010.

RAJAKYLA, E. “Use of reversed-phase chromatography in carbohydrate analysis”. *Journal of Chromatography*, 353: 1-12, 1986.

REKOLA M. “In vivo acid production from medicines in syrup form”. *Caries Research* 23:412-416, 1989.

SCHNEIDER, B. “Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy i in biosynthetic studies”. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **51**: 155-198, 2007.

SILVA, S.M.B.; SANTOS, C.F. “Medicamentos pediátricos e risco de cárie - uma revisão”. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, 2: 15-21, 1994.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. “Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais em mel”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(3) 337-341, 2003.

WELJIE, A. M., NEWTON, J.; JIRIK, F. R.; VOGEL, H. J. “Evaluating low-intensity unknown signals in quantitative proton NMR mixture analysis”, *Analytical Chemistry*, 80: 8956-8965, 2008.

WINDIG, W.; ANTALEK, B.; LIPPERT, J. L.; BATONNEAU, Y.; BREMARD, C.  
“Combined use of conventional and second-derivative data in the SIMPLISMA self-modeling  
mixture analysis approach”, *Analytical Chemistry*, 74: 1371–1379, 2002.