



APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE

APPLICATION OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE IN THE QUALITATIVE ANALYSIS OF
AMOXICILIN OUTSIDE THE SHELF LIFE

Alberto de Andrade Reis Mota¹, David Bruno Lima de Oliveira²

e331237

<https://doi.org/10.47820/recima21.v3i3.1237>

PUBLICADO: 03/2022

RESUMO

Este estudo apresenta uma análise qualitativa do medicamento Amoxicilina suspensão 250mg/ 5ml, utilizando o método de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Foram comparados os sinais de ¹H-RMN e ¹³C-RMN de um padrão de amoxicilina com medicamentos vencidos (3 anos) e no prazo de validade, sendo observadas mudanças dos sinais referentes à molécula de amoxicilina. Os medicamentos não sofreram nenhum tratamento prévio para análise, sendo apenas dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO-d6) para a realização dos experimentos e foram realizados com os mesmos parâmetros de ajuste do equipamento. Para comparação dos sinais foi realizada a sobreposição dos espectros, não sendo observada ausência de nenhum dos sinais referentes ao fármaco. A utilização de comparação dos sinais mostrou-se bastante intuitiva e de fácil interpretação e não foram observadas diferenças significativas nos sinais do fármaco em ambos os medicamentos, válido e vencido.

PALAVRAS-CHAVE: Amoxicilina. RMN. Prazo de validade

ABSTRACT

This study presents a qualitative analysis of the drug Amoxicillin suspension 250mg/ 5ml, using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method. The signs of ¹H-NMR and ¹³C-NMR of an amoxicillin pattern with expired drugs (3 years) and on shelf life were compared, and changes in signals referring to the amoxicillin molecule were observed. The drugs did not undergo any previous treatment for analysis and were only dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO-d6) for the experiments and were carried out with the same parameters of adjustment of the equipment. To compare the signs, the spectra were overlapped, and no absence of any of the signs related to the drug was observed. The use of comparison of the signs was very intuitive and easy to interpret and no significant differences were observed in the signs of the drug in both drugs, valid and expired.

KEYWORDS: Amoxicilline. NMR. Expiration date

1. INTRODUÇÃO

Antibióticos são metabólitos secundários produzidos por microrganismos ou por organismos específicos, que em quantidades pequenas são capazes de inibir o desenvolvimento de patógenos e, portanto, são usados no combate às infecções em seres humanos e animais (BELTER, 1985). Dos antibióticos produzidos por microrganismos, 66% são de actinomicetos, 22% de fungos e 12% de outras bactérias. Dentre os actinomicetos, 80% são obtidos a partir do gênero *Streptomyces* (KIESER *et al.*, 2000).

¹ Doutor em Química - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - Gama- DF

² Graduado em Farmácia - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - Gama- DF



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

A história das penicilinas se iniciou com Alexander Fleming em 1928, ao notar em um de seus experimentos com cultura de bactérias, que havia ficado exposta ao ar durante semanas, uma contaminação por fungos. Em seu experimento observou-se que certa área da colônia de bactérias ao redor da colônia de fungos estava morrendo. Fleming concluiu que a colônia de fungos estava produzindo algum agente antibacteriano que estava se espalhando ao redor da colônia com o objetivo de se proteger. Posteriormente, Fleming identificou a colônia como sendo uma espécie rara de *Penicillium* (PATRICK, 2001).

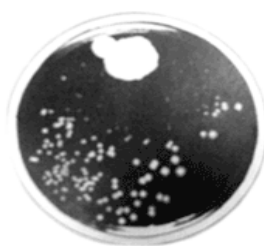


Figura 1. Placa de cultura na qual Alexander Fleming descobriu a colônia de fungo *penicillium*. Destaque para o Halo de inibição causado por esta colônia. Fonte: *Lactam Antibiotics. The background to their use as therapeutic agents* by Prof. M. H. Richmond. *Department of Bacteriology - University of Bristol, University Walk. Bristol, England.*

Esse composto revolucionou o tratamento de uma grande variedade de infecções, dentre elas, a febre escarlate, a pneumonia, a gonorreia e sérias infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, as quais, até então, não possuíam tratamento. Após muita investigação, observou-se que havia muitos derivados naturais da penicilina que eram letais a uma grande variedade de bactérias Gram-positivas, contudo, certas classes de bactérias Gram-positivas eram resistentes ao efeito das penicilinas e estas apresentavam baixa atividade contra bactérias Gram-negativas. Existem diversos análogos da penicilina onde a diferença reside na cadeia lateral ligada ao anel β -lactâmico (DEMAINE ELANDER, 1999).

Devido a estas substâncias serem derivadas de sistemas biológicos, torna-se importante se estudar a estabilidade das moléculas responsáveis pelos efeitos terapêuticos desejados nos diferentes medicamentos, podendo existir nestas moléculas sítios reativos ou interações intra e intermoleculares fracas, causando por exemplo uma instabilidade a condições adversas de temperatura, luminosidade, armazenamento, entre outros. Desta maneira, a estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia exigidas para o registro sanitário de produtos farmacêuticos. A determinação deste parâmetro fundamenta-se não apenas no cumprimento de exigências legais, mas, também, na preocupação com a saúde pública, uma vez que a instabilidade pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do consumidor aos efeitos tóxicos de produtos de degradação. Para tal, a necessidade de um controle de qualidade seguro e confiável em produtos e/ou matérias-primas provenientes das indústrias farmacêuticas torna as análises de seus ativos e constituintes extremamente importantes para os fabricantes, bem como para os usuários desses produtos.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

As indústrias farmacêuticas e os órgãos governamentais têm procurado cada vez mais garantir a qualidade dos medicamentos comercializados no país. Devido a isso, há uma demanda crescente por métodos de controle de qualidade que, além de serem seguros e confiáveis, sejam simples, rápidos, de baixo custo, com o mínimo de resíduo químico e que possam ser aplicados a muitos princípios ativos e excipientes, sejam eles na matéria-prima ou nos produtos finais (medicamentos) (SANTOS; CARVALHO; PINA, 2011).

As técnicas mais empregadas para análises de fármacos são as cromatográficas acopladas a diversos detectores e as espectroscópicas, como as espectroscopias na região do ultravioleta visível (UV-Vis), na região do infravermelho médio (FTIR), infravermelho próximo (NIR), espectroscopia RAMAN e espectroscopia de Massas (MS). (KOLOMIETS *et al.*, 2008, CUNHA; ESTRELA, 2021) Apesar de muito eficientes, estes métodos apresentam algumas desvantagens como: alta demanda de tempo para aquisição de análises, grande gasto de solventes e reagentes para preparo da amostra e execução dos experimentos. Comparado a estes métodos a ressonância magnética nuclear pode ser bastante eficiente. Para uma análise quantitativa, utiliza-se apenas uma pequena quantidade de solvente e um tempo muito menor que outros métodos de análise.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é uma das técnicas mais importantes de análise qualitativa de compostos orgânico. A análise por esta técnica é atualmente suportada por uma enorme quantidade de sequências de pulso, sendo adquiridos espectros em 1 e 2 dimensões com uma vasta quantidade de informações, porém ainda é uma técnica pouco usada para fins qualitativos na indústria farmacêutica brasileira, sendo encontrados poucos estudos qualitativos por RMN validados na literatura e, considerando-se o desenvolvimento de novos métodos qualitativos, sua validação se torna indispensável (CANTARELLI; PELLERANO; MARCHEVSKY; CAMIÑA, 2011; MONAKHOVA *et al.*, 2018).

Existe um grande interesse na indústria farmacêutica em descobrir novos métodos de análise, mais eficientes e mais baratos. Apesar dos gastos que uma indústria poderia ter inicialmente com a aquisição de um aparelho de RMN, este custo logo poderia ser recuperado com um menor gasto com reagentes e tempo de análise. Desta maneira este trabalho tem como objetivo utilizar a RMN na análise qualitativa da amoxicilina em suspensão, sendo comparado lotes de um único fabricante, evitando assim possíveis variações de formulação, sendo nesta análise identificados os sinais referentes ao fármaco, através da comparação com um padrão e observar se houve alteração destes sinais em um medicamento expirado há três anos. Principalmente o desaparecimento de sinais na molécula podem indicar ocorrência de mudanças estruturais do fármaco após sua data de validade.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

A amoxicilina, um ácido estável, é uma droga semi-sintética pertencente a classe das penicilinas (antibióticos β -lactâmicos). Esta é uma aminopenicilina que se difere por conter hidroxila na cadeia lateral fenil (KAUR; RAO; NANDA, 2011).

