

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

João Marcos Beraldo Candido

**Estudo da degradação forçada em meio alcalino do molnupiravir por Cromatografia
Eletrocinética Micelar Capilar**

Juiz de Fora

2023

João Marcos Beraldo Candido

**Estudo da degradação forçada em meio alcalino do molnupiravir por Cromatografia
Eletrocinética Micelar Capilar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Candido, João Marcos Beraldo.

Estudo da degradação forçada em meio alcalino do molnupiravir por Cromatografia Eletrocinética Micelar Capilar / João Marcos Beraldo Candido. -- 2023.

135 f. : il.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Molnupiravir. 2. NHC. 3. COVID-19. 4. Degradação forçada. 5. Cromatografia Eletrocinética Micelar. I. Oliveira, Marcone Augusto Leal de, orient. II. Título.

João Marcos Beraldo Candido

**Estudo da degradação forçada em meio alcalino do molnupiravir por Cromatografia
Eletrocinética Micelar Capilar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Analítica

Aprovado em 25 de setembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Lucas Mattos Duarte
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva
Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais, Maria da Conceição e João Batista, e avós, Maria Aparecida Carelli Candido e Jesus Candido. Vocês são minha fonte primária de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em suas infinitas formas, pelo dom da vida e saúde, e pela proteção concedida pela espiritualidade fraterna que me guia.

Agradeço aos meus pais, Conceição (Tica) e João Batista (Tupete) por serem meu porto seguro, pela educação, exemplo de vida, apoio incondicional, confiança, paciência, e pelo amor que une a nossa família. Vocês não mediram esforços para que eu sonhasse. Se eu cheguei até aqui, foi sobretudo, por causa de vocês. Sou muito feliz, e grato, por ter vocês dois como meus pais. E não é somente pelo laço sanguíneo, mas pela integridade de cada um. Quando eu crescer, acho que ainda quero ser muitos, mas também quero ser como vocês. Mãe, obrigado pelos seus conselhos por telefone, mesmo à distância, eles foram doses diárias de amor e sabedoria. Pai, obrigado pelo seu afeto, aquele que prefere mais fazer do que falar.

Ao meu irmão, Robson, a minha cunhada, Wesleyne, e meus amados sobrinhos, Arthur (Tutu) e Isadora (Isa). Sou muito grato por compartilhar essa conquista com vocês.

Aos meus avós Maria Aparecida Carelli Candido (Dona Aparecida) e Jesus Candido (Sr. Jesus) por serem o pilar da minha família.

A todos os meus familiares, tios e primos, pelo companheirismo em diversos momentos, em especial a Célia Mendes e Ana Paula (Tia Ana), minhas primas e amigas. Aos meus tios, Tia Cida, Tia Vicentina, José Maurício (Tiduí) e Gorette (Tia Gorette) pelo incentivo. Aos meus afilhados, e grandes amigos, Gabriela Santana e Denilson Junior, por todo apoio. Ao João Batista (Vinte Nove), por ser um amigo da minha família de longas datas.

A Mariz Aparecida de Paula (Fífica), *in memoriam*, por ter sido solícita e me ajudado no início da minha trajetória acadêmica, e estar presente comigo até hoje, onde quer que esteja. Sou grato a ela e a todos os seus familiares.

Ao meu grande amigo Washington Monteiro pelos conselhos, apoio e incentivo.

A Dona Geralda, *in memoriam*, pelas risadas e incentivo, onde quer que esteja sei que está torcendo por mim.

Aos meus amigos, que conheci em minha caminhada pela UFJF, amigos de graduação Letícia Sant'Anna, Jaqueline Celestino e Caroline Barroso, pelo companheirismo em nossos grupos de estudo. Pelas vivências compartilhadas com André Henrique, Carol Bárbara, Grazielle Conrado, e os anos de convivência com Gustavo Oliveira.

O mestrado foi mais leve em sua companhia, Luís Fernando Valias Silva, não somente por ser um grande amigo, nos momentos acadêmicos, mas por querer e se fazer presente fora

dos muros da Universidade, representando para mim um exemplo de grande homem, literalmente.

A minha amiga, não notada no início da graduação, Lectícia Sobreiro (Lec) e sua família, que eu amo tanto. Compartilhar deste momento com você, admirar sua inteligência e foco, me impulsionam. Sou grato pela mulher que é, e tem se tornado.

Aos amigos Yuri Souza, Josilene Oliveira, Karina Fernandes, Suéllen China, Luma Perobelli e Camille Carvalho por compartilharem inúmeros momentos em minha trajetória, procurando compreender minhas potencialidades e limitações no decorrer da vida adulta. Pela companhia nas refeições do RU, café da tarde, e conselhos.

Ao meu grande amigo/irmão, Daniel José de Paula. Torna-se seu amigo, ainda durante a graduação, tornou-nos melhores, nos lapidamos, e acredito que é isso que a gente deveria esperar de uma amizade. Obrigado por estar presente em minha vida, pessoal e profissional, trazendo sempre otimismo, desde a inscrição do processo seletivo, um surto, durante a pandemia, até a defesa do mestrado. Sem dúvidas, essa conexão de milhões não é desta única vida, mas de outras e para outras.

Agradeço a todos os meus amigos, desde o colégio, na Escola Estadual “Zequinha de Paula”, até a Universidade, vocês têm um lugar especial em minha vida. Não poderia esquecer do Prof. Heraldo Júnior (Juninho), por ter me apresentado ainda na Educação Básica a Química, enquanto Ciência. A Prof.^a Ângela (Giginha) pelas lições de vida durante o período escolar. A Prof.^a Cristina (Dona Cristina), *in memoriam*, por todo rigor e disciplina durante o Ensino Fundamental. A Prof.^a Jucimara Chagas por todo apoio e inspiração.

Ao meu orientador Marcone, pelos anos de aprendizado, desde o final da graduação, em Projetos 2, ao mestrado, e porventura PhD. Sou grato por você compartilhar seu conhecimento comigo, por acreditar em mim, pela paciência, pelos conselhos, “puxões de orelha” e amizade! Saiba que eu te admiro muito. “Conflito e movimento!”.

A todos os membros do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), pela amizade ao longe da minha trajetória neste grupo de pesquisa. Em especial, a Jéssica Cordeiro, Olívia Moreira e Maria Patrícia, por terem me acolhido no grupo e compartilhado seus conhecimentos, alegrias e aflições, na jornada da eletroforese capilar. E a todos os demais integrantes que passaram e ainda estão pelo GQAQ: Prof. Dr.^a Paula Rocha Chellini, Bruna, Luiz Henrique, Matheus Fracetti, Patrícia Abranches, Marco Antônio, Michelle e Arthur Velasco.

Ao pesquisador Vinicius Rodrigues Durães Pereira e ao Prof. Dr. Giovanni Wilson Amarante, coordenador do Grupo de Pesquisas em Metodologias Sintéticas (GPMS), pela colaboração no trabalho, pelas discussões e cordialidade.

Aos professores Dr^a. Adriana Ferreira Faria e Dr. Lucas Mattos Duarte, por contribuem e me auxiliarem no Exame de Qualificação do Mestrado. Ao Dr. José Alberto Fracassi e, novamente, Dr. Lucas M. Duarte, pelo trabalho criterioso, em minha banca, na Defesa da Dissertação.

As agências de fomento, CAPES, CNPq, FAPEMIG, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCTBio), pelos recursos fornecidos que viabilizaram a execução deste projeto de pesquisa, e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

A todos os professores, monitores, tutores, técnicos administrados, e terceirizados atuantes na UFJF, que contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este momento ímpar se concretizasse, muito obrigado!

Sou um cidadão brasileiro grato pelo poder transformador da Universidade Federal de Juiz de Fora, uma instituição que acredita e se faz ser reconhecida pela educação pública, democrática, gratuita e de qualidade. Um panorama do qual compactuo. Agradeço por proporcionar-me, ao longo destes sete anos, um espaço para desmistificar e desmitificar opressões de raça, classe, gênero, orientação sexual, deficiências e inúmeras outras condições que nos distanciam ou aproximam daquilo que se julga humano.

Me sinto honrado de poder caminhar até aqui. Menciono muitos, e não todos, mas no intuito de dizer que nunca ando só. E se cheguei, foi por causa deles. É uma benção muito grande conquistar espaços nos quais sua família não está acostumada a habitar, sob a ótica física e social. É desafiador. É desestimulante. É sufocante. Mas também é prazeroso, e substancialmente, político. É realizador e disruptivo. É necessário. É um mérito, coberto de lutas, escolhas e renúncias, minhas e daqueles que caminham comigo. É (re)fazer o Brasil. Acredito que ainda tenho muito a conquistar, e este é só um dos inúmeros pontos de partida, que agora se fez chegada, dos quais me sinto feliz e realizado em poder experimentar. Em minha cosmovisão, retorno de onde vim, melhor do que parti.

Não compartilho de uma perspectiva de ciência neutra, desconexa do cenário político, econômico, social, e cultural ao qual ela é produzida. Assim, a possibilidade de contribuir para o avanço do conhecimento científico, especialmente, no contexto da pandemia de COVID-19 é uma responsabilidade, uma jornada que exigiu um comprometimento significativo. Neste

cenário, enquanto pesquisador, é preciso honrar a vida e a memória daqueles que foram afetados por essa crise. É com profundo respeito e consideração que dirijo meus sentimentos aos familiares das pessoas que, lamentavelmente, foram acometidas pela COVID-19 e fizeram a passagem.

“Por isso a representatividade é tão importante: onde a gente não se vê, a gente não se pensa, não se projeta” (Bárbara Carine Soares Pinheiro, 2023, p.11)

Tenho dito e gosto de afirmar que a minha história é uma história perigosa, como é a história de quem sai das classes populares, de uma subalternidade, e consegue galgar outros espaços. Essas histórias fortalecem o discurso da meritocracia, que diz que se você estudar e trabalhar, você chega lá... Aliás, tenho me perguntado: O que significa chegar lá? É perigoso tomar essas histórias como exemplares porque cria-se a impressão que quem não conseguiu sair dessa posição é porque não trabalha e não se esforça. Ao contrário, conheço várias pessoas que se esforçaram, que trabalharam e ficaram pelo caminho.¹

¹Diz a escritora Conceição Evaristo em entrevista concedida ao G1. Disponível em: <https://g1.globo.com/educacao/enem/2018/noticia/2018/11/06/o-momento-presente-pede-novas-narrativas-diz-conceicao-evaristo-homenageada-no-enem-2018.ghtml>. Acesso em 31 de agosto de 2023.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, sendo declarada como uma pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em março de 2021, e que ainda representa uma ameaça à saúde pública. Atualmente, alguns medicamentos são recomendados pela OMS como abordagem terapêutica no enfrentamento da crise sanitária. Dentre eles, o molnupiravir é o primeiro antiviral oral anti-SARS-CoV-2 a obter aprovação pelos órgãos sanitários de diversos países, inclusive no Brasil. Tendo em vista a natureza recente das terapias antivirais no combate a COVID-19, assegurar a segurança e eficácia apropriadas na produção desses medicamentos depende da garantia no controle de qualidade das matérias-primas. O molnupiravir é um pró-fármaco do β -D-N⁴-hidroxicitidina (NHC), uma estratégia para aumento da sua biodisponibilidade. Além disso, o NHC é relatado como subproduto em diversas rotas sintéticas totais e metabólito do molnupiravir, considerações que evidenciam a necessidade do monitoramento simultâneo de ambas as substâncias, no contexto de produtos farmacêuticos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar um método analítico para análise de molnupiravir em matéria-prima, e aplicar esta metodologia em uma abordagem investigativa para o seu estudo de degradação forçada (EDF). Em seu desenvolvimento, a separação de molnupiravir e NHC foi avaliada por técnicas de eletroforese capilar de zona: em solução livre e em fase micelar, utilizando detecção na região ultravioleta em 236 nm. O eletrólito foi otimizado a partir de um planejamento fatorial 3², no qual avaliou-se a influência do valor de pH e a concentração do surfactante na eficiência de separação dos fármacos. O método otimizado consistiu na análise de molnupiravir por cromatografia capilar eletrocínica micelar mediante o uso de capilar de sílica fundida revestido externamente com poliimida com comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm efetivo), 75 μ m diâmetro interno; temperatura do cartucho mantida em 25,0 °C; tensão positiva de 20 kV; injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 4 s; eletrólito constituído por solução tampão carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) na concentração de 20 mmol L⁻¹, em pH 10,4; e dodecil sulfato de sódio na concentração de 60 mmol L⁻¹; com tempo total de análise de 12 minutos. Alguns parâmetros de mérito analítico foram avaliados, de maneira que a seletividade foi certificada, e a exatidão do método, cujos valores variam de 91 a 113%, foi estabelecida por ensaios de recuperação em três níveis de concentração. Não foram encontradas impurezas na matéria-prima analisada. A avaliação da estabilidade química das formulações farmacêuticas é uma temática da saúde pública, visto que a instabilidade pode reduzir o efeito terapêutico ou expor os usuários a produtos de degradação

(PDs) potencialmente tóxicos. Com isso, o EDF foi realizado expondo a matéria-prima às condições de estresse em meio alcalino. A partir da metodologia analítica implementada, até cinco produtos de degradação foram detectados. Estima-se que um destes PDs seja o NHC, considerando a caracterização por espectroscopia UV-VIS, demonstrando a potencialidade do método como indicativo de estabilidade diante do recorte experimental investigado, auxiliando em outros EDF sob outras condições de estresse, e no desenvolvimento de futuras formulações.

Palavras-chave: molnupiravir; NHC; COVID-19; degradação forçada; Cromatografia Eletrocinética Micelar.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, which was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2021, and still represents a threat to public health. Currently, some drugs are recommended by the WHO as a therapeutic approach to tackling the health crisis. Among them, molnupiravir is the first oral anti-SARS-CoV-2 antiviral to be approved by the health agencies of several countries, including Brazil. Given the recent nature of antiviral therapies to combat COVID-19, ensuring appropriate safety and efficacy in the production of these drugs depends on guaranteeing the quality control of raw materials. Molnupiravir is a prodrug of β -D-N⁴-hydroxycytidine (NHC), a strategy for increasing bioavailability. In addition, NHC is reported as a by-product in several total synthetic routes and a metabolite of molnupiravir, considerations that highlight the need for simultaneous monitoring of both substances in the context of pharmaceutical products. The aim of this work was to develop and optimize an analytical method for the analysis of molnupiravir in raw materials, and to apply this methodology in an investigative approach to the forced degradation study (FDS). In its development, the separation of molnupiravir and NHC was evaluated by zone capillary electrophoresis techniques: in free solution and in micellar phase, using diode array detection at 236 nm. The electrolyte was optimized using a 3² factorial design, in which the influence of the pH value and the micellar concentration on the separation efficiency of the drugs was evaluated. The optimized method consisted of the analysis of molnupiravir by micellar electrokinetic capillary chromatography using a fused silica capillary externally coated with polyamide with a total length of 48.5 cm (40.0 cm effective), 75 μ m internal diameter; cartridge temperature maintained at 25.0 °C; positive voltage of 20 kV; hydrodynamic injection of 25 mbar for 4s; electrolyte consisting of carbonate buffer solution (NaHCO₃/Na₂CO₃) at a concentration of 20 mmol L⁻¹, pH 10.4, and SDS at a concentration of 60 mmol L⁻¹; with a total analysis time of 12 minutes. Some analytical performance parameters were evaluated, so that selectivity was certified, and the accuracy of the method, whose values range from 91 to 113%, was established by recovery tests at three concentration levels. No impurities were found in the raw material analyzed. Assessing the chemical stability of pharmaceutical formulations is a public health issue since instability can reduce the therapeutic effect or expose users to potentially toxic degradation products (DPs). Therefore, the FDS was carried out by exposing the raw material to stress conditions in an alkaline environment. Based on the analytical methodology implemented, up to five degradation products were detected. One of these DPs is estimated to be NHC, considering the

characterization by UV-VIS spectroscopy, demonstrating the potential of the method as an indicator of stability in the experimental setting investigated, assisting in other FDS under other stress conditions, and in the development of future formulations.