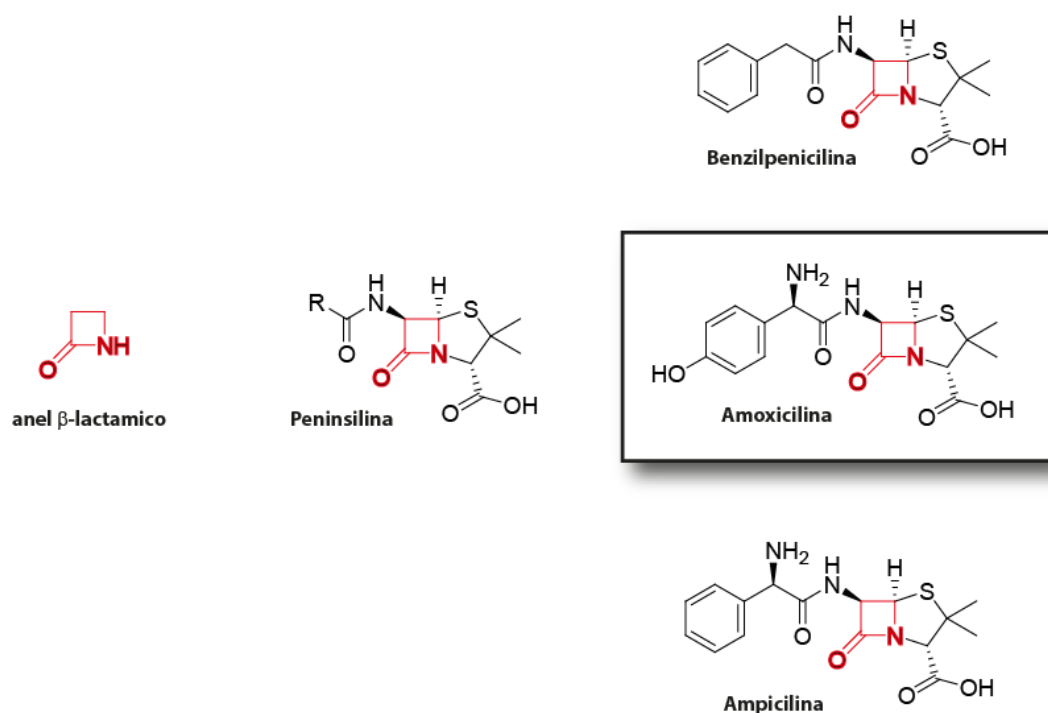


Figura 1. Estrutura do anel beta-lactâmico e antibióticos que contêm este anel em sua estrutura, em destaque Amoxicilina. **Fonte:** Próprio Autor.

Em 1972 a amoxicilina foi introduzida no Reino Unido para uso oral, mantendo atividade de amplo-espectro da ampicilina, mas com biodisponibilidade aumentada (Subhas, 2010; WHO, 2004). Em 1981, SmithKline Beecham patenteou a amoxicilina e a inseriu no mercado em 1998, com os outros nomes amoxil e trimox (GARAU, 2005). O antibiótico atua como um antibacteriano de amplo espectro utilizado no tratamento de infecções (KAUR; RAO; NANDA, 2011).

A forma das bactérias pode ser observada através de coloração de Gram que divide as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas, aproximadamente iguais em número e importância. A reação das bactérias à técnica de Gram expressa diferentes características, de modo especial no que diz respeito à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (BURNETT; SCHUSTER, 1982; NISENGARD; NEWMAN, 1994).

O método de Gram é utilizado na maioria das infecções bacterianas, permitindo o diagnóstico presuntivo com bastante segurança. A parede celular dos microrganismos gram-



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

positivos é uma estrutura relativamente simples. A parede celular dos microrganismos gram-negativos é muito mais complexa. A dificuldade em penetrar nesta camada complexa é a razão pela qual alguns antibióticos são menos ativos contra as bactérias gram-negativas.

Segundo Freitas *et al.* (1997), como fatores de ataque ou agressão, as células Gram-positivas e Gram-negativas caracterizam-se por graus diferentes de virulência. As bactérias Gram-negativas são constituídas por uma endotoxina, o LPS, que lhes confere a propriedade de patogenicidade, enquanto nas bactérias Gram-positivas a exotoxina, composta pelo ácido lipoteicoico, tem como característica principal a aderência.

A amoxicilina apresenta maior efetividade no tratamento contra microrganismos gram positivos do que negativos. Ela tem sido usada no tratamento de otite média, tonsilites, pneumonia, infecção do trato urinário, infecção cutânea, gonorréia e endocardite bacteriana (EL-SOUD; AL-TARAZI; AL-BATAINEH, 2004).

Entre as abordagens enzimáticas, a rota controlada cineticamente apresenta viabilidade na síntese de antibióticos derivados de α - aminoácidos (YOUSKO *et al.*, 2000), utilizando um doador de cadeia lateral (éster ou amida) e o núcleo de penicilina, ácido 6-aminopenililânico (6-APA). Na síntese enzimática de amoxicilina por éster metílico hidroxifenilglicina (HPGM) e 6-APA, a penicilina G acilase (PGA) catalisa a síntese do antibiótico por acoplamento (BEZERRA; CHIAVONE-FILHO; MATTEDI, 2013).

Ao se utilizar a amoxicilina está é bem absorvida no trato gastrointestinal. Seu volume aproximado de distribuição é de 0.26-0.31 L/Kg para fígado, pulmões, próstata, músculo, bile, líquido ascítico, pleural, sinovial, ocular, amniótico. A droga apresenta porcentagem de ligação a proteínas do plasma entre 17-20% (AMIN; EL-ANSARY; ISSA, 1994). Sua excreção é predominantemente renal (KAUR; RAO; NANDA, 2011).

Os antibióticos disponíveis no mercado hoje perdem sua eficácia após o período de validade (SRIDHARAN *et al.*, 2012). Sendo perigoso não apenas a administração dessas substâncias devido à perda de sua integridade química, mas também devido sua possibilidade de promover resistência microbiana. Além de sofrer alterações estruturais, muitos destes antibióticos são revestidos para assegurar que a medicação resista ao trato digestivo e seja liberada no local pré-definido. Se o revestimento é comprometido, o antibiótico pode ser liberado previamente no sangue e causar complicações intestinais como diarreia. As drogas também podem perder sua potência quando expostas ao oxigênio, calor, luz ou umidade. (KIRON; SHIRWAIKAR; SARITHA, 2011).

A preocupação que a expiração pode subestimar a real vida de prateleira das drogas tem sido questionada (WOODS, 2005). A Associação Médica Americana (AMA) tem revisado os processos que determinam a seleção de datas de expiração dos fármacos, assim como suas consequências clínicas e fiscais (AMA, 2001). A AMA concluiu que a verdadeira vida de prateleira de alguns produtos é maior do que o período de expiração rotulado. Pequenos estudos têm



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

abordado estabilidade a longo prazo de drogas (REGENTHAL, 2002) e substâncias medicamentosas. (LYON *et al.*, 2006).

2.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) define o padrão para solucionar a estrutura de moléculas aquosas e orgânicas solúveis. A técnica gera informação sobre: alteração química; interação dipolar, nuclear, spin-spin; e de parâmetros de relaxamento (WUTHRICH, 1995). Essas informações podem ser exploradas para elucidação e compreensão de conformações moleculares, de reações cinéticas e mecanismos. Sendo desta maneira uma técnica eficiente no estudo de mudanças estruturais de substâncias devido às condições em que está se encontra (MCGILL, 2012).

Desde o desenvolvimento da RMN de alta resolução na década de 50, o espectro de RMN tem sido a principal ferramenta de estudo de produtos isolados de plantas, bactérias, por exemplo. Em meados de 1980 a introdução de magnetos supercondutores combinado a técnicas sofisticadas de pulso e a transformação de Fourier, foi utilizada para determinar a estrutura tridimensional de moléculas grandes em solução (MUTHRCH, 1995).

Substâncias orgânicas são compostas basicamente por hidrogênio (H), carbono (C), fósforo (F), nitrogênio (N) e oxigênio (O). Estes elementos temmais de um núcleo isotópico, sendo que pelo menos um deles pode ser detectado através da RMN. Sendo necessária apenas a utilização de diferentes canais em uma mesma sonda para realizar a análise sequencial destes elementos. O experimento por RMN promove observação direta dos possíveis átomos contidos no analito. Os sinais gerados são uma mensuração de taxa molar, independente do peso molecular (CONALGO; MARCONCINI, 2015).

Uma desvantagem da espectroscopia por RMN é a baixa sensibilidade comparada a outras técnicas como cromatografia líquida e gasosa (MCGILL, 2012). A pesar da falta de sensibilidade e alto custo de aquisição e manutenção, a espectroscopia é vantajosa por ser uma técnica que mantém a integridade da amostra, e também utiliza quantidades mínimas de solvente, o que pode gerar uma economia que supera os gastos de manutenção do aparelho (CHATHAM; BLACKBAND, 2001).

3. MÉTODO

Para o experimento em todos os espectros retirados durante a pesquisa, o espectrômetro utilizado foi um BrukerAvance14.10 T (600 MHz). Não foi feita durante a análise o controle da temperatura destas amostras, sendo feitas à temperatura ambiente. Para a análise foram utilizados tubos de RMN de 5mm.

A Ressonância Magnética Nuclear como todas as formas de espectroscopia, tem como base a interação da radiação eletromagnética com a matéria.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

3.1 Escolha do solvente a ser utilizado

O primeiro passo a ser feito com o recebimento do padrão, foi a escolha do solvente em que este se comportava melhor, ou seja, o solvente em que a substância amoxicilina melhor se dissolvesse. Os solventes escolhidos para o teste de solubilidade foram os dois solventes de uso mais comum para as análises de RMN.

O primeiro foi o DMSO-d₆ (dimetilsulfóxido), a molécula constituinte desta substância possui seis átomos de deutério ligados a um sulfóxido, estando todos em uma mesma região do espectro, pois estão todos em regiões moleculares equivalentes, no espectro de RMN¹H. Observa-se um quinteto na região de 2,49ppm.

O segundo solvente que também participou da escolha foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃), esta molécula apresenta apenas um deutério ligado ao carbono, em 7,26 ppm em RMN ¹H.

É bom lembrar que estes picos que aparecem no espectro de RMN do solvente utilizado são devido a presença de hidrogênios residuais nestes reagentes. Em ambos os solventes a substância referência utilizada para ajustar o “zero” na escala foi o tetrametilsilano (TMS), esta substância é comumente utilizada devido a sua alta densidade eletrônica nos átomos de carbono e hidrogênio.

Em ambos os solventes, houve a dissolução da amoxicilina, porém em DMSO-d₆, esta dissolução apresentou-se mais rápida e eficiente, sem a necessidade de muita agitação, ao contrário do clorofórmio que houve um baixo coeficiente de solubilidade. Por este motivo, foi escolhido para a análise o DMSO-d₆ como solvente.

Não foram realizados, desta maneira nenhum experimento de RMN utilizando o CDCl₃, já que os solventes utilizados para o teste não foram os deuterados devido ao seu alto custo.

3.2 Tratamento da amostra

As análises foram realizadas sem o tratamento prévio da amostra, não sendo desta maneira realizado nenhum processo prévio de extração do fármaco do medicamento.

3.3. Análise do espectro

Foram realizados experimentos de ¹H e ¹³C, sendo estes núcleos sintonizados de acordo com o solvente escolhido e o ajuste do aparelho realizado já com o medicamento e o padrão em solução.

O padrão de amoxicilina foi utilizado como referência para comparação dos sinais do fármaco no medicamento analisado, sendo a molécula inicialmente caracterizada para posterior comparação.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Foram comparados os sinais do fármaco que não suprimidos pelos sinais dos excipientes utilizados no medicamento.

Atribuiu-se os sinais aos hidrogênios que não foram supridos pelos excipientes do medicamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando os experimentos de ^1H e ^{13}C . Figura 3 e 4, do padrão, podemos observar que todos os sinais da molécula de amoxicilina podem ser caracterizados, não havendo nenhum outro sinal no espectro referente a impurezas. As integrais dos sinais no espectro de hidrogênio e o número de carbono também confirmam que a substância padrão é formada apenas pela molécula de amoxicilina, não havendo dúvidas, desta maneira, com relação a qualidade do padrão analisado.

Amoxicilina Padrão ^1H -RMN

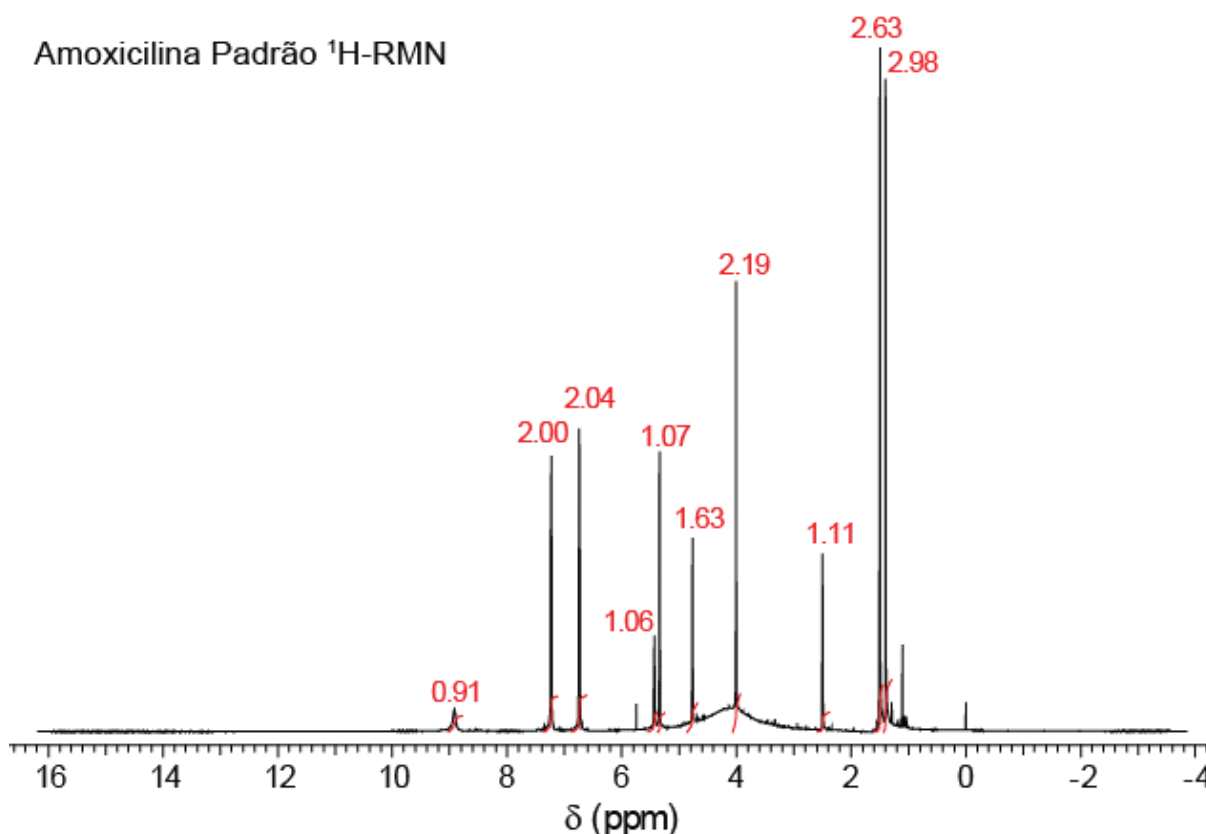


Figura 3. Espectro de ^1H -RMN do padrão de amoxicilina. Os valores destacados correspondem as integrais dos sinais observados. Fonte: Próprio Autor.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Amoxicilina Padrão ^{13}C -RMN

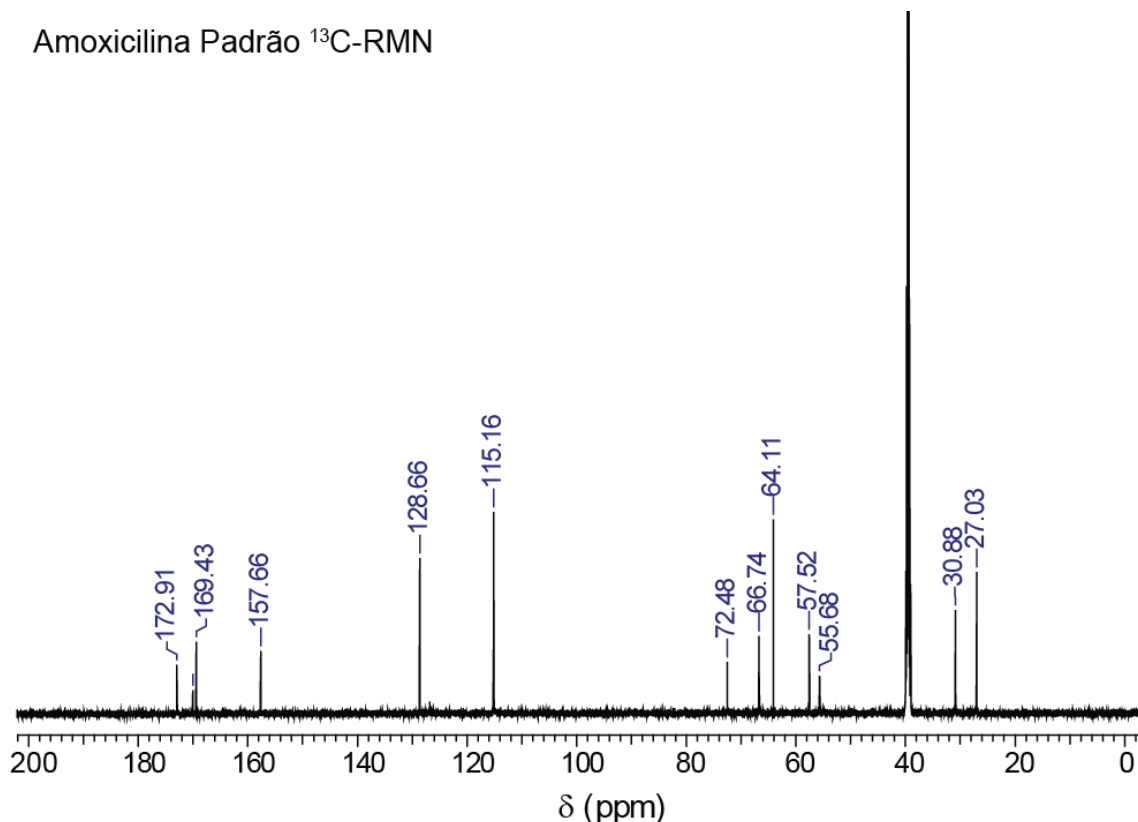


Figura 4. Espectro de ^{13}C -RMN do padrão de amoxicilina. Os valores destacados correspondem aos deslocamentos dos sinais. Fonte: Próprio Autor.