Keywords: molnupiravir; NHC; COVID-19; forced degradation; Electrokinetic Micellar Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	–	Viroses zoonóticas do século XXI com alto potencial pandêmico.....	24
Figura 1	–	Total de mortes em excesso por região da OMS.....	29
Figura 2	–	Antivirais com recomendação favorável para o tratamento da COVID-19, segundo atuais diretrizes da OMS.....	36
Figura 3	–	Fórmulas químicas do molnupiravir (A) e NHC (B).....	38
Quadro 2	–	Algumas características farmacológicas do molnupiravir.....	41
Figura 4	–	Esquema ilustrativo da indução de mutagênese letal por molnupiravir durante a replicação do SARS-CoV-2.....	42
Quadro 3	–	Comparação de rotas sintéticas totais do molnupiravir a partir da uridina.....	46
Quadro 4	–	Condições típicas de estresse em estudo de estabilidade de pré-formulação....	48
Figura 5	–	Representação esquemática de um sistema de CE.	50
Figura 6	–	Modelo proposto para descrever a região da dupla camada elétrica, a interface capilar-solução.....	54
Figura 7	–	Esquema ilustrativo para análise da polaridade da fonte de alta tensão e sentido do EOF comumente empregados em CZE.....	57
Figura 8	–	Intervalo característico de eluição em cromatografia eletrocínética micelar....	59
Figura 9	–	Ilustração esquemática da MEKC em um capilar.....	60
Quadro 5	–	Abordagens convencionais para otimização.....	66
Figura 10	–	Distribuição dos 9 ensaios experimentais de uma matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial completo 3^2 , representada pela região do quadrado com as coordenadas normalizadas.....	68
Quadro 6	–	Definição sobre validação segundo as autoridades regulatórias.....	70
Quadro 7	–	Procedimento de degradação utilizado nas diferentes condições do estudo de degradação forçada	82
Figura 11	–	Espectros de absorção do molnupiravir (vermelho) e do NHC (azul), na concentração de 18 mg L^{-1} e 14 mg L^{-1} , respectivamente.....	85
Figura 12	–	Eletroferogramas da solução MIX com diferentes eletrólitos avaliados por CZE.	86
Figura 13	–	Valores α para cada espécie de NHC em função do pH.....	88
Figura 14	–	Composição de soluções de molnupiravir em função do pH.....	89

Figura 15	–	Curvas de mobilidade efetiva para o NHC e o molnupiravir em função do pH.....	89
Figura 16	–	Figura 16 - Eletroferogramas dos 11 ensaios experimentais (A-K) do planejamento fatorial 3^2 , conforme Tabela 3.....	95
Figura 17	–	Eletroferogramas dos analitos NHC (linha preta) e MPV (linha vermelha) utilizando o eletrólito otimizado.....	96
Figura 18	–	Eletroferogramas da solução MIX para avaliação da troca das dimensões do capilar.....	98
Figura 19	–	Eletroferogramas do estudo de repetibilidade do eletrólito otimizado.....	99
Figura 20	–	Eletroferogramas do estudo da seletividade do método desenvolvido e otimizado.....	101
Figura 21	–	Eletroferogramas da degradação por hidrólise alcalina, em diferentes tempos de exposição da matéria-prima à solução degradante de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , a temperatura ambiente.....	104
Figura 22	–	Espectro de absorção UV-VIS do produto de degradação, obtido durante análise por eletroforese capilar.....	106
Figura 23	–	Espectros de absorção UV-VIS dos PDs* presentes no eletroferograma da Figura 21.3, obtidos durante análise por eletroforese capilar.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores extraídos dos eletroferogramas para o cálculo da mobilidade eletroforética dos fármacos.....	87
Tabela 2	– Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 3^2	91
Tabela 3	– Matriz de coeficiente de contraste para um fatorial 3^2	93
Tabela 4	– Estudo da repetibilidade do eletrólito otimizado para o molnupiravir.....	99
Tabela 5	– Valores de RSD para a repetibilidade e precisão intermediária.....	102
Tabela 6	– Porcentagem de recuperação média e desvio padrão para o molnupiravir.....	102
Tabela 7	– Tempo de retenção relativo dos picos considerados no EDF em meio alcalino.....	105
Tabela 8	– Resultados das áreas dos produtos de degradação formados a partir da degradação forçada da matéria-prima do molnupiravir, em meio alcalino, sob diferentes tempos de exposição.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGREE	<i>Analytical GREEnness</i>
ANs	análogos de nucleosídeos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B.1.1.529	Ômicron
B.1.617.2	Delta
BGE	<i>background electrolyte</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CHIKV	vírus Chikungunya
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CoVs	coronavírus
CSG	<i>Coronavirus Study Group</i>
CV	coeficiente de variação
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
d.e	diâmetro externo
d.i	diâmetro interno
DAD	<i>diode array detector</i>
DRBM	deficiência relativa de balanço de massas
DRIVE	<i>Drug Innovation Ventures at Emory</i>
DTRA	<i>Defense Threat Reduction Agency</i>
EDF	estudo de degradação forçada
EIDD	<i>Emory Institute of Drug Development</i>
EIDD-1931	β -D-N ⁴ -hidroxicitidina
EIDD-2801	molnupiravir
EKC	<i>Electrokinetic Capillary Chromatography</i>
ELL	extração líquido-líquido
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EOF	<i>electroosmotic flow</i>
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
GAPI	<i>Green Analytical Procedure Index</i>
GPMS	Grupo de Pesquisas em Metodologias Sintéticas
GQAQ	Grupo de Química Analítica e Quimiometria
HCoV _s	CoVs humanos
HPTLC	<i>high-performance thin-layer chromatography</i>
ICE	intervalo característico de eluição
ICH	<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICTV	<i>International Committee of Taxonomy of Viruses</i>
IFAs	insumos farmacêuticos ativos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
M ^{pro}	<i>main protease of SARS-CoV-2</i>
MEKC	<i>Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography</i>
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MHRA	<i>Medicines and Healthcare products Regulatory Agency</i>
MK-4482	molnupiravir
MPV	molnupiravir
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NHC	β -D-N ⁴ -hidroxicitidina
NHC-TP	NHC-trifosfato
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDs	produtos de degradação
QC	<i>quality control sample</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
Rename	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RP-HPLC	<i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
RSI	Regulamento Sanitário Internacional
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RWD	<i>real-world data</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2</i>
SCL	separação por coluna cromatográfica
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIL	<i>stable isotopically labelled</i>
ST	síntese total
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	tetraborato de sódio
TMR	tempo de migração relativo
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	ultravioleta
VEEV	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>
VIS	visível
β -CoVs	β -coronavírus

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância da solução
A_A	Área do analito na amostra
A_{A+P}	Área do analito na amostra com adição do padrão
A_P	Área do padrão
b	Caminho óptico
C	Concentração do analito
C_A	Concentração do analito
E	Campo elétrico aplicado
H_{max}	Altura máxima do pico do analito
H_{min}	Altura mínima do pico do analito
k'	Fator capacidade ou coeficiente de partição
k'_2, k'_1	Fator capacidade de dois compostos (1 e 2)
k	Número de fatores para cada nível do planejamento fatorial
L_{ef}	Comprimento efetivo do capilar
L_{tot}	Comprimento total do capilar
pH	Potencial hidrogeniônico
Ka	Constante de dissociação
n	Número de níveis no planejamento fatorial
n^k	Número mínimo de ensaios para realizar o planejamento fatorial
n_{PC}	Número de réplicas no ponto central do planejamento
n_T	Número total de ensaios do planejamento
n_m	Média aritmética dos valores de n_s, n_i .
n_s	Valores superior do nível do fator k
n_i	Valores inferior do nível do fator k
N	Número de pratos teóricos
n_{mc}	Quantidade de matéria do soluto em fase micelar
n_{aq}	Quantidade de matéria do soluto em fase aquosa
PD_i	somatório da área de produtos de degradação na amostra não degradada
PD_D	somatório das áreas dos produtos de degradação na amostra após degradação.
R^2	coeficiente de determinação

r_i	Raio iônico
$R\%$	Percentual de recuperação
s_b	Desvio padrão amostral da linha base
s	Desvio padrão amostral
t_{MPV}	Tempo de retenção do molnupiravir
t_{NHC}	Tempo de retenção do NHC
t_{eo}	Tempo de migração do fluxo eletrosmótico
t_m	Tempo de migração do analito
t_{obs}	Tempo de migração do analito
t_r	Tempo de retenção do analito
t_0	Tempo de migração de um soluto não retido
t_{mc}	Tempo de migração da micela
T_i	área do IFA na amostra não degradada
T_D	área do IFA na amostra após degradação;
V	Tensão aplicada
\bar{x}	média amostral dos resultados experimentais
z_i	Magnitude da carga do íon
α	Grau de ionização do analito
α_j	Frações de distribuição de cada espécie j
α_0, α_1 e α_2	Frações de distribuição das diferentes espécies de um eletrólito fraco
μ_{ep}	Mobilidade eletroforética
μ_{ef}	Mobilidade efetiva
μ_{eo}	Mobilidade eletrosmótica
μ_i	Mobilidade iônica da espécie i
μ_j	Mobilidade iônica de cada espécie j
μ_{obs}	Mobilidade observada do analito
v_{obs}	Velocidade observada do analito
v_{eo}	Velocidade do fluxo eletrosmótico
v_{ep}	Velocidade eletroforética
v_{mc}	Velocidade da micela
v_i	Velocidade limite da espécie iônica
ζ	Potencial zeta

e	Carga elementar
ε	Constante dielétrica do meio
ϵ	Absortividade molar do analito
k	Número de fatores do planejamento
η	Viscosidade do meio
λ	Comprimento de onda da radiação eletromagnética
δ	Código da matriz de coeficiente de contraste
χ	Qualquer valor para um nível experimental do planejamento, para um dado fator k
R_s	Resolução cromatográfica
ϕ	Seletividade
RSD (%)	Desvio padrão relativo ou coeficiente de variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1	COVID-19.....	25
1.2	FIM DA EMERGÊNCIA DE SAÚDE PÚBLICA DE IMPORTÂNCIA INTERNACIONAL (ESPII).....	29
1.3	MEDICAMENTOS NO COMBATE A PANDEMIA DE COVID-19.....	32
1.4	MOLNUIRAVIR NO CONTEXTO DA PANDEMIA DE COVID-19.....	37
1.5	BREVE HISTÓRICO DO MOLNUIRAVIR.....	43
1.6	SÍNTESE DO MOLNUIRAVIR.....	44
1.7	DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	46
1.8	ELETOFORESE CAPILAR.....	49
1.8.1	Princípios da separação de CE de zona em solução livre.....	51
1.8.2	Mobilidade efetiva.....	57
1.8.3	Cromatografia capilar eletrocínética micelar.....	58
1.8.4	Deteção UV-VIS.....	62
1.9	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE MOLNUIRAVIR.....	63
1.10	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	65
1.11	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	68
1.11.1	Seletividade.....	71
1.11.2	Precisão.....	72
1.11.3	Exatidão.....	73
1.11.4	Limite de deteção.....	74
1.11.5	Limite de quantificação.....	75
2	OBJETIVO.....	78
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	78
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	79
3.2	PREPARO DE AMOSTRA	80
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	80
3.3.1	Eletroforese capilar.....	80

3.3.2	Espectroscopia de absorção ultravioleta-visível.....	81
3.4	PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	81
3.5	DEGRADAÇÃO FORÇADA EM MEIO ALCALINO.....	82
3.5.1	Preparo da solução degradante alcalina.....	83
3.5.2	Procedimento de degradação, em meio alcalino.....	83
3.6	TRATAMENTO DOS DADOS.....	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	84
4.1	SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA.....	84
4.2	TESTES PRELIMINARES DE SEPARAÇÃO POR CZE.....	85
4.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	90
4.4	TESTE COM TROCA DAS DIMENSÕES DO CAPILAR.....	97
4.5	REPETIBILIDADE DO ELETRÓLITO.....	99
4.6	VALIDAÇÃO.....	100
4.6.1	Seletividade.....	100
4.6.2	Precisão Instrumental.....	101
4.6.3	Exatidão.....	102
4.6.4	Limite de detecção e quantificação.....	103
4.7	DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	103
4.7.1	Amostra controle.....	103
4.7.2	Degradação por hidrólise alcalina.....	103
4.8	TRABALHOS FUTUROS.....	111
6	CONCLUSÃO.....	112
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICE A – Produção Científica	134

1 INTRODUÇÃO

As duas primeiras décadas do século XXI foram marcadas por viroses novas ou reemergentes de origem zoonótica, com alto potencial pandêmico (Meganck; Baric, 2021), e são apresentadas na Quadro 1 (Meo; Klonoff, 2022; Trovato *et al.*, 2020). O aumento da incidência dessas infecções em humanos, pode estar associado a diversos fatores, a contar com: a ampliação da interface homem-animal-ambiente, seja pela reprodução, caça ou atividades comerciais; mudanças climáticas; globalização e mobilidade; aquisição de resistência a medicamentos; precariedade nos serviços de saúde; comportamento humano; dentre outros (Keusch *et al.*, 2022; Piret; Boivin, 2021). Dentro deste contexto, além do impacto nos sistemas de saúde, tais doenças acarretaram desdobramentos econômicas, sociais, ambientais, e políticos de caráter global (Trovato *et al.*, 2020), de maneira que a comunidade científica, historicamente, é convocada a elaborar respostas rápidas e eficazes no enfrentamento dessas adversidades (Pedroso *et al.*, 2020).

Quadro 1 – Vírus zoonóticas do século XXI com alto potencial pandêmico

Zoonose	Epicentro	Ano
Surto de influenza A aviária (H5N1)	Ásia	2003
Pandemia de gripe A (H1N1)	México	2009
Epidemia de Ebola (EBOV)	África Ocidental	2013
Endemia do vírus Zika (ZIKV)	Brasil	2015
Epidemia do vírus Lassa	Nigéria	2018
Epidemia de monkeypox	Europa e África	2022

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Além destas doenças, é importante ressaltar o aparecimento de infecções provocadas por coronavírus (CoVs), que totalizam sete espécies de CoVs humanos (HCoVs), até então (Ye *et al.*, 2020). Esses agentes patogênicos são denominados como: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, que provocaram doenças de sintomas moderados. Em contraste, além do mais recente HCoV identificado como SARS-CoV-2, os demais agentes infecciosos provocaram doenças altamente patogênicas, como a epidemia da síndrome respiratória aguda grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS) causada pelo vírus SARS-CoV, oriunda na China em 2002; e a síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*, MERS) provocada pelo vírus MERS-CoV, proveniente da Arábia

Saudita em 2012 (Krishna; Pillai; Veetil, 2020; Werneck; Carvalho, 2020), caracterizadas por apresentarem alta taxa de letalidade, 9,5 e 34,4%, respectivamente no caso da SARS e MERS, oposto a doença provocada pelo SARS-CoV-2, cuja taxa equivale a 2,13% (Pustake *et al.*, 2022).

1.1 COVID-19

Em dezembro de 2019, as autoridades de saúde da cidade chinesa, em Wuhan, notificaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre um surto de pneumonia de causa desconhecida (Lauxmann; Santucci; Autrán-Gómez, 2020). Diante disso, os pesquisadores do *Coronavirus Study Group* (CSG) identificaram um novo β -coronavírus (β -CoVs), designado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês *International Committee of Taxonomy of Viruses*, ICTV) como SARS-CoV-2, acrônimo de coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave (Gorbalenya *et al.*, 2020).

Tal enfermidade foi denominada pela OMS como *Coronavirus Disease 2019*, ou simplesmente COVID-19 (OMS, 2023a), e atingiu diversos países com número significativo de casos, o que levou essa instituição a decretar o cenário como Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), vigente entre 30 de janeiro de 2020 e 5 de maio de 2023, e em 11 de março de 2021 reconheceu o caso como uma pandemia (Chauhan, 2020).

Embora a origem dessa infecção tenha sido declarada inicialmente como zoonótica, sem identificar satisfatoriamente o animal reservatório, até então (Ray; Bhattacharya, 2023; Ruiz-Medina *et al.*, 2022), estudos posteriores demonstraram que a transmissão de pessoa para pessoa é a forma mais comum da disseminação viral, havendo diversos mecanismos de transmissão da COVID-19 (Rahman *et al.*, 2020), categorizadas em direto e indireto. A transmissão direta compreende a transmissão via aerossóis ou formados por gotículas respiratórias; por outros fluidos e secreções corporais, por exemplo, fezes, saliva, urina, sêmen e lágrimas; e de mãe para filho. Já o modo indireto pode ocorrer através de fômites ou superfícies (Karia *et al.*, 2020).

Inúmeras evidências suportam que a transmissão do SARS-CoV-2 é aérea (Wilson; Corbett; Tovey, 2020), sendo transmitida principalmente quando gotículas respiratórias ou aerossóis, contendo o patógeno, entram em contato com a mucosa nasal, conjuntival ou oral dos indivíduos receptores (Arienzo *et al.*, 2023). Embora as definições mais recentes da OMS estabeleçam uma dicotomia entre a transmissão por via aérea e por gotículas, é importante destacar que ambas as formas de transmissão viral podem manifestar-se como um contínuo de tamanhos de partículas durante as atividades respiratórias, transportando material viral, e

apresentarem a capacidade de disseminar-se amplamente no ar, alcançando distâncias de até várias dezenas de metros a partir da fonte de emissão (Leo *et al.*, 2023; Wilson; Corbett; Tovey, 2020).

A OMS afirma que a transmissão por gotículas ocorre quando uma pessoa infectada libera gotículas respiratórias contaminadas, de 5-10 μm de tamanho, atingindo as mucosas da boca, do nariz ou dos olhos de outra pessoa em um raio de até um metro, dando início a uma infecção no indivíduo receptor. Segundo Arienzo *et al.* (2023), a transmissão por gotículas respiratórias é a principal via de transmissão por contato próximo. Ademais, como possuem baixa persistência no ar, as gotículas caem rapidamente e podem depositar-se em superfícies, e quando tocadas pelas mãos do indivíduo, potencialmente, podem transferir o vírus, atingindo principalmente as vias aéreas superiores pelo contato com o rosto (Arienzo *et al.*, 2023; Reinhardt, 2022).

O órgão também estabelece que os aerossóis são caracterizados por apresentarem partículas com diâmetro igual ou inferior a 5 μm , e a via de transmissão ocorre quando este é inalado para dentro do sistema respiratório, e segundo os autores, desempenham um papel crucial na transmissão aérea, pois essa dispersão de partículas possui maior persistência no ar, atingindo com maior eficiência as vias respiratórias inferiores. Embora esse tipo de transmissão não prevaleça a longas distâncias, devido ao limite de doses infecciosas viáveis do agente ou até mesmo pela inativação viral, este mecanismo é substancialmente relevante em ambientes internos com ventilação inadequada ou recirculação de ar (Arienzo *et al.*, 2023; Reinhardt, 2022).

As investigações dos mecanismos de transmissão se tornam cada vez mais pertinentes para a implementação de medidas de controle e prevenção da doença. Com isso, as rotas de transmissão da COVID-19 têm sido alvo de discussões em relação à sua importância e influência na disseminação, e alguns estudos apontam rotas alternativas potencialmente impactantes para a saúde pública, seja através do contato com superfícies contaminadas ou fômites, bem como a ingestão de alimentos e água contaminados; por meio da transmissão fecal-oral (Arienzo *et al.*, 2023); ou até mesmo pela transmissão vertical (Oliveira *et al.*, 2021; Shou; Wang; Yang, 2023), dentre outros.

Os sintomas da infecção pelo novo coronavírus variam em um amplo espectro clínico, desde casos assintomáticos à insuficiência respiratória grave, complicação associada à COVID-19. Em função de outras desordens provocadas pela doença no organismo, a doença pode levar o indivíduo a óbito. A infecção por esse β -CoV apresenta um período médio de incubação de três dias, podendo variar de 0 a 24 dias; podendo apresentar um período assintomático que

abrange o momento da infecção até o quinto dia; e, geralmente, o período de início dos sintomas clínicos é do quinto ao oitavo dia (Giri *et al.*, 2021).