Os espectros dos medicamentos vencidos e no prazo de validade podem ser observados nas (**Figuras 5 e 6**) respectivamente. A similaridade dos espectros de ^1H pode ser claramente visualizada, com apenas poucos sinais dos prótons da amoxicilina em regiões que sofram alterações dos excipientes do medicamento. Os excipientes deste medicamento podem ser observados, principalmente nas regiões compreendidas entre 3,06 e 5,37ppm destacada em rosa nas figuras.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

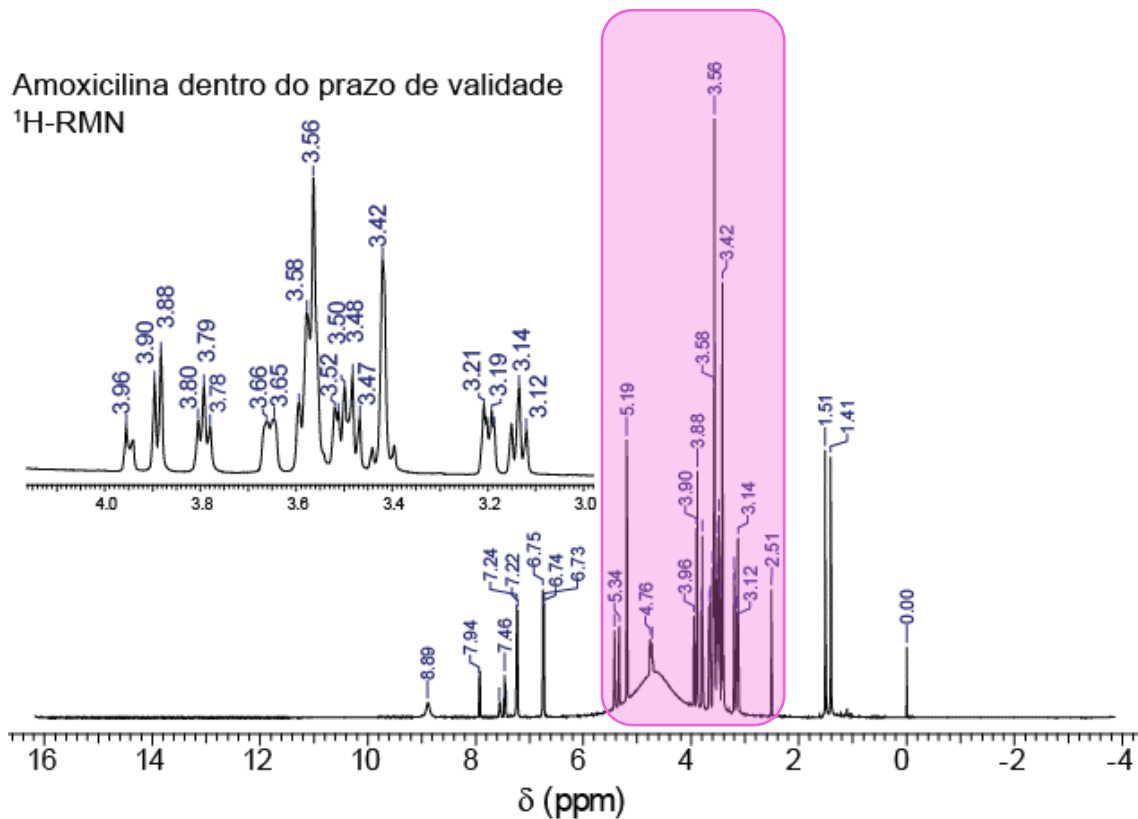


Figura 5. Espectro de ^1H -RMN do medicamento contendo amoxicilina dentro do prazo de validade. A região entre 4,0 e 3,0 ppm é destacada. Os valores observados nos sinais correspondem aos seus respectivos deslocamentos. **Fonte:** Próprio Autor.

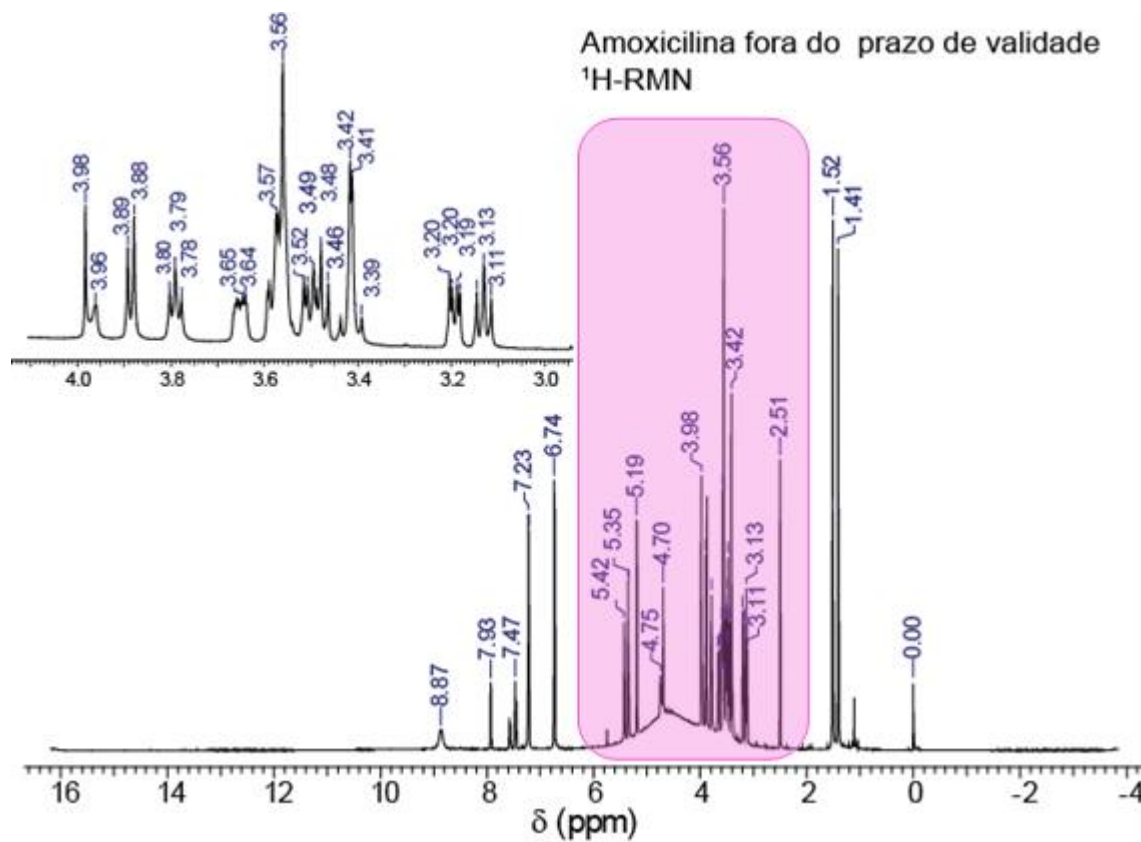


Figura 6. Espectro de ^1H -RMN do medicamento contendo amoxicilina fora do prazo de validade. A região entre 4,0 e 3,0 ppm é destacada no espectro, os valores acima dos sinais correspondem aos seus respectivos deslocamentos. **Fonte:** Próprio Autor.

A análise dos espectros de ^{13}C , **Figura 7 e 8**, torna-se um pouco mais complexa, devido a um maior número de sinais referentes aos excipientes presentes no medicamento. Sendo necessário maiores cuidados na análise dos sinais destes espectros.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Amoxicilina dentro do prazo de validade
¹³C-RMN

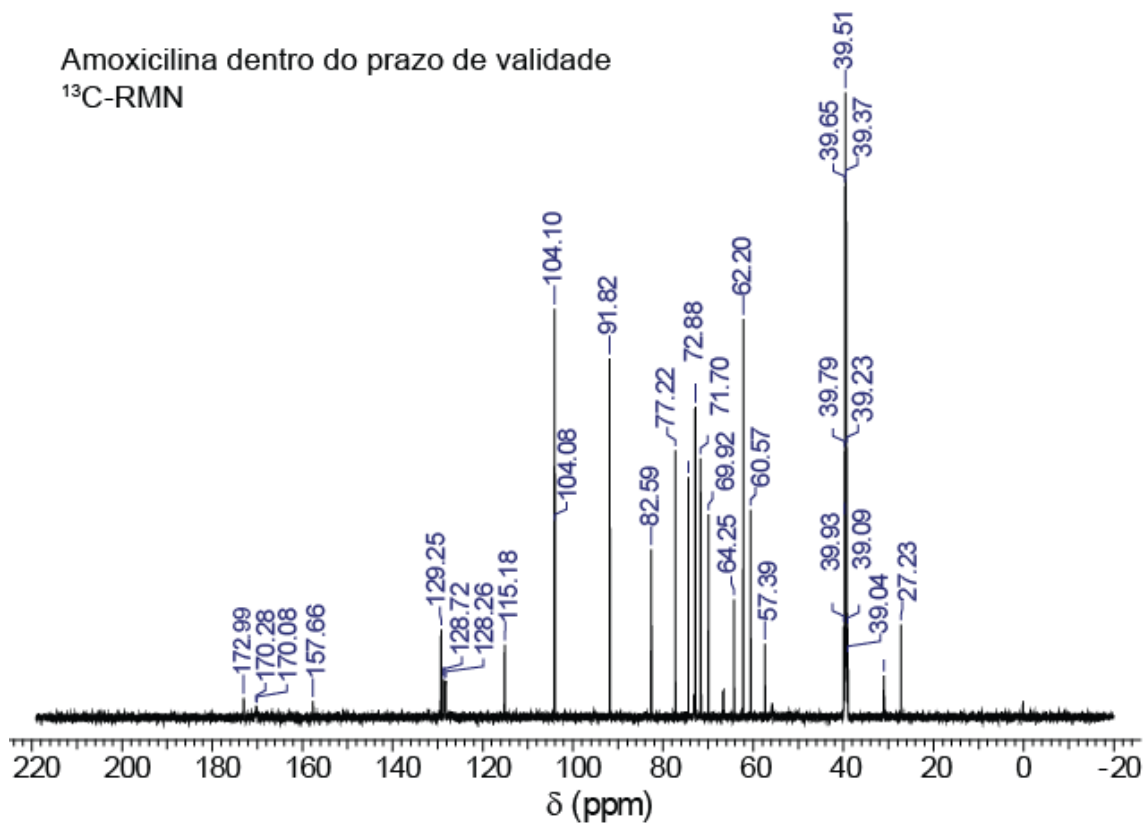


Figura 7. Espectro de ¹³C-RMN do medicamento contendo amoxicilina dentro do prazo de validade. Os deslocamentos químicos são mostrados acima dos sinais. **Fonte:** Próprio Autor.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Amoxicilina fora do prazo de validade
 ^{13}C -RMN