Na fase aguda, entre 1 e 4 semanas após o início dos sintomas, os pacientes apresentam geralmente febre, tosse seca, mialgia e dispneia (Shah *et al.*, 2021). Em alguns casos, na fase pós-aguda, de 4 semanas a 6 meses após o início dos sintomas (Greenhalgh *et al.*, 2020; Nalbandian *et al.*, 2021), a doença não se restringe apenas ao sistema pulmonar, podendo afetar o sistema gastrointestinal, cardiovascular, hematológico, renal, musculoesquelético, endócrino (Mehta *et al.*, 2021), neurológico, oftalmológico e dermatológico (Gupta *et al.*, 2020). Além disso, a presença de algumas comorbidades como hipertensão, diabetes, obesidade, doenças respiratórias e doenças cardiovasculares nos pacientes são um fator de risco para as manifestações clínicas graves da doença (Krishnan *et al.*, 2021).

Um mecanismo subjacente à inflamação exacerbada em formas graves de COVID-19 foi proposto por Junqueira e colaboradores (2022). Neste trabalho, os autores descrevem que o SARS-CoV-2, ao entrar no organismo, aciona a produção de um anticorpo específico chamado afucosilado, que neutraliza o vírus, mas também inicia um processo de fagocitose por células de defesa, chamadas monócitos, ativando inflamossomas e resultando na morte das células por piroptose, estimulando uma cascata inflamatória. Os autores ressaltam esse anticorpo afucosilado é produzido apenas em resposta à infecção pelo vírus, não pelas vacinas contra a COVID-19, destacando desta forma a importância da imunização (Junqueira *et al.*, 2022).

Os indivíduos convalescentes da COVID-19 têm sido acometidos por sintomas multissistêmicos, persistentes, intermitentes, ou tardios, relacionados a sequelas cardiopulmonares, neurológicas, psicológicas, entre outras, relatando perda de memória, mialgia, fadiga e dispneia, disfunção quimiossensorial, como ageusia e anosmia, após a infecção (Hachul; Almeida; Scanavacca, 2023). Esse quadro crônico da doença tem sido denominado “COVID-19 longa”, 'síndrome de COVID-19 pós-aguda', ou 'síndrome pós-COVID-19', e afeta indivíduos que tiveram uma infecção provável ou confirmada pelo SARS-CoV-2, geralmente manifestando-se três meses após o início da COVID-19 com sintomas persistentes por pelo menos dois meses, não explicáveis por outros diagnósticos. Fadiga, falta de ar e disfunção cognitiva, entre outros, são os sintomas recorrentes que afetam a funcionalidade diária, podendo ocorrer após a recuperação inicial da COVID-19 ou persistirem desde o início da doença, ou reaparecer ao longo do tempo, conforme definição da OMS (OMS, 2021).

A síndrome pós-COVID afeta indivíduos de todas as idades, mas é mais prevalente entre os indivíduos de 30 a 50 anos, não se restringindo aos sintomas da fase aguda, apresentando

quadros clínicos de distúrbios psiquiátricos, como depressão, ansiedade e síndrome do pânico; miocardites; acidente vascular cerebral; insuficiência cardíaca e arritmias; afecções genito-urinárias, gastrointestinais, endocrinológicas, neurológicas centrais e periféricas (Hachul; Almeida; Scanavacca, 2023). Esse cenário indica a importância na continuidade dos estudos para melhor compreensão da epidemiologia e patogênese da COVID-19, a fim de subsidiar as decisões à cerca da saúde pública, contribuindo para o enfrentamento da crise sanitária global.

Conforme estimado pela OMS, a pandemia de COVID-19 teve um impacto sem precedentes, com mais de 759 milhões de casos confirmados e quase 6,9 milhões de mortes relatadas globalmente, até 11 de março de 2023 (OMS, 2023b). No Brasil, considerando o mesmo período, os casos acumulados ultrapassam 37,085 milhões e as mortes acumuladas excedem 699,3 mil vítimas (WHO, 2022a). Ainda relativo a esse período, embora as estatísticas sejam influenciadas por vieses já conhecidos, do quantitativo global de óbitos relatados atribuídos à COVID-19, 43% foi imputado a Região das Américas da OMS, tornando-a a região mais afetada pela pandemia. As Regiões Europeia e do Sudeste Asiático da OMS representaram, respectivamente, 32% e 12%. Por fim, as regiões do Pacífico Ocidental, Mediterrâneo Oriental e África da OMS notificaram um percentual de mortes menor, representando, combinadas, 14% do total global (OMS, 2023b).

Segundo o relatório mais recente da instituição para o monitoramento da saúde para atingir os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, até 2030, denominado Estatísticas Mundiais de Saúde 2023 (do inglês *World Health Statistics 2023*), com dados referentes ao ano de 2020, infere-se que o verdadeiro impacto é ainda maior, pois afetou indiretamente a mortalidade devido a descontinuidade nos serviços de saúde e alterações nos padrões de procura por assistência médica (OMS, 2023b).

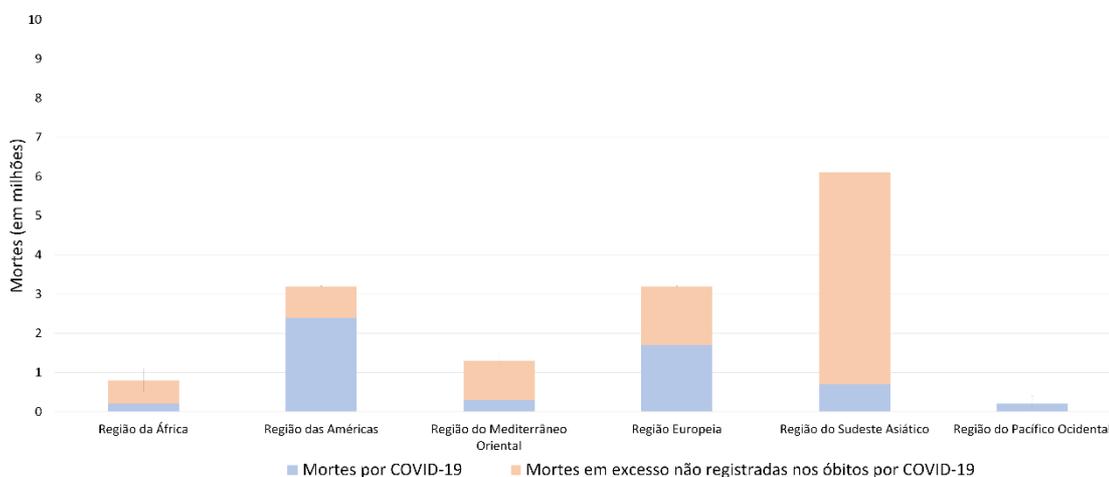
Msemburi e colaboradores destacam a complexidade em estimar o efeito da pandemia de COVID-19 na mortalidade global, salientando que as estatísticas da OMS estão imersas em um cenário de subnotificação, também reconhecido pelo órgão (OMS, 2023c), pois apresentam inúmeros empasses, dado que alguns países não tem acesso aos testes, o que significa que nem todas as mortes por COVID-19 são identificadas. Outros lidam com a incapacidade de diagnóstico diferencial, e por consequência, algumas mortes por COVID-19 podem ser atribuídas a outras causas. Além disso, em algumas nações, a certificação de COVID-19 como causa de morte pode ser inconsistente, dentre outros diversos fatores (Acosta, 2023; Msemburi *et al.*, 2023).

Neste contexto, o conceito epidemiológico denominado excesso de mortalidade, é uma métrica relevante, sobretudo, no contexto da crise sanitária, pois através dela é possível medir

a diferença entre a mortalidade durante a pandemia e a mortalidade esperada sem o impacto da pandemia, considerando todos os efeitos sobre a mortalidade (Wang *et al.*, 2022). Diante dos dados mais recentes publicados pela OMS, o número total de mortes associadas direta ou indiretamente à pandemia de COVID-19, descrito como “excesso de mortalidade”, entre 1 de janeiro de 2020 e 31 de dezembro de 2021, foi de aproximadamente 14,9 milhões, com intervalo entre 13,3 milhões e 16,6 milhões (OPAS, 2022).

A mortalidade excessiva pode ser calculada como a diferença líquida entre o quantitativo de mortes durante a pandemia, medido pela mortalidade observada ou estimada por todas as causas, e o número de óbitos que seriam esperados, tomando como referência tendências prévias de mortalidade por todas as causas. Essa estatística fornece uma representação mais objetiva da pandemia em relação aos dados de mortalidade notificados por COVID-19 (The Economist, 2021). Conforme apresentado na Figura 1, o contraste entre o número de mortes notificadas por COVID-19 e o excesso de mortalidade, em cada região, indica a subestimação do impacto da pandemia.

Figura 1 – Total de mortes em excesso por região da OMS (OMS, 2023b)



Fonte: Adaptado de World Health Statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. (OMS, 2023b) Dados de 1 de janeiro de 2020 a 31 dezembro de 2021.

1.2 FIM DA EMERGÊNCIA DE SAÚDE PÚBLICA DE IMPORTÂNCIA INTERNACIONAL (ESPII)

A instituição declarou que a COVID-19 não mais se caracterizava como uma ESPII (WHO, 2023a), em 5 de maio de 2023, passados mais de três anos desde o alerta oficial da OMS, e que a partir daquela data deveria ser considerada uma questão de saúde que precisa de

atenção contínua, ou seja, os países devem realizar a transição do estágio de emergência para o de manejo da COVID-19 juntamente com outras doenças infecciosas (OPAS, 2023a). O anúncio do órgão não significa o fim da pandemia de COVID-19, visto que a enfermidade ainda tem transmissão transnacional sustentada, causando impacto substancial no número de internações e óbitos, todavia uma readequação no status de emergência global, o que representa uma alteração nos focos dos esforços realizados para combater a sua disseminação (Castro, 2021; Nogueira, 2023). Essa decisão do Comitê de Emergência da OMS foi fundamenta após análise da tendência decrescente nas taxas de mortalidade por COVID-19, a redução nas internações hospitalares correlacionadas e nas admissões em unidades de terapia intensiva, juntamente com os níveis significativos de imunidade da população ao SARS-CoV-2 (Wise, 2023).

O mais alto nível de alerta da Organização, a ESPII, de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI), é definida como um evento extraordinário que devido à disseminação internacional de doenças, pode representar um risco para a saúde pública em outros países; e potencialmente pode demandar uma resposta internacional coordenada e imediata (Brasil, 2009; Carmo; Penna; Oliveira, 2008). Não há uma definição universal aceita para o termo pandemia (Singer; Thompson; Bonsall, 2021), mas geralmente ele é compreendido como um surto epidêmico caracterizado por uma ampla distribuição geográfica, afetando várias nações, sendo relacionado à distribuição geográfica de uma doença e não à sua gravidade (Gomes, 2015; OPAS, 2023b).

A declaração de uma ESPII pode provocar ampla repercussão econômica, política e social, como é o caso da COVID-19, levando em consideração vários aspectos epidemiológicos, incluindo o potencial de transmissão, a população suscetível, a severidade da doença, a capacidade de impactar viagens internacionais, entre outros fatores específicos que podem contribuir de maneira expressiva para a morbimortalidade (Ventura; Aith; Rached, 2021).

Embora exista uma extensa literatura crítica sobre o RSI e ao mecanismo de declaração de emergências da OMS, é interessante ponderar que além da inexistência de mecanismos sancionatórios que convertam as diretrizes da instituição em obrigações estatais, entre outras considerações, as declarações de emergências têm como possível consequência a implementação de medidas excepcionais para proteção da saúde pública, o que suscita a necessidade de reflexão e equilíbrio entre os direitos individuais e o interesse coletivo (Ventura; Aith; Rached, 2021), pois esta é uma circunstância que requer a implementação imediata de medidas preventivas, de controle e de contenção para mitigar os riscos, danos e agravos à saúde pública (BRASIL, 2014).

Como consequência à suspensão da ESPII para a COVID-19, segundo Kupferschmidte e Wadman, a OMS não poderá mais exigir às 196 nações signatárias seguirem as normas que regem o alerta, o que implicará em ações facultativas como: reportar surtos e resultados dos testes de COVID-19, número de vacinas e outros dados propícios, o que culminará, segundo os especialistas, na perda de algumas informações sobre a pandemia à medida que seus poderes de coleta de dados forem reduzidos. (Kupferschmidt; Wadman, 2023; Wadman, 2022).

Embora haja um debate em curso sobre o uso das terminologias "pandemia" e "ESPII" no contexto da COVID-19, é importante destacar que cada uma delas possui objetivos distintos e implicações específicas. O termo "pandemia" é aplicado quando há transmissão sustentada de uma doença entre diferentes países e regiões, refletindo a disseminação generalizada do agente infeccioso em escala global. Por outro lado, a classificação de uma doença como ESPII requer uma resposta coordenada entre as nações para evitar que um surto localizado se torne uma epidemia de proporções globais, conforme relatado pela OMS (WHO, 2023b). Ademais, as nomenclaturas destacam aspectos distintos da propagação e das medidas para mitigar os impactos da doença.

É importante ressaltar que os argumentos apresentados aqui, em relação às terminologias atinentes a COVID-19, não abrangem todos os aspectos necessários para uma compreensão holística da situação, e não é versada neste intuito. Essas questões são amplas e ainda não possuem consenso entre cientistas, governos, agências reguladoras e o público em geral, como destacado por Singer, Thompson e Bonsall (2021) (Singer; Thompson; Bonsall, 2021). No entanto, a análise dessas terminologias busca trazer elementos que auxiliem as partes interessadas a compreender a natureza complexa da pandemia de COVID-19, suas ramificações e os desafios enfrentados na implementação de estratégias eficazes de controle e prevenção.

À medida que a comunidade científica continua a investigar e aprimorar suas abordagens, é fundamental que as partes interessadas estejam cientes das nuances das terminologias empregadas, o que possibilitará uma comunicação mais clara e precisa entre os agentes envolvidos, contribuindo para uma resposta mais coordenada e efetiva diante de futuras ameaças à saúde pública. Neste contexto, a comunidade acadêmica deve permanecer engajada em explorar temas associados à COVID-19, dado que essa readequação na classificação do status da patologia, pela OMS, não diminui a importância na continuidade dos estudos, levando em consideração que a epidemia global ainda representa uma ameaça à saúde coletiva (Phillips, 2021), exigindo investigação persistente para melhor compreensão, controle e tratamento da doença, sendo cada vez mais relevante o desenvolvimento de ferramentas e metodologias para implementação de novas abordagens medicamentosa mais eficazes. Dessarte, a ciência

continua sendo uma ferramenta essencial no enfrentamento dos desafios complexos apresentados pela pandemia de COVID-19, e na preparação para enfrentar futuras emergências de saúde pública.

1.3 MEDICAMENTOS NO COMBATE A PANDEMIA DE COVID-19

As infecções virais respiratórias são responsáveis pela maior parte da morbidade e mortalidade em nível global. Todavia, existem diversos grupos de vírus que não são rotineiramente alvo de busca, tornando-os negligenciados do ponto de vista de diagnóstico e clínico, inclusive os coronavírus sazonais. Tais vírus não são reconhecidos, por diversas razões, como uma importante ameaça à saúde pública, e conseqüente, para muitos deles, não há uma atenção prioritária no desenvolvimento de um tratamento antiviral específico ou vacinas, um cenário que antecedeu ao surgimento da COVID-19 (Ljubin-Sternak *et al.*, 2021).

Considerando o histórico de doenças contagiosas do passado, o conceito de quarentena foi útil no combate a propagação das enfermidades (Gensini; Yacoub; Conti, 2004). Logo, na ausência de opções medicamentosas eficazes no combate a COVID-19, intervenções não-farmacológicas adotadas, em combinação e simultaneamente, como o isolamento e quarentena, distanciamento físico, uso de máscaras faciais e higienização das mãos, demonstraram eficácia no controle epidemiológico da doença (Odusanya *et al.*, 2020). No concernente as abordagens farmacológicas, até então utilizadas, grande parte das pesquisas e ensaios clínicos que investigam produtos farmacêuticos eficazes contra a COVID-19, estão baseadas em vacinas, drogas antivirais e anticorpos monoclonais (Akhtar, 2020; Majumder; Minko, 2021; Peng *et al.*, 2021).

Após a autorização do uso de várias vacinas, no combate a COVID-19, houve uma melhoria no controle da disseminação do SARS-CoV-2. No entanto, a circulação de variantes altamente transmissíveis, como a Delta (B.1.617.2) e a Ômicron (B.1.1.529), a imunosenescência relacionada à idade, deficiências imunológicas, e estilo de vida dos indivíduos, são alguns fatores que podem ampliar o risco da gravidade da doença, mesmo em indivíduos vacinados. Com isso, o objetivo primordial da vacinação é diminuir as taxas de hospitalizações, internações em unidades de terapia intensiva e mortes. Assim, assegurar níveis elevados de proteção contra futuras ondas de infecções por SARS-CoV-2 pode requerer doses adicionais de vacinas de primeira geração ou ajustadas para novas variantes. Contudo, é preciso considerar que parcela da população pode manifestar hesitação vacinal, ou pode encontrar obstáculos ao acesso a essa abordagem profilática (Rahmah *et al.*, 2022).