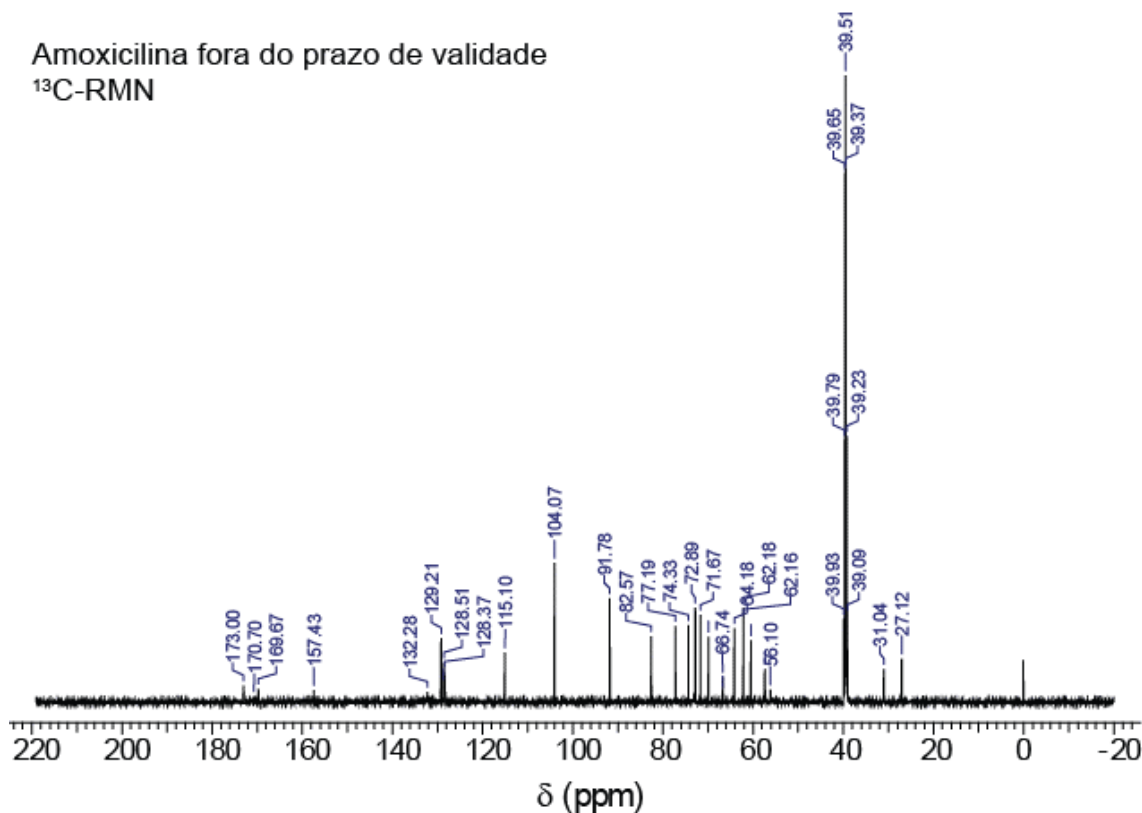


Figura 8. Espectro de ^{13}C -RMN do medicamento contendo amoxicilina fora do prazo de validade. Os deslocamentos químicos são mostrados acima dos sinais. **Fonte:** Próprio Autor.

Para uma melhor comparação, os três espectros de ^1H (padrão, medicamento vencido e dentro do prazo de validade) foram superpostos (Figura 9, 10 e 11), facilitando desta maneira a visualização dos sinais referentes a amoxicilina.

Não deve ser levada em consideração a relação entre a intensidade dos sinais destes espectros, uma vez que a proposta do trabalho não foi a análise quantitativa, desta maneira não se pode concluir nada a respeito da concentração destes fármacos no medicamento analisado, o que também justifica os métodos de tratamento utilizados do medicamento para a posterior análise por RMN.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

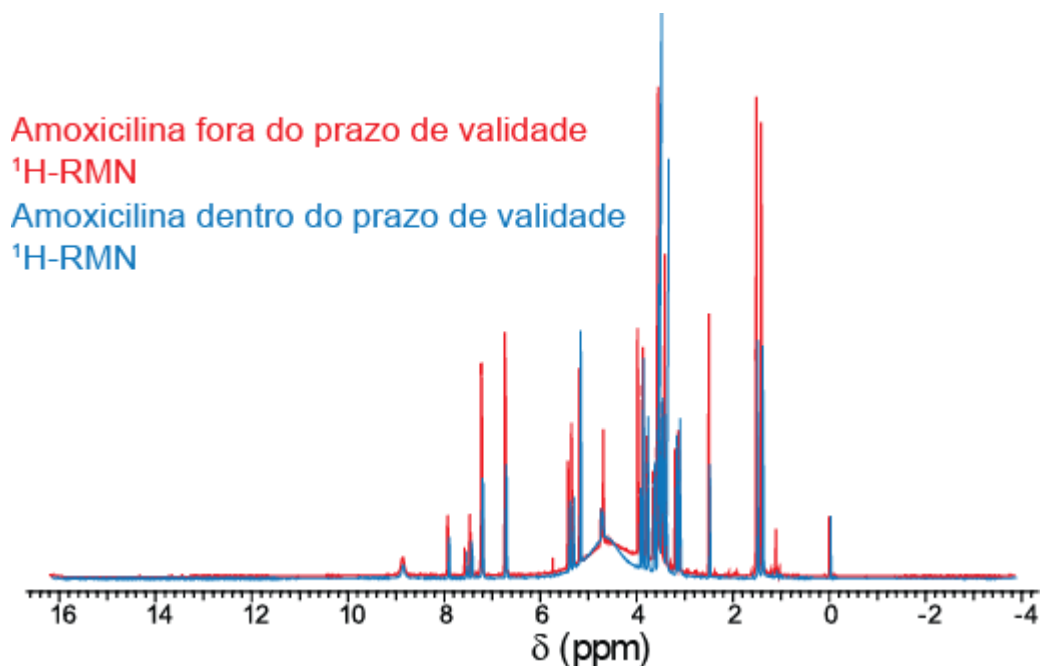


Figura 09. Sobreposição dos sinais do espectro de ¹H-RMN de amoxicilina dentro do prazo de validade (espectro em azul) e fora do prazo de validade (espectro em vermelho). **Fonte:** Próprio Autor.

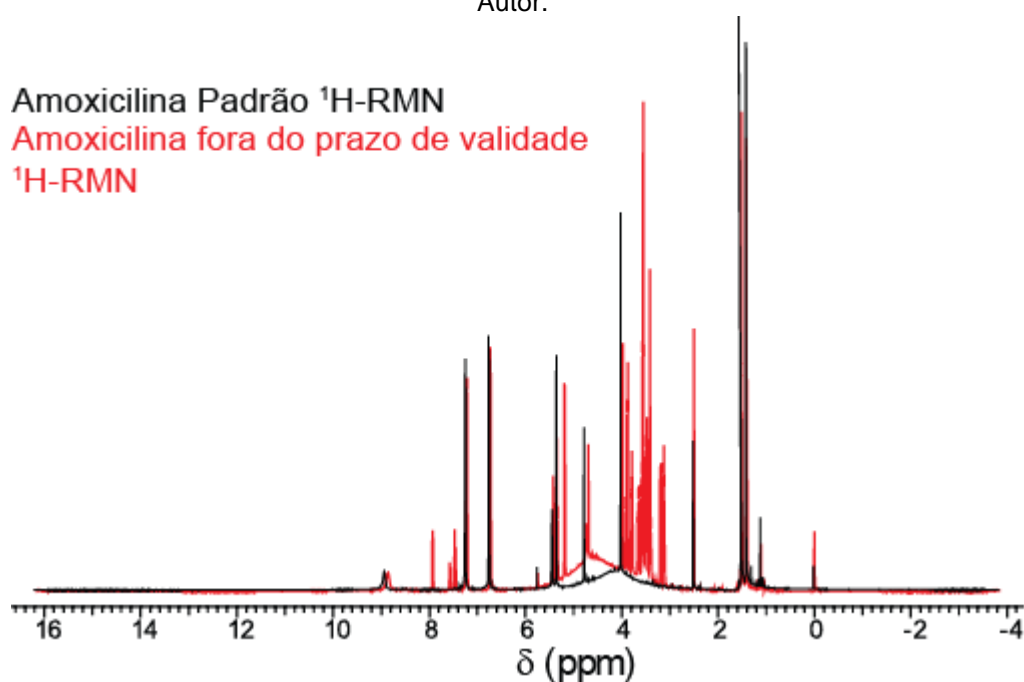


Figura 10. Sobreposição dos sinais de ¹H-RMN de amoxicilina padrão (espectro em preto) e do medicamento fora do prazo de validade (espectro em vermelho). **Fonte:** Próprio Autor.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Amoxicilina Padrão ^1H -RMN
Amoxicilina dentro do prazo de validade
 ^1H -RMN

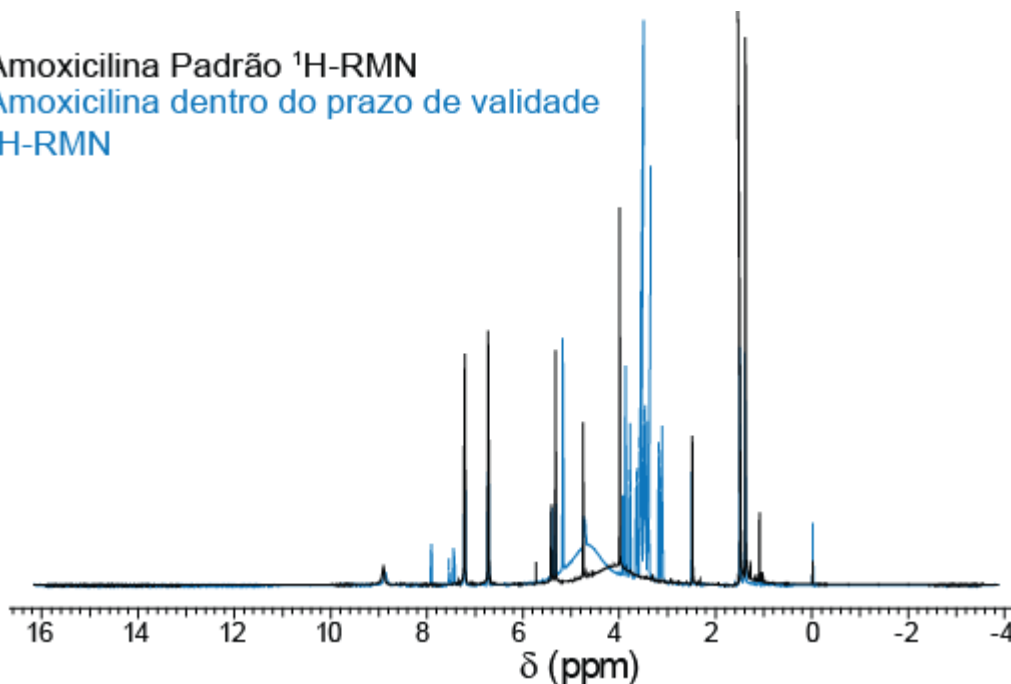


Figura 11. Sobreposição dos sinais de ^1H -RMN de amoxicilina padrão (espectro em preto) e do medicamento dentro do prazo de validade (espectro em azul). **Fonte:** Próprio Autor.

Os espectros de ^{13}C do padrão amoxicilina, do medicamento vencido e dentro do prazo de validade também foram superpostos (Figura 12, 13 e 14), facilitando a identificação dos sinais correspondente aos excipientes nestes espectros.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Amoxicilina fora do prazo de validade

^{13}C -RMN

Amoxicilina dentro do prazo de validade

^{13}C -RMN

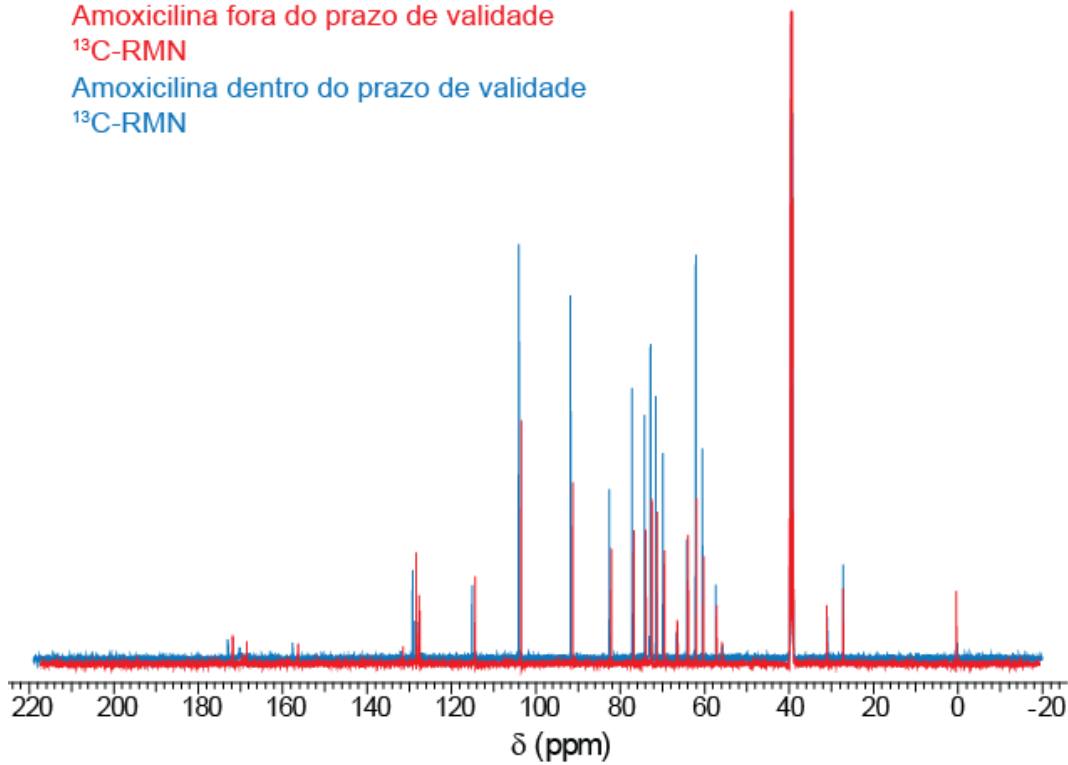


Figura 2. Sobreposição dos sinais de ^{13}C -RMN de amoxicilina padrão (espectro em preto) e do medicamento dentro do prazo de validade (espectro em azul). **Fonte:** Próprio Autor.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Amoxicilina Padrão ^{13}C -RMN
Amoxicilina fora do prazo de validade
 ^{13}C -RMN

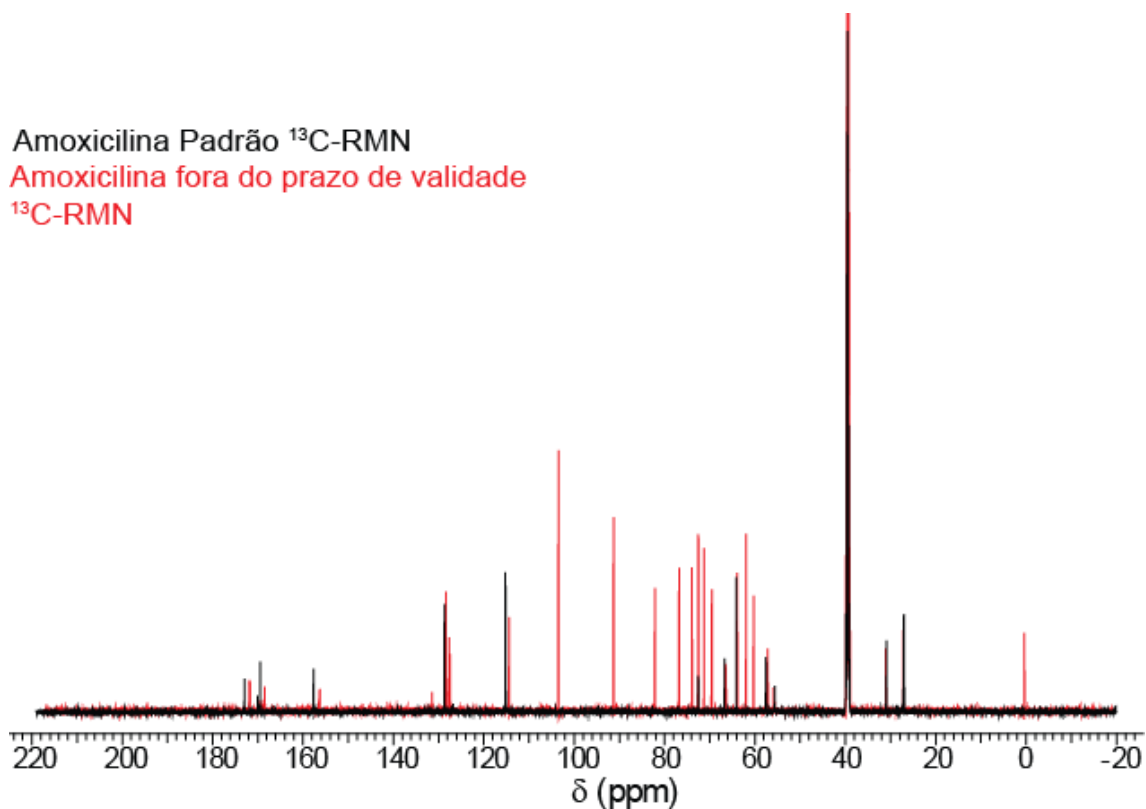


Figura 3. Sobreposição dos sinais de ^{13}C –RMN de amoxicilina padrão (espectro em preto) e do medicamento fora do prazo de validade (espectro em vermelho). **Fonte:** Próprio Autor.