Os ensaios clínicos que avaliaram a eficácia da terapia com plasma convalescente foram interrompidos devido à ausência de benefícios clínicos significativos observados em pacientes gravemente enfermos, diferentemente dos estudos clínicos para os anticorpos monoclonais direcionados à proteína *spike* SARS-CoV-2. Embora, existem muitos outros relatos de sucesso destes testes clínicos, há uma desvantagem significativa em uma parcela dessas terapias imunobiológicas para a COVID-19, uma vez que elas não são implementadas fora ambiente clínico (Rahmah *et al.*, 2022), visto que, em sua maioria são injetáveis. Embora não há uma legislação nacional que estabeleça a relação de medicamentos injetáveis que podem ou não ser administrados nas farmácias e drogarias, essa informação deve estar descrita na rotulagem e bula do produto. Assim, a administração de medicamentos de uso exclusivo hospitalar é vetado em ambientes de farmácias e drogarias, conforme prescrito pela RDC nº 44/09, no parágrafo único do artigo 74 (CRF, 2018; GILEAD, 2022).

Considerando o contexto clínico dos sujeitos imunocompetentes, diagnosticados com COVID-19, em alguns casos, o tempo entre o início dos sintomas e a internação pode ultrapassar 10 dias. Nesse cenário, a aplicação precoce de um tratamento antiviral tem sua eficácia reduzida, pois o paciente pode apresentar baixa carga viral, enquanto que a sua implementação tardia, possivelmente, pode levar a um quadro clínico no qual seja necessário o manejo do desconforto respiratório, um estado hiperinflamatório associado com outras complicações da COVID-19. Neste caso, o principal desafio das terapias antivirais reside em estabelecer uma janela segura e efetiva para iniciar a terapia medicamentosa, considerando ambos os cenários, ou seja, a necessidade de rápida implementação, afim de intervir diretamente na replicação viral, levando em consideração que a administração tardia de antivirais pode comprometer a efetividade dessa abordagem terapêutica (Rahmah *et al.*, 2022).

Dentro deste contexto, são imprescindíveis abordagens concomitantes para mitigar o risco de COVID-19 grave, e reduzir o impacto da doença nos sistemas de saúde, tendo em vista a possibilidade de uso de medicamentos antivirais orais que possam ser administrados fora do ambiente clínico, logo após a detecção de infecção e sintomas causados pelo SARS-CoV-2. É interessante salientar que o desenvolvimento, teste e autorização desses medicamentos devem ser vistos como uma estratégia complementar no manejo da COVID-19, e não como concorrentes da vacinação (Rahmah *et al.*, 2022).

Entretanto, devido aos desafios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, a produção de novas drogas antivirais específicas para SARS-CoV-2, com segurança e eficácia comprovada, podem levar anos. Dessa forma, o reposicionamento de fármacos já aprovados ou em estudos clínicos avançados para doenças com mecanismos de ação similares é uma

abordagem bem estabelecida, devido à redução no tempo e custo de desenvolvimento (Ferreira; Andricopulo, 2020), e tem sido amplamente utilizada na busca por inibidores específicos do SARS-CoV-2 (Yousefi *et al.*, 2021b). Dentre eles compreendem: interferons; antivirais; agentes imunossupressores; anti-helmínticos; dentre outros (Pandey *et al.*, 2020).

Vários produtos farmacêuticos foram reaproveitados para avaliação do potencial anti-SARS-CoV-2 em ensaios clínicos, incluindo remdesivir, inicialmente desenvolvido para o tratamento da hepatite C; cloroquina e hidroxicloroquina, medicamentos de uso estabelecido no tratamento da malária; tocilizumab, um anticorpo monoclonal usado na artrite reumatoide; favipiravir, droga anti-influenza; dentre inúmeros outros (Rodrigues *et al.*, 2022). Entretanto, segundo a literatura mais recente, muitos destes estudos ainda não apresentaram dados robustos que demonstrassem a eficácia de alguns desses agentes tanto como profilático, quanto como escolha terapêutica para a COVID-19, como é o caso dos antimaláricos (Saha; Bonnier; Chong, 2020), que obtiveram o uso clínico suspenso, considerando os efeitos adversos graves e fatais, a indisponibilidade de dados suficientes, ou ausência de eficácia comprovada (Banerjee *et al.*, 2023).

Entre os diversos mecanismos de ação antiviral, levando em consideração os complexos proteicos envolvidas nas etapas de replicação do SARS-CoV-2, há uma gama de alvos para agentes terapêuticos (Raj *et al.*, 2021), e à priori, qualquer proteína codificada pelo SARS-CoV-2 pode constituir um alvo válido e promissor. Dessa forma, a compreensão da estrutura, função e alvos celulares dessas proteínas possibilitam a identificação e reaproveitamento de moléculas capazes de modular suas atividades, culminando no desenvolvimento de tratamento específicos e eficazes para a COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2022).

Os análogos de nucleosídeos (ANs) (Dutta *et al.*, 2021), derivados sintéticos de purinas e pirimidinas cuja modificação química ocorre no açúcar e/ou na nucleobase (Borbone *et al.*, 2021), mimetizam nucleosídeos naturais, e são usados desde 1963, com a aprovação do uso de idoxuridina contra o vírus da herpes simples (Sticher *et al.*, 2020). Recentemente, diversos ANs tem sido estudados como agentes inibidores da replicação do SARS-CoV-2, pois danificam a estrutura da RNA polimerase dependente de RNA (do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp ou nsp12), proteína fundamental para síntese do genoma viral de diversos vírus de RNA, incluindo HCoVs como o SARS-CoV-2 (Tian *et al.*, 2021; Yousefi *et al.*, 2021).

O remdesivir havia sido inicialmente desenvolvido para combater a epidemia de Ebola, na África em 2013, e demonstrou eficácia contra HCoVs, incluindo o SARS-CoV-2, ao inibir a RdRp. Diante disso, esse medicamento foi o primeiro agente antiviral aprovado para o tratamento da COVID-19, em pacientes hospitalizados, ainda em 2020, inicialmente em caráter

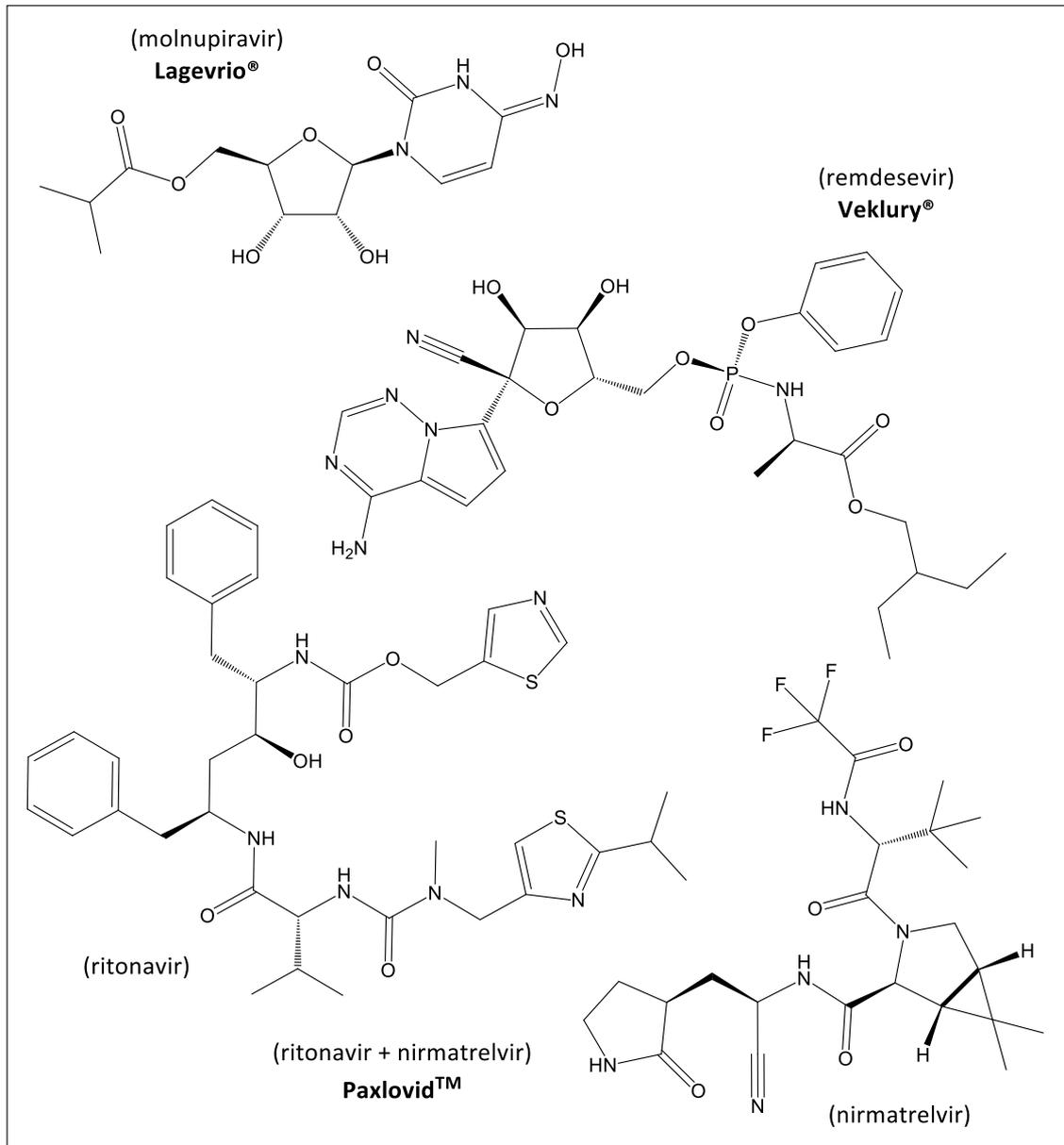
emergencial pelas agências reguladoras de inúmeros países como Estados Unidos, Japão e Índia (Chera; Tanca, 2022; FDA, 2023; Lamb, 2020). No Brasil, este também foi o primeiro medicamento com indicação aprovada para o tratamento da COVID-19, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em março de 2021. A administração do fármaco é por infusão intravenosa (Săndulescu *et al.*, 2023), com indicação terapêutica de pacientes adultos e adolescentes, que apresentem risco aumentado de progredir para caso grave de COVID-19 (Brasil, 2022a).

Além deste medicamento, o molnupiravir foi o primeiro antiviral oral a ser aprovado para uso como anti-SARS-CoV-2, em 4 de novembro de 2021 no Reino Unido em indivíduos adultos com teste diagnóstico positivo para COVID-19 e quadro clínico moderado (Syed, 2022); e mais tarde a associação nirmatrelvir-ritonavir recebeu autorização para a mesma finalidade. Atualmente, estes dois medicamentos são reconhecidos como os antivirais orais de primeira geração no combate a COVID-19, e sua aprovação pela OMS ainda se mantém, até então (Brasil, 2022b; Lamontagne *et al.*, 2020; Sendi *et al.*, 2022; WHO, 2022b). Os dados atuais indicam que os inibidores RdRP e M^{pro} têm uma barreira maior ao desenvolvimento de resistência do que a observada com anticorpos monoclonais anti-spike (Sendi *et al.*, 2022).

No Brasil, o molnupiravir teve seu uso aprovado em maio de 2022, contudo, com o encerramento da Declaração de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (Agência Senado, 2023), a regulamentação da ANVISA – Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 688/2022 – que estabelecia as diretrizes para a obtenção e manutenção das Autorizações de Uso Emergencial, perdeu a vigência. Como resultado, a fim de viabilizar a continuação da utilização de fármacos e medicamentos imunobiológicos aprovados por meio dessas autorizações, o mesmo órgão emitiu uma nova diretriz, a RDC 801/2023, que dispõe sobre a regulamentação que permite a utilização contínua dos produtos farmacêuticos que receberam autorização para uso emergencial durante a pandemia de COVID-19, como é o caso do molnupiravir, e também para solicitações futuras (Brasil, 2023a). No entanto, é necessário que as empresas solicitem o registro definitivo desses produtos para que possam continuar a ser produzidos em território nacional (Brasil, 2023b).

Dentro do escopo deste ambiente de constante transformação, na Figura 2 são apresentados os antivirais com recomendações favoráveis para tratamento da COVID-19, segundo informações compiladas das diretrizes OMS, cuja atualização mais recente é de 13 de janeiro de 2023 (Lamontagne *et al.*, 2020).

Figura 2 – Antivirais com recomendação favorável para o tratamento da COVID-19, segundo atuais diretrizes da OMS (Lamontagne *et al.*, 2020)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

É interessante destacar os desafios significativos enfrentados pela comunidade científica ao acompanhar as medidas sanitárias, aprovações de fármacos e vacinas relacionadas à COVID-19. A garantia da segurança e eficácia dos medicamentos, fármacos ou imunobiológicos, deve ser uma prioridade, entretanto, a complexidade reside na interseção entre o rigor científico e o contexto político-sanitário global. Na medida em que os pesquisadores se esforçam para conduzir estudos robustos e alcançar evidências sólidas, a demanda por uma resposta ágil à pandemia, muitas vezes, contrapõe-se com a necessidade de uma avaliação aprofundada. Além

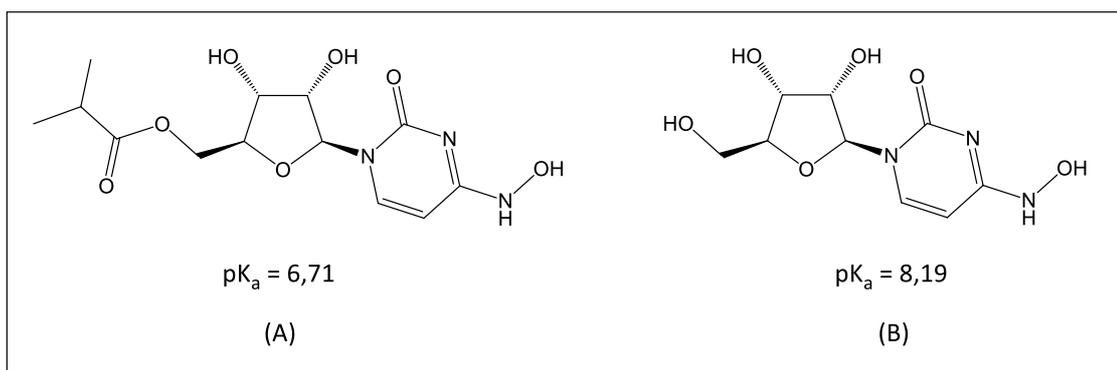
disso, a aprovação dos órgãos regulatórios torna-se um processo delicado, influenciado não apenas pela análise técnica, mas também por considerações políticas e econômicas. Essa interação complexa é ainda mais acentuada no âmbito nacional e internacional, no qual diferentes abordagens podem gerar divergências. A busca pelo equilíbrio entre a urgência das demandas e a integridade científica é uma tarefa árdua para a comunidade científica, ressaltando a necessidade de transparência, colaboração e coerência em meio a um cenário dinâmico e desafiador.

1.4 MOLNUPIRAVIR NO CONTEXTO DA PANDEMIA DE COVID-19

O uso emergencial do molnupiravir para o tratamento da COVID-19 foi aprovado pela ANVISA em maio de 2022, assim como também obteve aprovação no cenário internacional de diversas agências reguladoras, como a Agência Reguladora de Medicamentos e Produtos de Saúde (do inglês *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency*, MHRA), no Reino Unido; Agência Regulatória Europeia (do inglês *European Medicines Agency*, EMA); *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos (Fenton; Keam, 2022); pela OMS (OMS, 2023d) e está em uso em outros países (FIOCRUZ, 2023). No contexto brasileiro, o fármaco ainda não foi incorporado à Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), instrumento direcionador para a utilização de medicamentos e insumos no Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2022c, 2022d).

O molnupiravir (MK-4482, EIDD-2801), cuja estrutura química é apresentada na Figura 3.A, é um análogo da citidina cujos relatos na literatura demonstraram seu caráter promissor como um agente antiviral de amplo espectro (Cox; Wolf; Plemper, 2021; Painter *et al.*, 2021b; Rosenke *et al.*, 2020; Sheahan *et al.*, 2020; Wahl *et al.*, 2021). Segundo a nomenclatura da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o EIDD-2801 é denominado isobutirato de ((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(4-(hidroxiamino)-2-oxopirimidin-1(2H)-il)tetrahydrofuran-2-il)metila, cuja fórmula molecular corresponde a C₁₃H₁₉N₃O₇ (CAS 2492423-29-5) (MERCK, 2022). O molnupiravir é sintetizado sob a forma de pó fino, branco, com massa molar de 329,31 g mol⁻¹, apresenta valores de pKa equivalentes a -1,70 e 6,71, com solubilidade em água (5,8 mg mL⁻¹) (Annadi *et al.*, 2022).

Figura 3 – Fórmulas químicas do molnupiravir (A) e NHC (B)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Primeiramente desenvolvido pelos químicos da DRIVE (do inglês *Drug Innovation Ventures at Emory*), uma empresa sem fins lucrativos da *Emory University*, e posteriormente licenciada para a *Merck* e a *Ridgeback Biotherapeutics* (EMORY NEWS CENTER, 2022). A substância β -D-N⁴-hidroxicitidina (NHC, EIDD-1931), apresentada na Figura 3.B, também sintetizada inicialmente pela mesma organização sob a forma de um sólido cristalino branco, é um composto de fórmula molecular C₉H₁₃N₃O₆ (CAS 3258-02-4); de massa molecular igual a 259,22 g mol⁻¹; com solubilidade em água (34,4 mg mL⁻¹) (DRUGBANK, 2022), e valores de pKa equivalentes a -1,40 e 8,19 (CAS, 2022). Neste contexto, o molnupiravir é um pró-fármaco do NHC, composto que tem a capacidade de inibir a RNA polimerase do SARS-CoV-2 (Painter *et al.*, 2021b).

Um pró-fármaco é uma droga com baixo ou nenhum efeito terapêutico, entretanto, viabiliza o aumento na biodisponibilidade, seletividade, e redução da toxicidade em relação a sua forma ativa, que é regenerada através de biotransformação enzimática ou química *in vivo* (Chung; Ferreira, 1999). Em um estudo recente, contra os vírus influenza A e B, o molnupiravir demonstrou maior biodisponibilidade em relação ao NHC quando administrado por via oral, em furões e macacos *Cynomolgum*. Dessa forma, a grande maioria dos testes de eficácia relatados para estas drogas contra viroses *in vivo*, geralmente usam molnupiravir, e *in vitro*, o NHC (Toots *et al.*, 2019).