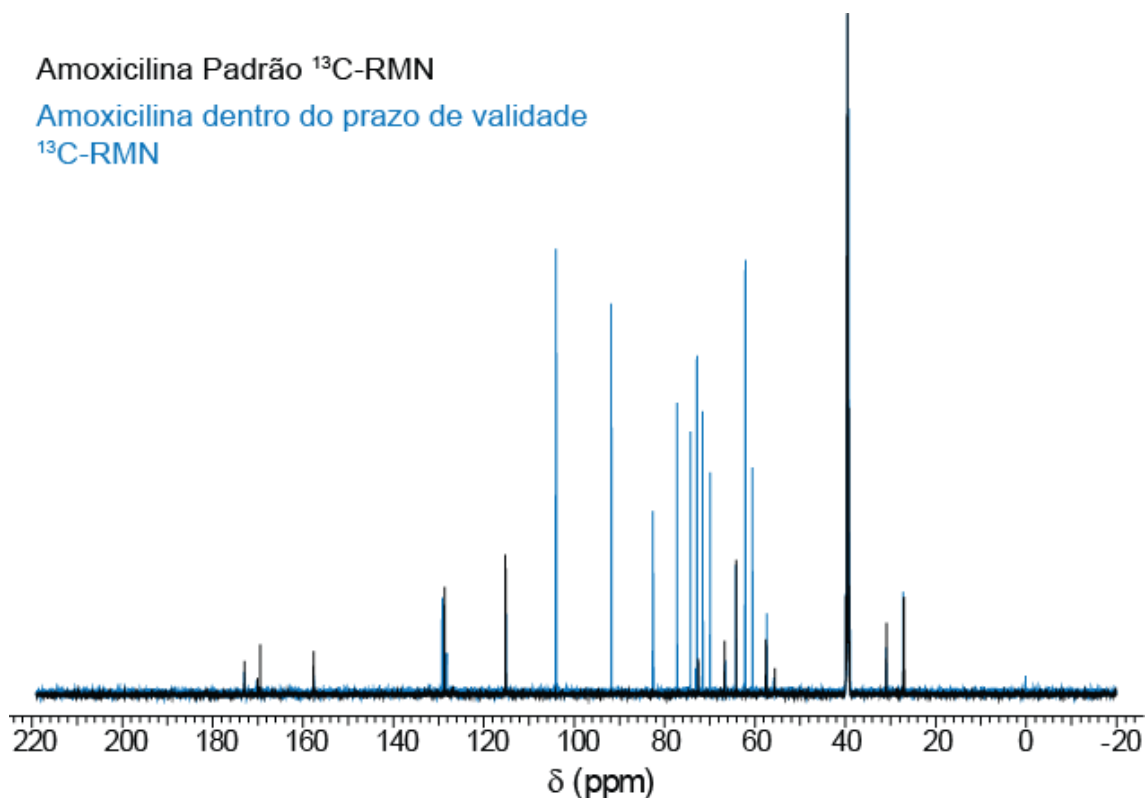


Figura 144. Sobreposição dos sinais de ^{13}C -RMN de amoxicilina padrão (espectro em preto) e do medicamento dentro do prazo de validade (espectro em azul). **Fonte:** Próprio Autor.

Para uma melhor análise comparativa dos deslocamentos dos hidrogênios e carbonos desta molécula, foram construídas tabelas, apresentando todos os sinais observados no espectro (Tabela 01).



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
 AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
 Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Tabela 1 Análise de ^1H do deslocamento (ppm) nas amostras do medicamento amoxicilina padrão, dentro do prazo de validade e fora do prazo de validade.

Análise ^1H	Amoxicilina padrão	Medicamento fora do prazo de validade	Medicamento dentro do prazo de validade
	1,11 (t-butanol)	1,06	1,11
	1,40	1,36	1,41
	1,50	1,46	1,51
	2,50 (DMSO)	2,45 (DMSO)	2,51
	----	3,06	3,12
	----	3,08	3,14
	----	3,37	3,21
	----	3,51	3,42
Deslocamento (ppm)	4,01	3,93	3,96
	4,76	4,69	4,76
	5,34	5,29	5,34
	5,35	5,30	5,35
	5,43	5,37	5,42
	5,74 (Diclorometano)	5,69	----
	6,72	6,69	6,73
	7,23	7,18	7,22
	8,92	8,81	8,8

Fonte: Próprio Autor.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

Tabela 2. Análise de ^{13}C dos deslocamentos (ppm) nas amostras do medicamento amoxicilina padrão, dentro do prazo de validade e fora do prazo de validade.

Analise ^{13}C	Amoxicilina padrão	Medicamento fora do prazo de validade	Medicamento dentro do prazo de validade
Deslocamento (ppm)	27,03 (Solvente)	27,12	27,23
	30,88	31,04	30,98
	39,51 (DMSO)	39,51	39,51
	55,68	56,10	55,76
	57,52	57,40	57,39
	---	60,53	60,57
	---	62,16	62,20
	64,11	64,18	64,25
	66,74	66,74	66,65
	---	69,89	69,92
	---	71,67	71,70
	72,48	72,89	72,88
	---	74,33	74,37
	---	77,19	77,22
	---	82,57	82,59
	---	91,78	91,82
	---	104,07	104,10
	115,16	115,10	115,18
	128,66	128,37	128,26
	---	129,21	129,25
---	132,28	132,05	
157,66 (Diclorometano)	157,43	157,66	
169,43	169,67	170,08	
170,52	170,70	170,28	
173,37	173,00	172,99	

Fonte: Próprio Autor.

Os resultados experimentais encontrados se assemelham em partes à revisão bibliográfica, demonstrando que não houve diferenças significativas com alterações nas amostras analisadas de Amoxicilina suspensão 250mg /5ml, tanto em ^1H , como em ^{13}C . Assim concordando com objetivo da pesquisa de avaliar qualitativamente as características químicas relevantes como: degradações e subprodutos que poderiam prejudicar a potência e efetividade do medicamento analisado.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

A possibilidade de degradação da amostra de 3 anos após o prazo de validade mostrou-se compatível quando comparado com o padrão puro. Desta maneira, as observações realizadas através da RMN mostram que o medicamento não sofreu alteração em sua estrutura, sendo necessário a utilização de outros métodos qualitativos como cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (HPLC) para confirmar esta afirmação.

Através das tabelas pode-se também ser observados os seguintes comportamentos referentes aos sinais destas moléculas.

Para os deslocamentos de ^1H :

- Os sinais dos medicamentos vencidos apresentam um deslocamento para menores frequências quando comparados com os espectros obtidos nas amostras do medicamento dentro e fora do prazo de validade. Nada que possa afirmar a formação de subprodutos ou degradação nas amostras.
- Não há sinais na faixa de frequência entre 3,06 ppm a 3,46 ppm no padrão, Alguns sinais são observados nestas regiões para as amostras do medicamento dentro do prazo de validade e fora do prazo de validade, mostrando que, nessas regiões de sinais são detectados prováveis excipientes/ veículos contidos na formulação do medicamento, existindo uma similaridade entre o perfil destes sinais.
- Há no espectro da amoxicilina padrão um sinal em 5,74 ppm, este sinal ocorreu devido a presença do solvente diclorometano utilizado na lavagem do tudo de RMN.
- Todos os sinais referentes ao padrão de amoxicilina puderam ser observados nos medicamentos analisados, demonstrando que, o experimento utilizando RMN é muito eficiente nesse tipo de estudo.
- Houve uma grande similaridade entre os espectros do medicamento vencido e fora do prazo de validade, havendo apenas dois sinais no espectro do medicamento vencido,

Para os deslocamentos de ^{13}C :

- Na amostra da amoxicilina padrão comparadas aos deslocamentos do medicamento dentro e fora do prazo de validade, não houve diferenças significativas de sinais relativos ao experimento em RMN.
- Somente na amostra do medicamento dentro do prazo de validade foi possível observar sinais no campo entre 57,39 e 62,20 ppm, comparado ao medicamento dentro do prazo de validade. No entanto, houve uma similaridade entre o deslocamento 57,52 ppm na amostra padrão.
- Comparando os deslocamentos dos medicamentos vencido e padrão, foi possível observar momentos em que os sinais obtidos no experimento foram idênticos, tais como: 39,51 ppm. 39,93 ppm... 66,74 ppm... 115,10 ppm. Já comparado com a amostra dentro do prazo de validade constatou-se menor semelhança entre os deslocamentos,



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

salvo em alguns pontos específicos como: 39,51 ppm (DMSO) e 157,66 ppm (diclorometano).

- Se comparado, os deslocamentos do medicamento padrão, fora do prazo de validade e dentro do prazo de validade é possível observar único sinal semelhante as três amostras, na região de 39,51 ppm, correspondente ao solvente utilizado (DMSO).
- Nas regiões de deslocamento do medicamento dentro do prazo de validade e fora do prazo de validade, entre 74,33 ppm e 104,08 ppm foi observada uma similaridade de sinais, comparado com o padrão, onde o deslocamento não é visível no espectro. Demonstrando que nessa região possivelmente é encontrado os sinais dos excipientes/veículos nessa análise.

Outras observações além das análises espectrais puderam ser realizadas durante a execução dos experimentos. A dissolução das moléculas no DMSO apresentou diferenças de coloração do medicamento vencido e do medicamento dentro do prazo de validade, com o medicamento dentro do prazo apresentando uma coloração rosa mais intensa que o medicamento vencido (Figura 15). Provavelmente este fato pode ser atribuído a mudanças de formulações do medicamento ao longo do tempo, mesmo este pertencendo a uma mesma marca, excipientes como flavorizantes podem ser alterados para melhora de propriedades organolépticas dele.

Foi observado a presença de cristais de alguma substância presente no medicamento que não foi totalmente solubilizada pelo solvente.



Figura 15. Medicamento dentro do prazo de validade (esquerda) e medicamento fora do prazo de validade, demonstrando diferenças de coloração no momento da dissolução em DMSO. **Fonte:** Próprio Autor.

Um outro resultado encontrado durante a execução dos experimentos foi a fluorescência do medicamento quando solubilizado, na presença de uma radiação UV, através de uma “luz negra” (315 nm a 400nm). Esta fluorescência pode ocorrer devido a rigidez do anel β -lactâmico, uma vez que o padrão de amoxicilina em um mesmo solvente apresentou também fluorescência (Figura 17).



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

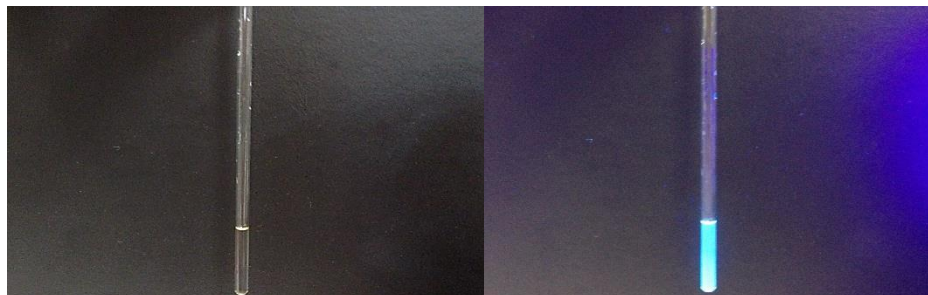


Figura 16. Amostra do padrão amoxicilina solubilizado em DMSO em contato com radiação UV. **Fonte:** Próprio Autor.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C mostram que não há ou que há diferenças significativas entre os sinais do medicamento vencido e no prazo. Sendo mostrado através desta técnica que o medicamento vencido não sofreu nenhuma alteração. É importante ressaltar que apenas uma técnica analítica não pode levar a uma confirmação da degradação do medicamento, devendo haver contraprova para confirmação.

GERAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

Os resultados evidenciaram que o medicamento analisado 3 anos após a data de validade estipulada pelo fabricante, não sofreu alterações aparentes em sua estrutura, tendo como base a não ocorrência de mudanças nas regiões onde os sinais da molécula de amoxicilina estão claros. Sendo assim, não houve o surgimento ou a alteração dos sinais da molécula que indiquem a ocorrência de mudanças estruturais no medicamento e os sinais do fármaco tanto no medicamento vencido, como no medicamento dentro do prazo de validade, mostraram-se compatíveis quando comparado com os sinais do padrão puro.

Estes resultados se assemelham à revisão bibliográfica, demonstrando não haver diferenças significativas com alterações nas amostras analisadas de Amoxicilina suspensão 250mg /5ml, tanto em ^1H , como em ^{13}C . Assim concordando com objetivo da pesquisa de avaliar qualitativamente as características químicas relevantes que poderiam prejudicar a potência e efetividade do medicamento analisado.

A RMN pode ser uma poderosa ferramenta para análises qualitativas de medicamentos, não sendo necessário, muitas vezes, o tratamento prévio da amostra, o que permite um processo mais rápido e eficiente na análise de fármacos em medicamentos.

Pesquisas do comportamento fotofísico da molécula de amoxicilina podem ser realizados, sendo investigados os efeitos solvatocrômicos nesta substância. Sua fluorescência também indica a possibilidade de utilização para aplicações de imageamento, podendo o comportamento da amoxicilina ser investigado IN VITRO através de técnicas de microscopia de fluorescência.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

REFERÊNCIAS

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Pharmaceutical Expiration Dates. *In: Report 1 of the Council on Scientific Affairs (A-01)*. July 25, 2001.

AMIN, A. S.; EL-ANSARY, A. L.; ISSA, Y. M. Colorimetric determination of amoxicillin in pure form and in pharmaceutical preparations. *Talanta*, v. 41, n. 5, p. 691-694, 1994.

BELTER, P. A. **Comprehensive Biotechnology**. New York: Pergamon Press, 1985. vol. 2, p. 473-480.

BEZERRA, I. M.; CHIAVONE-FILHO, O.; MATTEDI, S. Solid-liquid equilibrium data of amoxicillin and hydroxyphenylglycine in aqueous media. *Braz. J. Chem. Eng.*, São Paulo, v. 30, jan./mar. 2013.

BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 35, 2012.

BURNETT, G. W.; SCHUSTER, G. S. **Microbiologia Oral e Enfermidade infecciosas**. Buenos Aires: Panamericana, 1982. p. 31-70.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, J. M. Simultaneous determination of amoxicillin and diclofenac in pharmaceutical formulations using UV spectral data and the PLS chemometric method. *Anal Sci.*, v. 27, p. 73–78, 2011.

CHATHAM, J. C.; BLACKBAND S. J. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Imaging in Animal Research. *ILAR J.*, v. 42, n. 3, p. 189-208, 2001.

COLNAGO, L. A.; MARCONCINI, L. V. Princípios da Ressonância Magnética Nuclear e Aplicações em Frutas e Hortaliças. *In: VI Curso de Tecnologia Pós-Colheita em Frutas e Hortaliças Embrapa Instrumentação*, São Carlos, 2015.

CUNHA, E. K. A.; ESTRELA, M. A. A. método espectrofotométrico para doseamento da amoxicilina em suspensões orais. *RECIMA21 – Revista Científica Multidisciplinar*, v. 2, n. 11, p. e211951, dez. 2021

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P.; VAN LEEUWENHOEK, A. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 75, n. 1-2, p. 5-19, jan./feb. 1999

EL-SOUD, K. A.; AL-TARAZI, Y. H.; AL-BATAINEH, M. M. Comparative pharmacokinetics and bioavailability in chickens after intravenous, intramuscular and oral administration. *Veter Res Comm.*, v. 28, n. 7, p. 599-607, 2004.

FREITAS, S. K. B. *et al.* A multicommutated flow analysis method for the photometric determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations using a diazo coupling reaction. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 22, n. 2, feb. 2011.

GARAU, J. Role of β -lactam agents in the treatment of communityacquired pneumonia. *Eur J ClinMicrobiol Infect Diseases*, v. 24, p. 83–99, 2005.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.*, v. 62, n. 21, p. 7512–7515, 1997.

HENKEL, J. S. *et al.* Toxins from bacteria. *Exs.*, v. 100, p. 1-29, 2010.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
 AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
 Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. WAWER. K. I. Review NMR spectroscopy in pharmacy. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 17, p. 557–616, 1998.

HONG, Song; THERESA, S. C. Aminophenol-Induced Liver Toxicity: Tentative. Evidence of a Role for Acetaminophen. **J biochem molecular toxicology**, v. 15, n. 1, 2001.

KAUR, S. P.; RAO, R.; NANDA S. Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, Issue 3, 2011. ISSN 0975-1491.

KIESER, H. M. *et al.* **Practical Streptomyces Genetics**. England: The John Innes Foundation, 2000.

KIRON, S. S.; SHIRWAIKAR, A.; SARITHA, M. Influence of storage conditions on the potency of amoxicillin dispersible tablets stored in hospital and community pharmacies in different regions of Kerala. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, Issue 3, 2011.

KOLOMIETS, O. *et al.* Quantitative determination of pharmaceutical drug formulations by near-infrared spectroscopic imaging. **Appl Spectrosc.**, v. 62, n. 11, p. 1200-1208. 2008.

LYON, R. C. *et al.* Stability Profiles of Drug Products Extended beyond Labeled Expiration Dates. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 7, 2006.

MCGILL, N. W. **Application of Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Chemical Warfare Agents**. Australia: Commonwealth of Australia, 2012.

MONAKHOVA, Y. B.; HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. W. K. Current role and future perspectives of multivariate (chemometric) methods in NMR spectroscopic analysis of pharmaceutical products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 580–9, 2018.

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Oral Microbiology and Immunology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 477 p. 1994

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2nd ed. Oxford: University Press, 2001.

REGENTHAL, R. *et al.* The pharmacologic stability of 35- year old theophylline. **Hum Exp Toxicol**, v. 21, p. 343–346, 2002.

ROGGO, Y. *et al.* A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 44, n. 3, p. 683-700, 2007.

SANTOS, J. V.; BATISTA DE CARVALHO, L. A. E.; PINA, M. E. Development and validation of a RP-HPLC method for determination of zidovudine and its related substances in sustained release tablets. **Anal. Sci.**, v. 27, p. 283-289, 2011.

SHENDE, C.; SMITH, W.; BROUILLETTE, C.; FARQUHARSON, S. Drug Stability Analysis by Raman Spectroscopy. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 4, p. 651-662, 2014.

SONG, H.; CHEN, T. S. P-aminophenol-induced liver toxicity: tentative evidence for a role of acetaminophen. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 15, p. 34-40, 2001.

SRIDHARAN, T. B. *et al.* Study on Efficacy of Expired and Active Forms of Various Antibiotics on *Saccharomyces cerevisiae*. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2012.

SUBHAS, C. M. *et al.* Antibacterial activity of Coleus aromaticus leaves. **Inter J of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 2, n. 3, p. 63-66, 2010.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

APLICAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE QUALITATIVA DE
AMOXICILINA FORA DO PRAZO DE VALIDADE
Alberto de Andrade Reis Mota, David Bruno Lima de Oliveira

WOODS, M. Drugs may outlast label date. **Post-Gazette National Bureau**, 2005.

WUTHRICH, K. NMR -this other method for protein and nucleic acid structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 51, Pt 3, p. 249-270, 1995.

YOUSHKO, M. I. *et al.* Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in “aqueous solution – precipitate” systems. High substrate concentration and supersaturation effect. **Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic**, v. 10, p. 509-515, 2000.