Além disso, há relatos do uso de NHC, na última década, como inibidor de diversos vírus causadores de uma série de doenças de interesse para a saúde pública, como o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus sincicial respiratório (RSV), vírus influenza A, vírus influenza B (Yoon *et al.*, 2018), vírus Chikungunya (CHIKV) (Ehteshami *et al.*, 2017), Ebola (Reynard *et al.*, 2015), vírus da diarreia viral bovina, vírus da hepatite C (Stuyver *et al.*, 2003), norovírus (Costantini *et al.*, 2012) e outros HCoVs, incluindo SARS-CoV (Barnard *et*

al., 2004), MERS-CoV e SARS-CoV-2 (Painter *et al.*, 2019; Pruijssers; Denison, 2019), e eficaz contra vírus resistentes ao remdesivir (Sheahan *et al.*, 2020).

Segundo atuais instruções da OMS, o tratamento com molnupiravir para COVID-19 é recomendado para pacientes não-hospitalizados com COVID-19 leve a moderado, sobretudo, com alto risco de internação hospitalar, incluindo algumas características como: falta de vacinação, imunodeficiências, doenças crônicas e pessoas idosas (Lamontagne *et al.*, 2020). Terapias antivirais, como o molnupiravir, tem maior eficácia nos estágios iniciais da infecção, logo, segundo Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health*, NIH) dos Estados Unidos, o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível e dentro de 5 dias após o início dos sintomas (NIH, 2023). Segundo Sendi e colaboradores (2022), isso pode configurar um desafio clínico, tendo em vista o acesso e o tempo de resposta para diagnóstico adequado. Além disso, os autores expressam que a adesão ao tratamento pode ser baixa, considerando o quantitativo de comprimidos que devem ser ingeridos pelo paciente, 4 cápsulas (4 x 200 mg) a cada 12 horas (Sendi *et al.*, 2022). Diversos estudos clínicos ainda estão em andamentos para avaliação de outras características pertinentes ao tratamento anti-SARS-CoV-2 com molnupiravir (Tian; Feng; Chen, 2023). Outras considerações sobre o fármaco são apresentadas no Quadro 2.

Tian e colaboradores (2023) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados sobre a eficácia e segurança do tratamento com molnupiravir para COVID-19, e concluíram que o medicamento pode acelerar a reabilitação em pacientes com a doença, entretanto, não reduz de maneira significativa a mortalidade e hospitalização. Neste estudo, os autores relatam que a administração de diferentes doses de molnupiravir, não melhorou de maneira eficaz a taxa de mortalidade em pacientes com COVID-19 quando comparadas ao grupo de controle. No entanto, destaca-se que a dose de 800 mg de molnupiravir administrada duas vezes ao dia, por cinco dias, apresentou uma maior eficácia na redução da mortalidade, em comparação com outras doses do medicamento (Tian; Feng; Chen, 2023).

Em relação à segurança, os autores relatam que o molnupiravir não apresentou diferenças significativas em eventos adversos em comparação com o grupo de controle, indicando um perfil de segurança adequado. No entanto, alguns pesquisadores levantaram preocupações sobre a capacidade de mutação do RNA provocada pelo molnupiravir, que poderia resultar em mutações no material genético dos pacientes. Os autores reconhecem que tais questionamentos necessitam ser abordados em pesquisas futuras (Tian; Feng; Chen, 2023). Conforme relatado por Sendi e colaboradores (2022), uma vez que o mecanismo antiviral do molnupiravir é a mutagênese letal, a Agência Europeia de Medicamentos concluiu que a falta

de potencial genotóxico não pode ser definitivamente excluída, embora o risco genotóxico possa ser considerado justificável no contexto do benefício clínico (Sendi *et al.*, 2022).

Por fim, os autores apresentam algumas limitações do estudo elaborado. Observa-se que há uma escassez de dados de mundo real (do inglês *real-world data*, RWD) que poderiam ter sido incluídos na análise (Liu; Demosthenes, 2022). Além disso, há uma lacuna significativa no tamanho da amostra, nos indicadores de resultado e na população dos ensaios clínicos randomizados abordados no estudo. Isso limita a abrangência e a generalização dos resultados obtidos. Os autores também destacam a impossibilidade de realizar análises de subgrupos com base em fatores de risco, como idade avançada e status de vacinação, o que poderia ter afetado a precisão das conclusões. Essas limitações ressaltam a necessidade de conduzir estudos adicionais de alta qualidade para confirmar as conclusões apresentadas (Tian; Feng; Chen, 2023).

Segundo Painter e colaboradores, estudos clínicos de Fase 1 em humanos, após a administração de molnupiravir, em dose única ou múltiplas doses, o NHC apresentou rápida aparição no plasma, com um tempo médio de concentração máxima observado entre 1,00 e 1,75 horas, e teve um declínio com meia-vida geométrica de cerca de 1 hora. Além disso, o tempo de meia-vida depende da dose, e pode variar de 0,907 a 7,08 h. O molnupiravir é rapidamente hidrolisado no plasma em NHC, e em seguida, após distribuição em vários tecidos, é convertido por quinases do hospedeiro, em uma série de fosforilação (mono, di e trifosfato) em três etapas, em NHC-5'-trifosfato, o composto ativo que se dirige até à RdRp, enzima essencial na replicação viral, e através dessa incorporação ao genoma viral, conduz ao aumento da taxa de mutação viral além de um limite biologicamente tolerável. A meia-vida intracelular do NHC-5'-trifosfato apresentou variação, indo de 3 horas em células Huh-7, uma linhagem celular do fígado humano, até 6,6 horas em tecido pulmonar de camundongo (Painter *et al.*, 2021b). Ainda considerando o mecanismo de ação, a hidrólise do molnupiravir em NHC, no plasma, é realizada pela enzima CES2 (carboxilesterase 2), cuja distribuição em tecidos como rins e intestinos é significativa. Isso contribui para a eficácia do molnupiravir em locais em que o vírus pode estar se replicando. Além disso, vale destacar que os detalhes completos das quinases envolvidas na fosforilação ainda necessitam de mais investigação (Yan; Yan, 2023).

O mecanismo de ação anti-SARS-CoV-2 do molnupiravir é apresentado por meio do esquema da Figura 4. O vírus SARS-CoV-2 entra na célula hospedeira por meio do receptor ACE2 e a tradução RdRp é iniciada pelo ribossomo da célula hospedeira (1). A enzima viral RdRp é usado para replicar o RNA genômico viral, processo em que ocorre a competição entre o NHC-5'-trifosfato e os nucleosídeos naturais (2), resultando na incorporação incorreta do

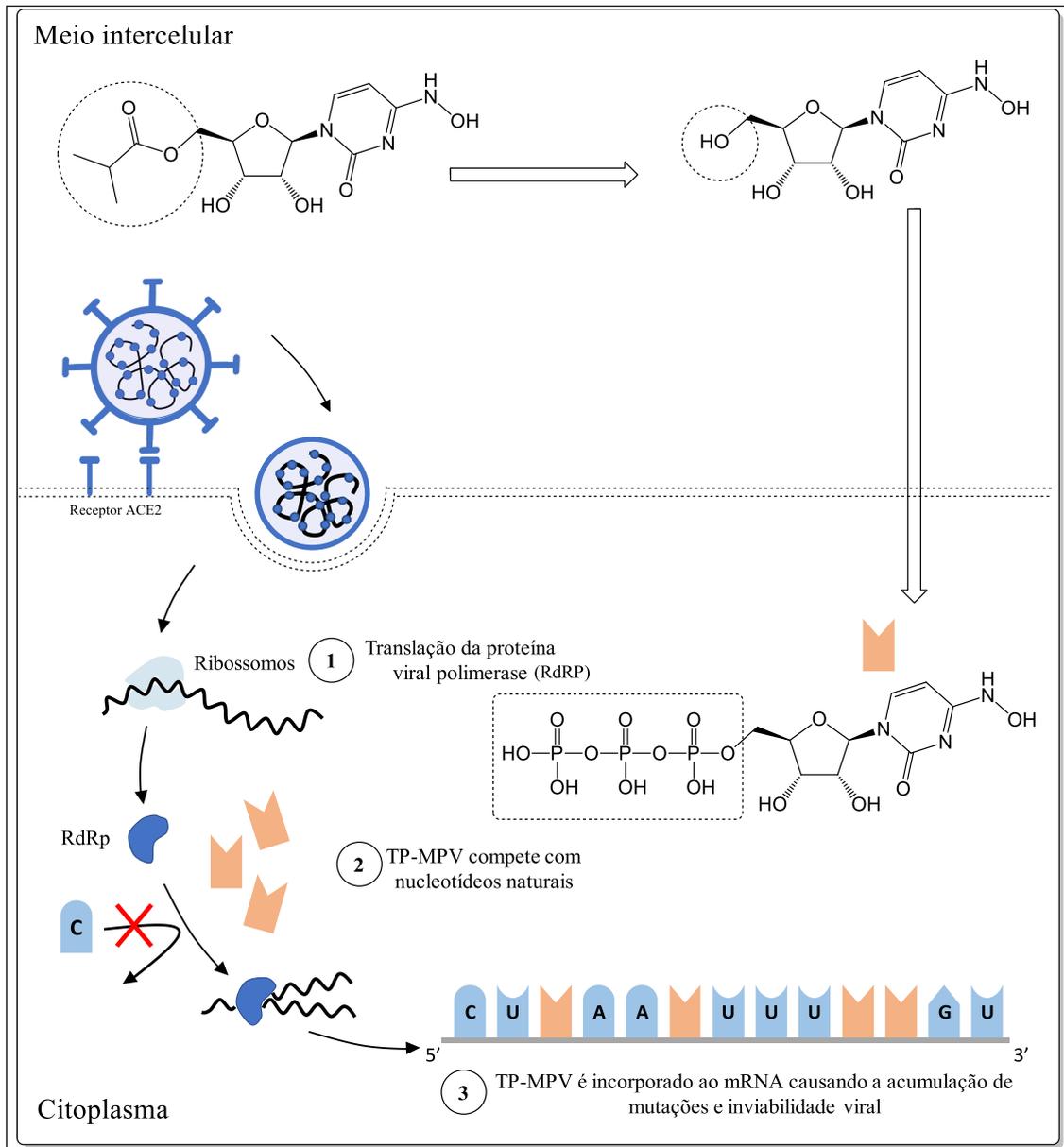
nucleosídeo e, conseqüentemente, causando mutagênese letal do vírus (3) (Masyeni *et al.*, 2022). Alguns autores associam a catástrofe na replicação viral ao tautomerismo, N-hidrolilamina e oxima, presente na estrutura química do molnupiravir, que possibilita a interação do fármaco, de maneira simultânea, aos nucleotídeos guanidina e adenosina no processo de replicação do genoma do SARS-CoV-2 (Malone; Campbell, 2021).

Quadro 2 - Algumas características farmacológicas do molnupiravir

Dosagem dependendo da idade e peso corporal	Administração de 800 mg a cada 12h, sem adaptação ao peso para indivíduos com idade \geq 18 anos.
Número de comprimidos por dose	4 cápsulas (4 x 200 mg)
Duração do tratamento	5 dias
Influência dos alimentos na absorção	Não listado
Adaptação da dose de acordo com a função renal	Sem ajuste de dose
Adaptação da dose de acordo com a função hepática	Sem ajuste de dose
Contraindicação	Não listado
Avisos	Toxicidade embriofetal, toxicidade óssea e cartilaginosa; hipersensibilidade aos ingredientes.
Advertência aos indivíduos com potencial reprodutivo	Mulheres: Use contraceptivos durante o tratamento e por 4 dias após a última dose. Homens: Use contraceptivos durante o tratamento, e por um tempo maior que 3 meses após a última dose
Gravides e lactação	Não recomendado
Efeitos colaterais mais comuns	Diarreia, náusea e tontura

Fonte: Adaptado (Sendi *et al.*, 2022).

Figura 4 – Esquema ilustrativo da indução de mutagênese letal por molnupiravir durante a replicação do SARS-CoV-2



C: citosina, A: adenina, G: guanina, U: uracil, MPV: molnupiravir, TP-MPV: NHC-5'-trifosfato, ACE2: enzima conversora de angiotensina 2.

Fonte: Adaptado de (Masyeni *et al.*, 2022)

Diante destas considerações, os antivirais orais, como pioneiro molnupiravir, oferecem uma opção terapêutica contra a COVID-19, sendo de fácil manuseio clínico em relação aos anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 e ao remdesivir intravenoso, sendo, portanto, objeto de estudo deste trabalho.

1.5 BREVE HISTÓRICO DO MOLNUPIRAVIR

A descoberta e o desenvolvimento pioneiro do molnupiravir ocorreram quando os pesquisadores liderados por George Painter, diretor da *Emory Institute of Drug Development* (EIDD), e CEO da *Drug Innovation Ventures at Emory* (DRIVE), uma subsidiária integral da Emory University, em 2013, estavam à procura de um medicamento antiviral oral para o tratamento da infecção pelo vírus da encefalite equina venezuelana (do inglês *Venezuelan equine encephalitis virus*, VEEV) (Tian *et al.*, 2022). À época, haviam muitos relatos da ocorrência de casos espalhados dessa zoonose principalmente na América Central e do Sul, de maneira que essa família de vírus capaz de infectar humanos, foi considerada potenciais armas biológicas, dado que as infecções tem uma alta taxa de mortalidade (Painter *et al.*, 2021a).

Diante disso, para o desígnio dos cientistas, uma triagem de compostos análogos de ribonucleosídeo contra alfavírus foi realizada pela DRIVE, levando a identificação da β -D-N⁴-hidroxicitidina, denominada internamente pelo grupo como EIDD-1931. Diversos estudos corroboraram para a hipótese destes pesquisadores, pois haviam relatos do uso de EIDD-1931 que demonstraram a atividade e perfil de citotoxicidade favorável em modelos de cultura de células para este composto como um agente antiviral promissor para o tratamento da infecção provocada pelo VEEV, bem como o vírus Chikungunya (Painter *et al.*, 2021a).

Ainda que considerado um agente antiviral de amplo espectro, estudos demonstraram que logo após a administração por via oral, o EIDD-1931 era metabolizado nas células intestinais de primatas não humanos (Tian *et al.*, 2022), inviabilizando sua aplicação como um agente antiviral. Tal limitação foi contornada por meio da síntese de um pro-fármaco de EIDD-1931, designado pela DRIVE como EIDD-2801. Essa estratégia promoveu o deslocamento do fármaco através da parede interna do intestino, sendo entregue com maior eficácia ao sistema circulatório de todas as espécies testadas, incluindo primatas não humanos. Diante disso, o EIDD-2801, que mais tarde recebeu o nome genérico de molnupiravir, tornou-se um candidato ao desenvolvimento para uso clínico (Painter *et al.*, 2021a).

Anteriormente a pandemia de COVID-19, o molnupiravir estava em estágio de desenvolvimento pré-clínico para o tratamento da influenza sazonal, cuja pesquisa obteve intervenção de algumas agências de financiamento como a Agência de Redução de Ameaças de Defesa (do inglês *Defense Threat Reduction Agency*, DTRA) e o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (do inglês *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), que apoiaram a descoberta e o desenvolvimento do EIDD-2801 como contramedidas ao VEEV, desde 2016 (Painter *et al.*, 2021a).

Todavia, nesse ínterim, com o agravamento da crise sanitária provocada pela pandemia de COVID-19, o plano de desenvolvimento clínico sofreu alterações pois os pesquisadores da DRIVE e do EIDD perceberam que o molnupiravir tinha potencial ação contra coronavírus. Logo, recursos adicionais seriam necessários para o devido delineamento da investigação. Diante disso, foi celebrado um acordo de licenciamento com a *Ridgeback Therapeutics*, uma empresa de biotecnologia, que assumiu as pesquisas concernentes ao tratamento da infecção por Influenza, em março de 2020, e no mês consecutivo daquele mesmo ano incumbiu-se pelo tratamento de infecções patogênicas por coronavírus (Painter *et al.*, 2021a). Com isso, para o tratamento de infecção causada pelo SARS-CoV-2 houve um redirecionamento dos ensaios clínicos de molnupiravir como potencial medicamento terapêutico oral para pacientes com COVID-19 não hospitalizados (Tian *et al.*, 2022).

Em maio de 2020, as empresas *Merck* e *Ridgebarck* firmam um acordo pelo desenvolvimento do molnupiravir, iniciando os testes clínicos de fase 2 e fase 3 ainda em setembro daquele mesmo ano. Então, em novembro de 2021, o Reino Unido torna-se o primeiro país a aprovar o molnupiravir para o tratamento da COVID-19, seguido dos Estados Unidos que recebeu a autorização para o tratamento da infecção por SARS-CoV-2 em dezembro de 2021 (Eastman, 2023).

Segundo Painter, a celeridade com a qual o programa clínico para o molnupiravir se desenvolveu pode estar associada, dentre outros fatores, a colaboração das empresas e patrocinadores, bem como os esforços das agências reguladoras dos países supracitados. Tendo em vista que em condições padrão da indústria, o avanço dos testes clínicos de Fase 1 para implementação da Fase 2, que levaram nove semanas, se estenderiam por cerca de nove meses sem essas diligências. Outrossim, as características favoráveis do molnupiravir em consonância com as exigências da saúde pública, e os estudos previamente realizados que não estavam relacionados diretamente com o campo clínico, e que incluíam testes em distintas doenças virais, são alguns dos aspectos que corroboraram para a agilidade na implementação e elaboração dos dados necessários para o avanço dos estudos clínicos do molnupiravir (Eastman, 2023).

Uma vez apresentados os acrônimos dos fármacos comumente relatados na literatura até então, a saber: MK-4482 e EIDD-2801, nesta dissertação o molnupiravir será designado por MPV, quando conveniente, e o β -D-N⁴-hidroxicitidina relatado como EIDD-1931, será atribuído neste texto somente por NHC.

1.6 SÍNTESE DO MOLNUPIRAVIR

Diversos autores já relataram metodologias de síntese total (ST) (Nicolaou; Sorensen, 1996) para o molnupiravir, tendo como precursores Painter e colaboradores que, em 2019, registraram duas patentes para ST dessa substância, processada em cinco etapas com rendimento global inferior a 17% (PAINTER *et al.*, 2019). Desde então, há variados relatos de novas propostas para a sua ST, utilizando diferentes materiais de partida, em processos químicos, como a D-ribose, uridina, e a citidina (Venkatanarayana *et al.*, 2023), ou biocatalíticos, mediante processos mediados por enzimas (Cruz *et al.*, 2022), ambos, no intuito de maximizar o rendimento global, visando um menor custo associado à redução no número de etapas (Braga *et al.*, 2021).

Neste contexto, alguns trabalhos relatam a presença de NHC como um subproduto da rota sintética proposta, atribuída pelos autores a etapa de desproteção do grupo protetor acetônio, em meio ácido (Fier *et al.*, 2021; Gopalsamuthiram *et al.*, 2021; Steiner *et al.*, 2020). Diante disso, é imperativo que, no processo de desenvolvimento de métodos analíticos altamente seletivos, a ocorrência hipotética desta potencial impureza seja devidamente considerada em insumos e produtos farmacêuticos, ou em outras matrizes relacionadas ao molnupiravir.

Mesmo diante dessas possibilidades, matérias-primas provenientes de diferentes metodologias de ST não foram consideradas por indisponibilidade de acesso. Logo, no que concerne a amostra da matéria-prima de molnupiravir utilizada neste trabalho, o protocolo para sua ST foi descrito por Pereira e colaboradores (2022), envolvendo apenas duas etapas de preparação com 68% de rendimento global máximo. Como indicado pelos autores, conforme apresentado no Quadro 3, diante das outras metodologias reportadas na literatura envolvendo a ST a partir da uridina (Dey *et al.*, 2021; Fier *et al.*, 2021; PAINTER *et al.*, 2019), até então, esse protocolo sintético tem como vantagem: o tempo total de duração; a aplicação de reagentes comuns, de fácil extração; bem como a possibilidade de realização de experimentos em escala multigramas, com reprodutibilidade satisfatória. Além disso, o protocolo de purificação envolve apenas extração líquido-líquido e recristalização na última etapa (Pereira *et al.*, 2022), procedimentos que viabilizam a implementação em larga escala. Dos trabalhos dispostos no Quadro 3, nenhum dos autores apresentaram informações adicionais sobre a formação de produtos secundários, com exceção de Fier e colaboradores (2021) (Fier *et al.*, 2021).

Quadro 3 – Comparação de rotas sintéticas totais do molnupiravir a partir da uridina

Parâmetro	(a)	(b)	(c)	(d)
Rendimento global	<17%	57%	62%	68%
Etapas	5	5	2	2
Tempo total	> 40h	> 35h	> 12h	4,5h
Protocolos de purificação	SCL	ELL	SCL	Apenas ELL, recristalização
Etapas de ativação	Inserção de 1,2,4-triazol	Inserção de 1,2,4-triazol	Formação de intermediário de tiouridina	Não foi necessário

SCL: separação por coluna cromatográfica; ELL: extração líquido-líquido; (a): (PAINTER *et al.*, 2019); (b): (Fier *et al.*, 2021); (c): (Dey *et al.*, 2021); e (d) (Pereira *et al.*, 2022).

Fonte: Adaptado de (Pereira *et al.*, 2022)

O procedimento reportado por Pereira e colaboradores (2022), demonstra que o protocolo para ST de molnupiravir, obtém uma matéria-prima com pureza acima de 99%, a partir dos dados relatados de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (Pereira *et al.*, 2022).

Diante dessas considerações, além do aprimoramento nas metodologias sintéticas, o protocolo reportado para a síntese da matéria-prima de molnupiravir, aplicada nesta investigação, tem alto potencial de implementação na indústria farmacêutica, fomentando a elaboração de metodologias analíticas para o controle de qualidade desse insumo.

1.7 DEGRADAÇÃO FORÇADA

A comercialização de um novo medicamento é regida pelos conceitos de farmacovigilância, que vigoraram mundialmente a partir do século XX (Rozenfeld; Rangel, 1988), e que norteiam os parâmetros que asseguram a qualidade deste produtos, uma abordagem relativa que leva em consideração a relação risco/benefício no uso de determinado fármaco (Botelho; Reis, 2015; MIRCO; ROCHA, 2015). Além da eficácia terapêutica dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs), é preciso garantir a estabilidade das formulações farmacêuticas, definida pela OMS como a capacidade de manter suas características químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas especificadas durante todo o prazo de validade (OMS, 1996).

A compreensão dos fatores que afetam a estabilidade é de fundamental importância para a saúde dos pacientes, visto que sua perda remete a redução do efeito terapêutico ou à formação de produtos de degradação tóxicos (FACCI *et al.*, 2020). Dessa forma, estudos de estabilidade química fornecem um banco de dados que auxiliam: no desenvolvimento adequado da formulação farmacêutica, a fim de minimizar as interações fármaco-excipiente; no monitoramento de decomposição tóxica; na seleção de embalagens que maximizem a vida útil do produto; na compreensão das melhores condições de armazenamento e do prazo de validade. Diante destas informações, os órgãos regulatórios são capazes de verificar os parâmetros da qualidade desde a produção até a manutenção destes produtos no mercado (Bajaj; Singla; Sakhuja, 2012; Blessy *et al.*, 2014).

A partir da necessidade de padronização, regulamentação da produção, controle de qualidade e registro de fármacos para uso humano, o comitê criado em 1990, *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), implementou uma série de condutas que foram adotadas pelo setor farmacêutico no intuito de proteger a saúde dos usuários contra danos causados pela presença de impurezas nas formulações (Silva *et al.*, 2009). Para facilitar a comercialização diante da variabilidade climática, houve a separação do mundo em quatro Zonas Climáticas (I-IV) na qual cada uma possui suas diretrizes para condução dos estudos de estabilidade, dado a dependência com os fatores ambientais. O Brasil pertence a Zona Climática IV-B, caracterizado pelo clima quente e muito úmido, e desde então a legislação nacional para o registro de medicamentos convergiu para se adequar as orientações das agências reguladoras internacionais (Oriqui *et al.*, 2011).

No Brasil, para a condução de estudos de estabilidade as indústrias farmacêuticas devem seguir as normas vigentes descritas na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 318/2019 (BRASIL, 2019a) da ANVISA, desenvolvida com base no guia Q1A (R2) do ICH (ICH-Q1A(R2), 2003), que estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de IFAs, conforme a RDC nº 45/2012 (BRASIL, 2012); ou medicamentos, exceto biológicos, segundo a RDC 53/2015 e o Guia 4/2015 (BRASIL, 2017). A RDC 318/2019 prevê a realização de diferentes tipos de estudos, que além dos fatores ambientais levam em consideração as próprias condições experimentais, sendo subdivididos em: estudo de estabilidade acelerado, de acompanhamento, de longa duração, em uso, reduzido; estudo de fotoestabilidade e estudo de degradação forçada (EDF) (FACCI *et al.*, 2020).

Em um EDF há a exposição do IFA ou do produto acabado a condições de estresse, mais severas que as condições de estabilidade acelerada, sob ação de agentes externos como: luz, temperatura, calor, umidade, solução ácida, básica, oxidante; e íons metálicos. Preconiza-se que

nestes EDFs a degradação ocorra em extensão satisfatória, ou seja, não extensiva ou completa da amostra, a fim de avaliar a formação de produtos de degradação (PDs) que compõe o perfil potencial de degradação, que podem ou não estar presentes durante os estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2017).

Embora haja diversos guias regulatórios, nacionais e internacionais, acerca da necessidade e aplicabilidade de EDFs, não há um consenso sobre os *endpoints*, as melhores condições experimentais considerando o tempo de exposição, a temperatura e concentração do agente degradante a que o fármaco ou IFA deva ser submetido. Dessa forma, é preciso circunspeção para obtenção de um perfil de degradação factível, tendo em vista o caráter estrutural intrínseco de cada IFA e formulação avaliada (Da Costa *et al.*, 2018), sendo recomendada que a quantidade degradada esteja entre 5-20% (Blessy *et al.*, 2014). Diversos autores já demonstraram de forma racional a execução de tais testes (Baertschi; Alsante; Reed, 2011; Blessy *et al.*, 2014; Husain, 2016; Huynh-Ba, 2009), de modo que as condições típicas de estresse são fornecidas pela Série de Relatórios Técnicos da OMS, nº 929 de 2005 (OMS, 2005), conforme apresentado no Quadro 4.

Quadro 4 – Condições típicas de estresse em estudo de estabilidade de pré-formulação

Fator de estresse	Condições	Concentração do IFA	Tempo
Calor	60 °C	1:1 com diluente	1–10 dias
Umidade	75% de UR ou superior	Fase sólida	1–10 dias
Ácido	HCl (0,1 mol L ⁻¹)	2:1 em HCl	1–10 dias
Básico	NaOH (0,1 mol L ⁻¹)	2:1 em NaOH	1–10 dias
Oxidação	H ₂ O ₂ (3% v/v)	1:1 em H ₂ O ₂	1 – 3 horas
Fotólise	Lâmpada fluorescente de iodetos metálicos, Hg, Xe ou UV-B	1:1 com diluente	1–10 dias
Íons metálicos (opcional)	Fe ²⁺ ou Cu ²⁺ (0,05 mol L ⁻¹)	1:1 com solução de íons metálicos	1–10 dias

UR – umidade relativa; HCl – ácido clorídrico; NaOH – hidróxido de sódio; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio.

Fonte: Adaptado de (OMS, 2005).

Os estudos de PDs são solicitados pela ANVISA às indústrias farmacêuticas no momento de registro, pós-registro e renovação de um medicamento no Brasil, entre outros

(ARANTES, 2018). Ademais, os EDFs configuram uma etapa fundamental no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade, capazes de quantificar o IFA sem interferência de impurezas, PDs e excipientes (Alsante *et al.*, 2007), característica prescrita pela ANVISA segundo a RDC 166/17, que dispõe sobre validação de métodos analíticos (Brasil, 2017a).

1.8 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (do inglês *capillary electrophoresis*, CE) é uma técnica analítica de separação que tem por fundamento a migração distinta de íons solvatados, sob a influência de um campo elétrico aplicado em uma solução eletrolítica contida em um tubo capilar (Oliveira *et al.*, 2012).

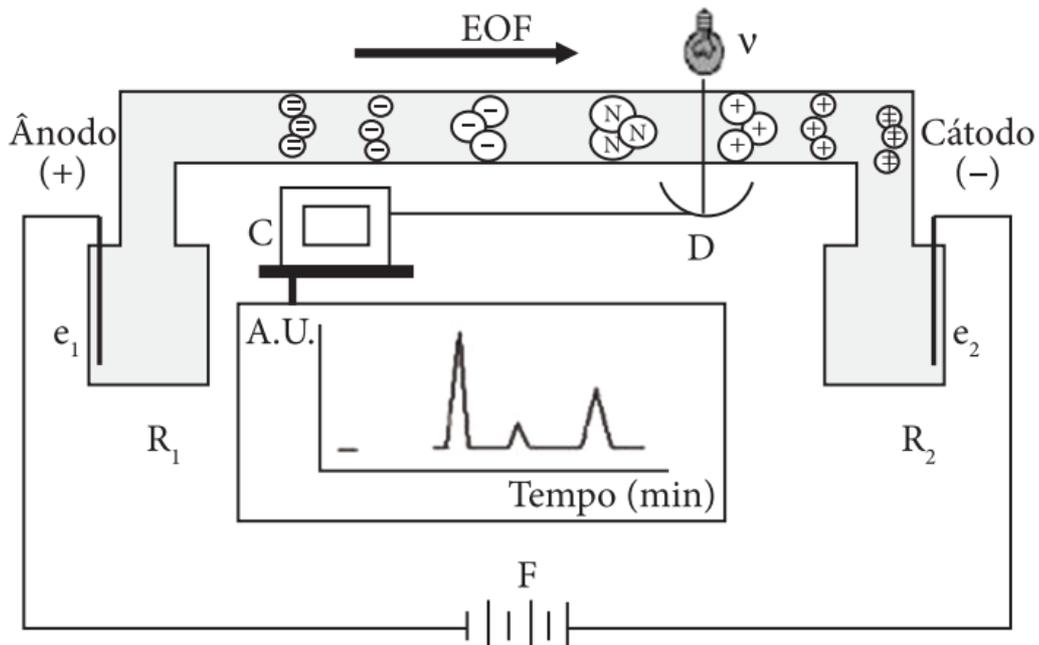
Em suma, a separação é operada em capilares de sílica fundida, preenchidos com solução eletrolítica ou eletrólito de corrida (do inglês *background electrolyte*, BGE), geralmente empregando tubos de 15 a 100 μm de diâmetro interno (d.i), de maneira que o uso de capilares nesta dimensão, podem aumentar significativamente a dissipação de calor, e por sua vez, minimizar o espalhamento da zona devido à difusão convectiva (Tavares, 1996). Logo, altas tensões podem ser aplicadas, proporcionando separações com alta eficiência em um curto tempo de análise.

Além disso, diante de outras técnicas analíticas de separação convencionais, a CE é vantajosa pois: requer pequeno volume de amostra; pouca quantidade de reagentes, considerando o uso e descarte, sobretudo de solventes orgânicos; é essencialmente versátil, proporcionando a separação de analitos polares e apolares, ionizáveis, e com peso molecular distintos (Baker, 1995), porventura simultaneamente; e muitas vezes não demanda de nenhum tratamento prévio das amostras antes da injeção (Oliveira *et al.*, 2012).

Embora apresente tais vantagens, a CE apresenta algumas limitações pois não é adequada para determinação de compostos voláteis, apolares e de baixa massa molar, sendo a cromatografia a gás uma técnica de melhor escolha. Além disso, a análise de polímeros não-iônicos de alta massa molar obtém melhor desempenho em cromatografia líquida (De Queiroz; Jardim, 2018).

Uma representação simplificada de um sistema de eletroforese capilar é denotada pela Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática de um sistema de CE



Fonte: SPUDEIT *et al.* (2012).

A técnica de CE também se destaca pela sua simplicidade instrumental, conforme Figura 5, sendo que os principais componentes deste sistema compreendem: fonte de alta tensão (F) que estabelece um campo elétrico ao longo do capilar, e é conectada aos frascos reservatórios (R₁ e R₂), contendo o eletrólito conveniente e/ou amostra, por meio de um par de eletrodos (e₁ e e₂), geralmente de platina. Por sua vez, o capilar, preenchido com o mesmo eletrólito, atua como contato elétrico entre os reservatórios, funcionando como um canal de migração quando suas extremidades estão imersas nas soluções contidas nos reservatórios. O vetor EOF representa o fluxo eletrosmótico (do inglês *electroosmotic flow*, EOF), observado após aplicação da diferença de potencial. Há ainda um detector (D); um computador (C) para controle, aquisição, e tratamento dos dados, que são registrados graficamente por meio de um eletroferograma, mediante a resposta do detector em função do tempo; e cada um dos três picos presentes no eletroferograma representam solutos separados detectáveis (Baker, 1995; Spudeit; Dolzan; Micke, 2012).

Embora não esteja representado na Figura 5, devido a simplificação na ilustração, o cartucho é um componente fundamental nas análises por CE, pois minimiza efeitos térmicos, dado que o capilar é mantido à temperatura constante em seu interior (Tavares, 1996). A ineficiência na dissipação do calor pelo efeito Joule, pode provocar aumento da temperatura interna do capilar, impactando negativamente o desempenho analítico. Esse efeito pode resultar

em alterações na viscosidade do tampão e, por consequência, na velocidade de migração dos analitos, comprometendo assim a precisão e eficiência das separações realizadas por CE (Tagliaro *et al.*, 1998).

A adaptação da modalidade de eletroforese de zona diante da separação de uma variedade de compostos, confere à técnica de eletroforese capilar a disponibilidade de mecanismos de separação e seletividade peculiares, como: Eletroforese Capilar de Zona (do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), sendo este o mais utilizado; Cromatografia Capilar Eletrocinética (do inglês *electrokinetic capillary chromatography*, EKC); Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar (do inglês *micellar electrokinetic capillary chromatography*, MEKC); dentre outros (Baker, 1995; Silva *et al.*, 2007; Tavares, 1996).

1.8.1 Princípios da separação de CE de zona em solução livre

A eletroforese de zona em solução livre, realizada em capilares de sílica fundida, uma terminologia menos usual, também é reconhecida como CZE. Embora EKC e MEKC apresentem suas particularidades, os fundamentos teóricos da CZE também se aplicam a ambas as técnicas (Tavares, 1996).

Em CZE o capilar é preenchido com eletrólito, caracterizado por composição constante e alta capacidade tamponante. Após a injeção da amostra, no interior do capilar preenchido, quando a voltagem constante é aplicada, os solutos migram, em determinada direção e sentido, através do capilar em zonas, ou seja, cada zona migra autonomamente, porém a velocidades constantes. Diante disso, os analitos apresentam taxas de migração diferenciadas, e a separação se processa mediante as mobilidades eletroforéticas características (Baker, 1995; Tavares, 1996), havendo a separação simultânea de solutos aniônicos e catiônicos, no entanto, solutos neutros não são separados entre si.

A mobilidade de uma espécie iônica carregada (μ_i) pode ser descrita pela Equação 1 (Tavares, 1996):

$$\mu_i = \frac{|z_i|e}{6\pi\eta r_i} \quad (1)$$

em que z_i representa a magnitude da carga do íon, η é a viscosidade do meio, r_i é o raio iônico solvatado, e a carga elementar e (Baker, 1995).

Mediante a influência de um campo elétrico externo (E), uma espécie iônica irá migrar com velocidade eletroforética (v_{ep}), em cm s^{-1} , a uma taxa proporcional a sua mobilidade eletroforética (μ_{ep}), através do eletrólito conforme a Equação 2 (Baker, 1995).

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (2)$$

Considerando solutos com distintas mobilidades eletroforéticas, subsequentemente a aplicação do potencial, o sentido do movimento desses compostos no interior do capilar seria simplesmente orientado para o eletrodo de carga oposta, em uma situação descrita pela ausência do fluxo eletrosmótico. Logo, ânions seriam atraídos pelo ânodo, eletrodo carregado positivamente e não atravessariam o detector, retornando ao reservatório de origem. Como consequência, para análise síncrona de espécies de cargas opostas, duas corridas seriam necessárias, uma tensão com polaridade para analisar cátions, e outra com polaridade invertida, para monitoramento de ânions. Nota-se que solutos neutros não se moveriam no interior do capilar em nenhum dos casos (Baker, 1995).

Diante disso, a separação das espécies ionizáveis, cátions e ânions solvatados, e compostos neutros, em uma mesma corrida por CZE, é fundamentada pela presença do EOF. Neste fenômeno, além dos analitos, o eletrólito também se move no interior do capilar sob a influência de um campo elétrico, característica crucial em alguns mecanismos de separação em CE (Baker, 1995), demonstrando que o campo elétrico aplicado não é a única força a atuar sobre os solutos (Landers, 2008). Quando operado em modo normal, o EOF está no sentido do cátodo, eletrodo carregado negativamente. Geralmente, a mobilidade do EOF é superior à dos ânions, e dessa forma, os compostos de carga negativa são deslocados no sentido do detector. Logo, a separação de íons e compostos neutros é viabilizada, entretanto, não há a separação de compostos neutros entre si (Baker, 1995).

A velocidade do EOF (v_{eo}) é representada pela Equação 3 (Baker, 1995).

$$v_{eo} = \mu_{eo}E \quad (3)$$

A mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}), apresentada na Equação 4, depende com exclusividade das características do eletrólito, como a constante dielétrica do tampão utilizado (ϵ), viscosidade, pH (potencial hidrogeniônico), concentração, e do potencial zeta (ζ), que é influenciado pela espessura da dupla camada elétrica e pela carga superficial presente nessa

interface da parede interna do capilar. A μ_{eo} independe do campo elétrico aplicado (Baker, 1995).

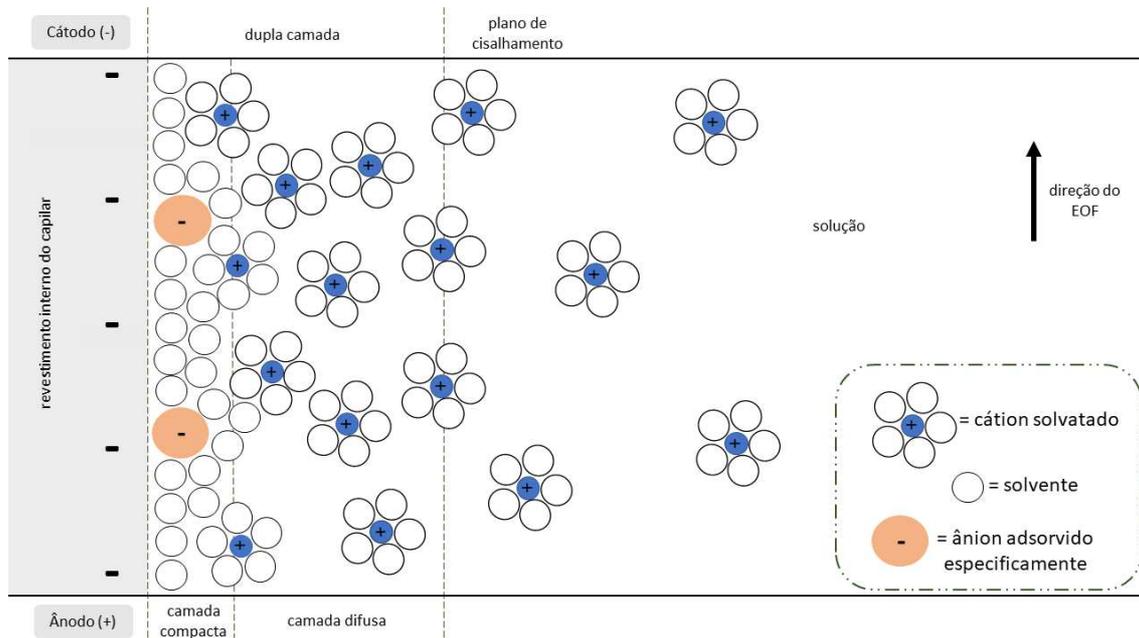
$$\mu_{eo} = -\frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (4)$$

Analisando a composição química dos capilares de sílica fundida, geralmente empregados em CE, uma parcela dos grupos silanóis (Si-OH) podem ser ionizados em contato com o eletrólito, havendo um acúmulo de cargas negativas na superfície interna do capilar. Como consequência, uma distribuição não-homogênea de cargas positivas se acumula nas proximidades dessa superfície, formando uma dupla camada elétrica. Para intensificação desse processo de ionização, o capilar é lavado com solução de hidróxido de sódio, seguido do eletrólito (Tavares, 1996).

Após esse processo, os íons mais próximos da superfície interna do capilar são atraídos fortemente pela interação eletrostática, compondo a camada compacta da dupla camada elétrica. À medida em que a distância radial da superfície aniônica aumenta, a atração dos cátions presentes no eletrólito é reduzida, até que esse acúmulo de cargas proveniente da atração eletrostática se reduza a concentração do eletrólito, delimitando a região da dupla camada elétrica, denominada camada difusa. Nas imediações da região limite definida por essa camada, define-se o plano de cisalhamento, e as espécies catiônicas não sofrem atração eletrostática significativa da superfície aniônica do capilar nessa porção da dupla camada elétrica (Tavares, 1996).

Assim, quando um campo elétrico é aplicado, o íon e a sua esfera iônica são acelerados até que haja um equilíbrio entre a força elétrica e as forças de atrito, e a partir de então, o íon migra a velocidade constante. Esse fenômeno é ilustrado na Figura 6, em uma perspectiva bidimensional. Dessa forma, quando os cátions, dessa camada móvel, estão sob influência de um campo elétrico, serão atraídos no sentido do cátodo, polo negativo. Assim, há o arraste dos cátions junto ao eletrólito, pois a maioria desses cátions estão solvatados, provocando a migração tanto dos compostos quanto do solvente presente no eletrólito, fenômeno que descreve o EOF (Tavares, 1996).

Figura 6 – Modelo proposto para descrever a região da dupla camada elétrica, a interface capilar-solução



Fonte: Adaptado de (Bard; Faulkner, 2011; Tavares, 1996)

A determinação experimental da μ_{eo} pode ser feita mediante a injeção de um composto neutro, dado que este não sofre influência do E , ou por meio do sinal do EOF, identificado no eletroferograma. Verificados o tempo de migração (t_m) do composto neutro ou do EOF, conhecendo a voltagem aplicada e as dimensões do capilar, a mobilidade eletroosmótica pode ser calculada de acordo com a Equação 5 (Baker, 1995):

$$\mu_{eo} = \frac{L_{ef}L_{tot}}{t_{eo}V} \quad (5)$$

em que L_{ef} e L_{tot} são, respectivamente, o comprimento efetivo e total do capilar; V é a voltagem aplicada; e t_{eo} é o tempo de migração do composto neutro ou do EOF.

As espécies iônicas que migram através do capilar sob influência do campo elétrico, são carregadas com mobilidades intrínsecas, dada pela Equação 1, cujo valor é diretamente proporcional a relação carga/raio do soluto $\left(\frac{|z_i|e}{r_i}\right)$, influenciando de maneira proporcional na magnitude da mobilidade eletroforética. Assim, outra maneira de considerar a mobilidade eletroforética é por meio da razão estabelecida entre a velocidade limite (v_i) da espécie iônica e um campo elétrico aplicado (E) de valor unitário. Considerando a definição do campo elétrico como o quociente entre a voltagem aplicada (V) e o comprimento total do capilar (L_{tot}), a μ_{ep} também pode ser descrita pela Equação 6 (Baker, 1995).

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{v_{ep}L_{tot}}{V} \quad (6)$$

A partir de então, identifica-se que não somente a velocidade eletroforética influencia na migração do soluto, adquirindo como componente a velocidade electrosmótica. Desse modo, a influência simultânea da velocidade electrosmótica e eletroforética pode ser descrita pela velocidade eletroforética observada (v_{obs}), a partir da Equação 7 (Baker, 1995).

$$v_{obs} = v_{ep} + v_{eo} \quad (7)$$

Como as mobilidades dos íons são grandezas diretamente proporcionais à sua taxa de migração, conforme Equação 2, a mobilidade eletroforética observada (μ_{obs}) também possui a mesma tendência. Diante disso, assim como a mobilidade electrosmótica, a mobilidade eletroforética observada também pode ser descrita empiricamente através da injeção de uma solução contendo o analito, relacionando as dimensões do capilar e a voltagem aplicada, conforme a Equação 8 (Baker, 1995):

$$\mu_{obs} = \frac{L_{ef}L_{tot}}{t_{obs}V} \quad (8)$$

na qual L_{ef} e L_{tot} são, respectivamente, o comprimento efetivo e total do capilar; V é a voltagem aplicada; e t_m é o tempo de migração do analito.

Diante dessas considerações, é possível aplicar tais conceitos no intuito de estabelecer o valor da mobilidade eletroforética de um composto. Posto que μ_{eo} e μ_{obs} são descritas experimentalmente pelas Equações 5 e 8, respectivamente, o valor de μ_{obs} é calculado por meio da Equação 9 (Baker, 1995).

$$\mu_{obs} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (9)$$

Assim como o controle do EOF, a escolha da voltagem positiva e negativa dita a dinâmica das separações de cátions e ânions em CZE (Jager; Tavares, 2001). Quando a separação é conduzida sob EOF “normal”, o EOF está no sentido do cátodo, eletrodo negativo. Se a extremidade em que é feita a introdução da amostra possui polaridade positiva na fonte de alta tensão, a polaridade é dita normal. Assim, os cátions são atraídos pelo polo negativo, e a sua mobilidade eletroforética estará no sentido do EOF, conforme Figura 7.A (Colombara; Tavares; Massaro, 1997).

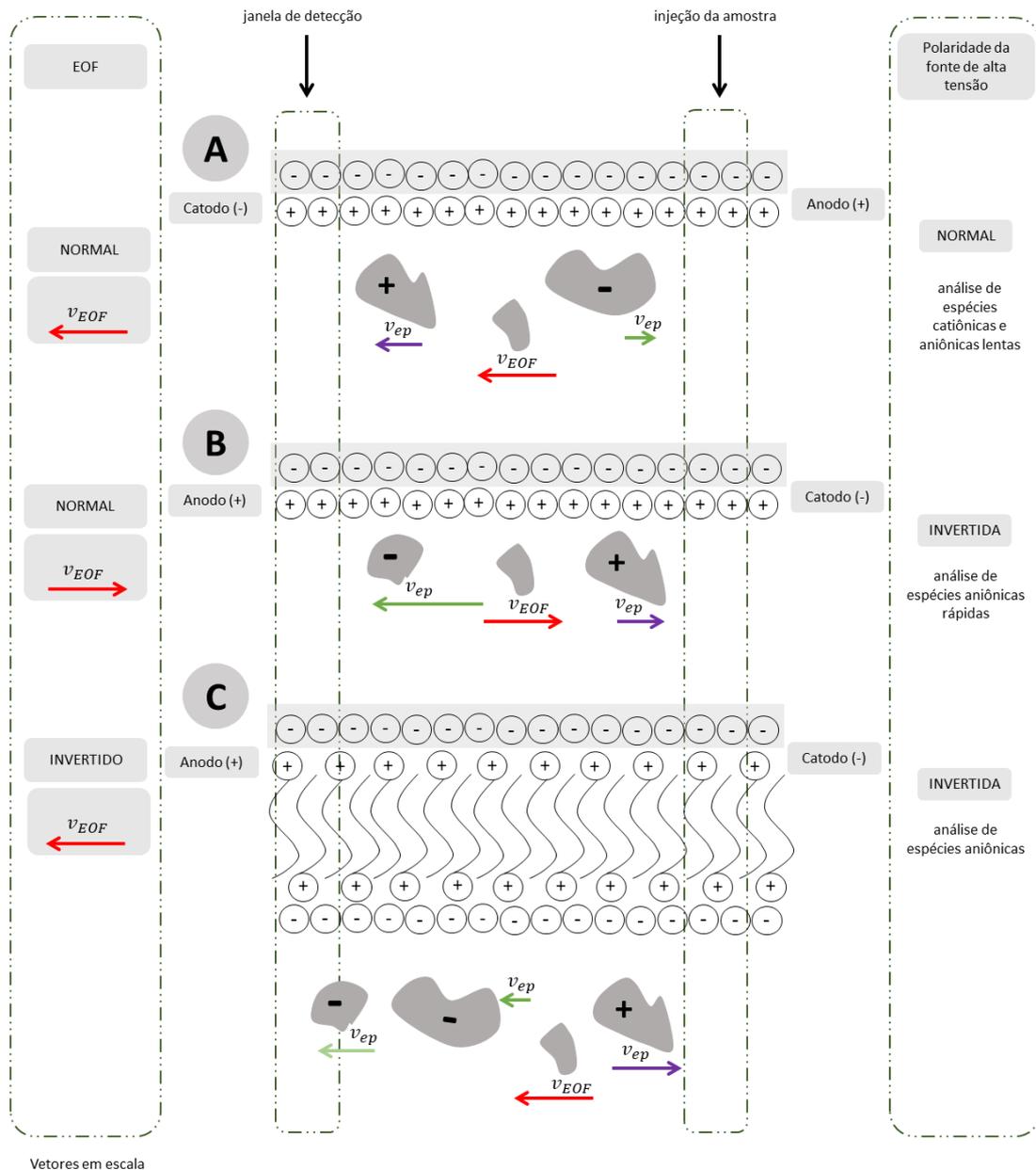
Sob a mesma condição, EOF normal e polaridade “normal”, os ânions são atraídos pelo ânodo, polo positivo. Assim, as espécies aniônicas apresentam mobilidade eletroforética com sentido oposto ao EOF, conforme observado na Figura 7.A. Diante disso, para que os ânions maiores, que são lentos, atravessem o detector eles precisam ser arrastados pelo EOF, ou seja, $|\mu_{ep}| < |\mu_{EOF}|$. Ânions considerados rápidos, ou moderadamente lentos, deixam o tubo capilar no sentido do polo positivo assim que o campo elétrico é aplicado e não atingem o detector (Baker, 1995; Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Tavares, 1997).

Ainda considerando o EOF normal, a inversão da polaridade da fonte de alta tensão é uma alternativa para análise de ânions rápidos, assim, a introdução da amostra é feita na extremidade de polaridade negativa na fonte de alta tensão, e o sistema de detecção no lado positivo, conforme Figura 7.B. A μ_{ep} das espécies aniônicas migram no sentido oposto ao EOF, mas por se tratar de ânions rápidos, eles ainda conseguem atravessar o detector pois $|\mu_{ep}| > |\mu_{EOF}|$, o que pode acarretar em um maior tempo de análise (Baker, 1995).

Outra abordagem para a análise de espécies aniônicas pode ser implementada mediante a inversão do EOF, e da polaridade. A inversão do EOF pode ser feita pela adição de um surfactante catiônico ao eletrólito, sendo comumente utilizados os sais quaternários de amônio, conforme ilustrado na Figura 7.C. Neste caso, há a interação eletrostática entre os grupos silonato (Si-O⁻) e a cauda hidrofóbica da amina quaternária carregada positivamente, enquanto a cauda hidrofóbica interage entre si. Dessa forma, a cauda hidrofóbica também interage com os ânions do eletrólito, que são atraídos pelo anodo, polo positivo, invertendo dessa maneira o EOF quando submetido a ação do campo elétrico (Baker, 1995).

As estratégias anteriormente discutidas do sistema de CE, se baseiam no modo de injeção hidrodinâmica, e possibilitam a separação de cátions e ânions, mas em todas circunstâncias, os solutos neutros migram por ação única do EOF, não havendo a distinção pelo sistema de detecção entre o pico do EOF e dos compostos neutros, visto que estes possuem o mesmo tempo de migração, inviabilizando a análise deste tipo de soluto por métodos eletroforéticos em solução livre (Tavares, 1997). Mesmo com a inversão do EOF e da polaridade, compostos neutros comigram. Uma vez que a separação baseada somente na diferença de mobilidade eletroforética dos compostos possui tais limitações, outros mecanismos de separação devem ser utilizados, como em MEKC, que se baseia na partição diferenciada dos analitos entre uma fase micelar e aquosa (Hancu *et al.*, 2013).

Figura 7 – Esquema ilustrativo para análise da polaridade da fonte de alta tensão e sentido do EOF comumente empregados em CZE



Fonte: Adaptado (Colombara; Tavares; Massaro, 1997; Jager; Tavares, 2001)

1.8.2 Mobilidade efetiva

A migração de eletrólitos fracos é descrita pelo conceito de mobilidade efetiva (μ_{ef}), pois as duas formas químicas de uma espécie em equilíbrio, a fração ionizada e não ionizada, com mobilidade zero, devem ser consideradas. Diante disso, a partir da definição de Tiselius a mobilidade efetiva de uma substância i presente em uma solução em diferentes formas químicas

j , relacionadas entre si por meio de um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar sob a influência de um campo elétrico como um único soluto, possuindo μ_{ef} dada pela Equação 11 (Tavares, 1996):

$$(\mu_{ef})_i = \sum_1^j \mu_j \alpha_j \quad (11)$$

em que α_j é a função de distribuição ou grau de ionização e μ_j é a mobilidade iônica de cada espécie j .

Os valores de α_j dependem da magnitude das constantes de dissociação do analito, o que determina a prevalência relativa das j formas químicas em um intervalo de pH. Assim, mediante a interpretação da Equação 11, há uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio, ditado pela composição do eletrólito (Tavares, 1996).

A curva de mobilidade efetiva de um analito, plotadas pelo valor de μ_{ef} em função do pH do meio, é um excelente indicador teórico da condição mais apropriada para efetuar a separação, ou seja, é possível inferir qual o valor de pH maximiza a diferença entre as mobilidades eletroforéticas dos analitos (Tavares, 1996).

A construção de tais curvas pode ser determinada experimentalmente, observada a dependência com os valores de pKa. Assim, a μ_{ef} pode ser calculada mediante a extração das informações em uma análise realizada sob condições experimentais convenientes, para cada analito. Os dados pertinentes para o cálculo são: o t_m dos analitos e do EOF; voltagem aplicada; dimensões do capilar; que são utilizadas nas Equações 5, 9 e 6, para calcular os valores de μ_{EOF} , μ_{obs} , e μ_{ep} , respectivamente. Diante dos valores das frações de distribuição (α_j), a mobilidade efetiva pode ser calculada com a Equação 11, considerando que $(\mu_{ef})_i$ é a mobilidade efetiva da espécie i .

1.8.3 Cromatografia capilar eletrocinética micelar

Segundo as definições da IUPAC, a cromatografia capilar eletrocinética (EKC) é uma das modalidades de CE, cujo mecanismo de separação, das zonas dos analitos, é baseado na combinação de efeitos eletrocinéticos, eletroforese e eletroosmose, e cromatográficos, interação dos analitos com aditivos adicionados ao eletrólito. Esses formam uma fase dispersa com velocidade distinta a dos analitos, e para promover a separação, os solutos ou a fase dispersa devem possuir carga (Pyell, 2018; Riekkola; Jönsson; Smith, 2004; Silva *et al.*, 2007).

A Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar (MEKC), técnica desenvolvida por Terabe e colaboradores em 1984, é um caso especial de EKC, na qual a (pseudo)fase estacionária é uma fase micelar dispersa no capilar (Pyell, 2018; Silva *et al.*, 2007). A CZE não é eficiente em separar compostos neutros, com isso a MEKC se apresenta como uma técnica vantajosa em relação a CE (Baker, 1995), uma vez que utiliza do mesmo aparato instrumental para a separação de solutos neutros. Dessa forma, a MEKC explora as diferenças de mobilidade eletroforética para separar íon solvatados, e ao mesmo tempo, a diferença de distribuição do solutos neutros entre a fase micelar e o eletrólito (Tavares, 1997).

As separações cromatográficas, tradicionalmente, se baseiam na diferença de distribuição dos solutos entre uma fase estacionária, e uma fase móvel, podendo haver mais de uma fase móvel. Assim, rigorosamente, a MEKC não é considerada uma técnica cromatográfica, uma vez que há duas fases: micelar e aquosa, e ambas são móveis. Além disso, os analitos se movem sob influência do EOF, e não através do fluxo induzido pela bomba (Baker, 1995).

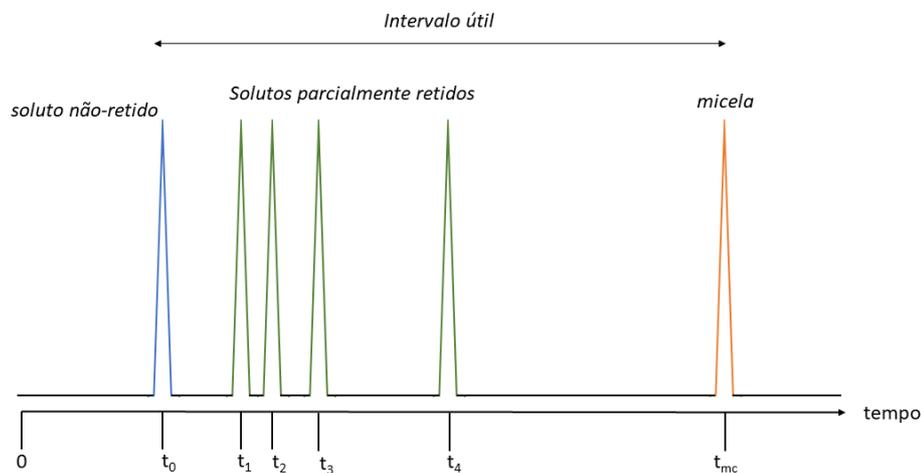
Em MEKC, o tubo capilar é preenchido com eletrólito contendo um surfactante iônico, cuja concentração na solução é mantida acima do limite crítico para a formação de micelas, conhecido como concentração micelar crítica (CMC). Quando um surfactante aniônico é utilizado, como o dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*, SDS), ao aplicar o campo elétrico, a micela é orientada no sentido do anodo através do processo de eletroforese, sob EOF e polaridade normal. Quando o meio é neutro ou básico, o EOF supera a migração eletroforética da micela, resultando em uma migração atrasada da micela aniônica de SDS no sentido do catodo. Ainda sob essas condições experimentais, um analito neutro se dispersa entre a micela, pseudofase estacionária, e a solução aquosa circundante, podendo migrar na mesma velocidade da micela quando incorporado a ela, completamente, entretanto, migra à velocidade do fluxo eletrosmótico quando está livre da micela. Conseqüentemente, a velocidade de migração do analito é determinada pelo coeficiente de distribuição que regula a solubilização micelar (Koji; Shigeru, 1998).

O fator capacidade (k') é razão entre o quantidade de matéria do soluto em fase micelar (n_{mc}), e quantidade na fase aquosa (n_{aq}), dado pela Equação 10 (Baker, 1995; Terabe *et al.*, 1984).

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad (10)$$

Considerando um analito neutro, ele deve migrar com uma velocidade situada entre dois extremos: a v_{EOF} e a velocidade da micela (v_{mc}). Em outras palavras, o tempo de retenção do analito (t_r) encontra-se limitado entre o tempo de migração de um soluto não retido (t_0), e o tempo da micela (t_{mc}), conforme ilustrado na Figura 8 (Baker, 1995).

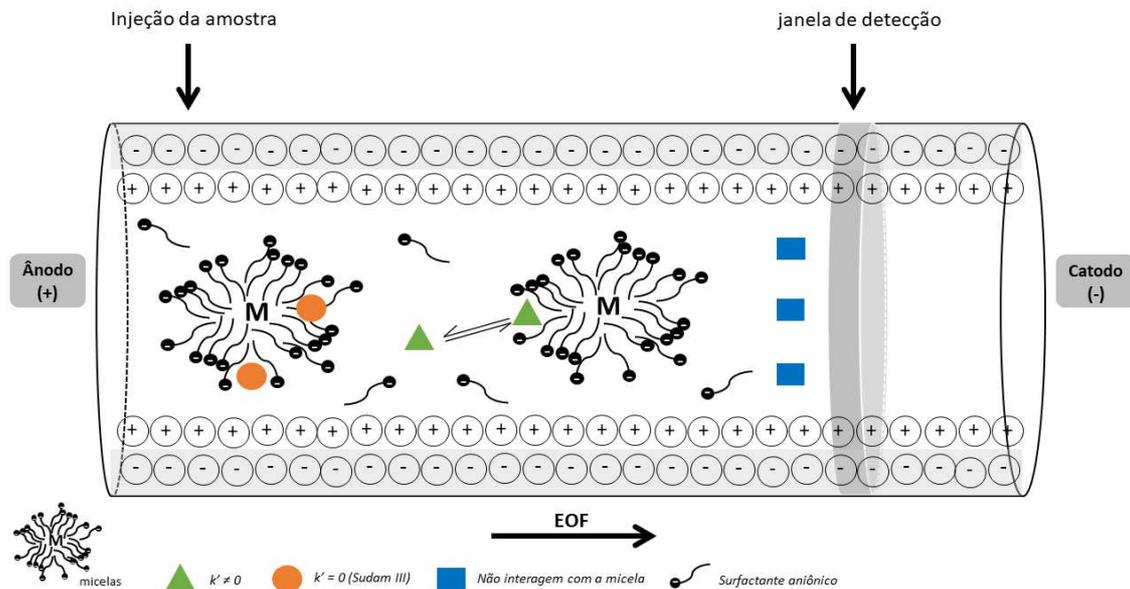
Figura 8 – Intervalo característico de eluição em cromatografia eletrocinética micelar



Fonte: Adaptado (Tavares, 1997)

Experimentalmente, sob condições de análise convenientes, é possível determinar o intervalo característico de eluição (ICE) em eletrocromatografia micelar ou intervalo útil de separação (Tavares, 1997). A análise do tempo do soluto não-retido é feita através da injeção de metanol, um composto insolúvel que passa o tempo todo no eletrólito, eluindo em tempo t_0 . Para determinar t_{mc} é preciso injetar um composto totalmente solúvel pela micela. No caso do SDS, é utilizado o composto Sudan III, apresentando k' igual a zero, conforme esquema apresentado na Figura 9 (Baker, 1995).

Figura 9 – Ilustração esquemática da MEKC em um capilar



Fonte: Adaptado (Baker, 1995).

Os quadrados, em azul, indicam solutos que são muito solúveis em água e não são encapsulados pelas micelas, migram na velocidade do EOF e eluem em tempo t_0 . Os círculos, em laranja, representam solutos que são completamente solubilizados pelas micelas e não passam tempo algum na solução, migrando a mesma taxa da micela e eluem em um tempo (t_{mc}). Triângulos representam solutos em partição entre as micelas e o tampão aquoso, migrando a um tempo t_r , entre t_0 e t_{mc} , sendo proporcional a hidrofobicidade dos compostos (Baker, 1995).

Se um surfactante catiônico for utilizado para compor a fase dispersa, haverá a inversão do EOF, e será necessário inverter a polaridade aplicada, conforme demonstrado na Figura 7.C. Se somente o EOF for invertido, todos os solutos irão migrar no sentido do ânodo, polo positivo, não atravessando o detector (Baker, 1995).

Embora apresente uma variedade de aplicações, a MEKC apresenta algumas limitações, como por exemplo, o uso da técnica em soluções aquosas contendo um alto teor de solventes orgânicos, uma vez que as micelas são instáveis nessas condições. Solutos com forte caráter apolar não são separados em MEKC, tendo em vista a forte interação com as micelas. Além disso, a velocidade das micelas depende criticamente das condições experimentais de análise, o que pode prejudicar o intervalo útil de separação, demonstrando uma baixa capacidade de picos em relação a outras modalidades de CE em zona, limitando a aplicação em matrizes

complexas. Ademais, exige o controle demasiado das condições experimentais para a reprodutibilidade dos tempos de retenção (Tavares, 1997).

Segundo Baker (1995), há uma alteração na nomenclatura do sinal analítico em função das particularidades da técnica. A saída do detector é referida como um cromatograma eletrocínético micelar ao invés de um eletroferograma, como em CZE (Baker, 1995). Entretanto, neste trabalho, todos os resultados, independentemente da técnica utilizada, serão denotados por eletroferogramas.

1.8.4 Detecção UV-VIS

Embora os sistemas de CE sejam compatíveis com uma gama de detectores, a escolha deste componente deve permear alguns critérios como: sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração, e ruído do sinal analítico (Tavares, 1996). Além disso, almeja-se que a resposta do detector forneça uma relação conhecida e reprodutível com a quantidade ou concentração do soluto (Baker, 1995).

Dentre essas possibilidades, os fotodetectores são os mais utilizados em CE (Baker, 1995), sendo frequentemente empregado o modo de detecção direto. Essa modalidade é adequada quando as espécies de interesse possuem absorção significativa da radiação eletromagnética na região do ultravioleta (UV) e visível (VIS). Nesse caso, normalmente o eletrólito de corrida não deve contribuir de maneira significativa para a absorção nessa região monitorada (Spudeit; Dolzan; Micke, 2012). É interessante destacar que os capilares de sílica fundida apresentam alta transmitância à luz UV-VIS (190 a 800 nm), permitindo a detecção *on-column*, ou seja, dentro do próprio tubo capilar, mediante a remoção do revestimento externo de poliimida, e posterior alinhamento da janela ao sistema de detecção (Baker, 1995).

O princípio de detecção pela absorção UV-VIS é baseada na lei de Lambert Beer, cuja absorbância (A) é dada pela Equação 12 (Baker, 1995):

$$A = \epsilon b C \quad (12)$$

na qual ϵ refere-se à absortividade molar do analito ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); b é o caminho ótico, dada pelo d.i do capilar; e C a concentração do soluto (mol L^{-1}). A absortividade molar depende do grupo cromóforo do soluto, do comprimento de onda monitorado, do pH, e da composição do eletrólito. Como a resposta do detector é feita pelo monitoramento da absorbância, uma grandeza adimensional, ela é apresentada em unidades de absorbância (UA) (Baker, 1995).

1.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE MOLNIPIRAVIR

Tendo em vista a recente descoberta da ação do molnupiravir no combate a COVID-19, e, conseqüentemente, ganho de notoriedade somente em meados de 2021, ainda não há, disponíveis na literatura, um conjunto diversificado de metodologias analíticas para sua determinação, sendo realizada em sua maioria por métodos cromatográficos, embora existam outras abordagens (Kablan *et al.*, 2022; Salman *et al.*, 2022). Logo, esta seção tem como escopo apresentar uma revisão da literatura daqueles trabalhos que descreveram os critérios de validação para análise do fármaco por métodos cromatográficos.

Em um estudo envolvendo ensaios clínicos para administração do molnupiravir em pacientes com COVID-19, foi desenvolvida uma metodologia analítica para a quantificação simultânea de MPV e NHC em plasma e saliva humana, destes voluntários, por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês *high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). Segundo os autores, na fase pré-analítica, a fim de prevenir a conversão do MPV em NHC, as amostras foram mantidas a temperatura de -80 °C até realização das análises. O método validado utilizou a precipitação de proteínas com acetonitrila, seguido de diluição, como preparo de amostra, e a quantificação foi realizada por padronização interna, usando padrão interno marcado com isótopo estável (do inglês *stable isotopically labelled*, SIL), a partir de um modelo de regressão linear por mínimos quadrados ponderados. Os resultados, em conjunto com as amostras controle (do inglês *quality control sample*, QCs), demonstraram precisão e exatidão satisfatória para os dois analitos em ambas as amostras biológicas, entretanto, apresentou baixos valores de recuperação nas amostras de saliva (Amara *et al.*, 2021).

Em outro trabalho, uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (do inglês *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) utilizando um detector de arranjo de diodos foi aplicada em um estudo da permeabilidade intestinal do molnupiravir *in vitro* com células Caco-2. Além disso, o método validado foi aplicado para análise do padrão do fármaco após submissão a condições de estresse oxidativa e hidrolítica em meio ácido e alcalino, a fim de demonstrar a seletividade do método validado, sendo considerado um método indicativo de estabilidade (Reçber *et al.*, 2022). Uma nova abordagem utilizando a técnica de RP-HPLC-DAD foi propositada para a determinação de MPV em matéria-prima e formulação farmacêutica (Annadi *et al.*, 2022). A

estratégia descrita anteriormente por Tuba Reçber (Reçber *et al.*, 2022), foi comparada com a nova metodologia, de modo que não houve diferença significativa entre elas.

Uma abordagem simples, *eco-friendly*, rápida e de baixo custo para o doseamento simultâneo de molnupiravir, favipiravir e ritonavir em matéria-prima e formulações farmacêuticas foi realizada utilizando a técnica de cromatografia de camada fina de alta resolução (do inglês *high-performance thin-layer chromatography*, HPTLC), sendo empregada a detecção por densitometria em 289 nm. Para avaliação da linearidade, são apresentados, somente, os valores para o coeficiente de determinação (R^2), de modo que este argumento é considerado insuficiente diante da significância estatística do modelo ajustado, quando se utilizou o método dos mínimos quadrados (Danzer; Currie, 1998; Pimentel; Neto, 1996). Este estudo evoca os princípios da Química Analítica Verde (do inglês *Green Analytical Chemistry*, GAC), demonstrando não somente as vantagens da técnica, mas dispondo de métricas quantitativas para avaliar a conformidade do procedimento analítico com a química analítica verde, por meio da ferramenta AGREE (do inglês *Analytical GREENness*), e GAPI (do inglês *Green Analytical Procedure Index*) (Saraya *et al.*, 2022).

A escala ecológica analítica (do inglês *analytical eco-scale*), uma métrica pioneira introduzida em 2012 (Gałuszka *et al.*, 2012), avalia metodologias analíticas realizando penalizações em etapas do método que não seguem os princípios do GAC (Anastas; Eghbali, 2010; Gałuszka *et al.*, 2012). Duas métricas recentes ganharam destaque: GAPI (Pena-Pereira; Wojnowski; Tobiszewski, 2020) e AGREE, o primeiro utiliza um pictograma tricolor para representar etapas analíticas, enquanto que o segundo, mediado por *software open-source*, adota um formato de relógio com 12 seções, cada uma representando um princípio do GAC. Ambas as métricas atribuem uma pontuação numérica que indica o impacto ecológico, na qual pontuações mais próximas de 1 indicam um impacto mais positivo. As cores vermelha, amarela e verde são empregadas para indicar o grau de impacto, com o vermelho representando o nível mais elevado (Sajid; Plotka-Wasyłka, 2022; Saraya *et al.*, 2022).

Uma metodologia por LC-MS/MS foi aplicada para quantificação de NHC, em plasma humano, e seu anabólico bioativo NHC-trifosfato (NHC-TP), a partir de um lisado de células mononucleares de sangue periférico, sendo necessário o desenvolvimento de métodos distintos para determinação de cada analito, a partir da alteração na fase móvel e coluna aplicadas nos métodos. O efeito de supressão iônica foi observado para ambos os compostos, sendo aplicado o uso de padrão interno para cada analito, NHC-SIL e NHC-TP-SIL. Como o efeito de supressão para o SIL eram semelhantes aos compostos de interesse, o efeito de matriz deixou de ser significativo para análise (Parsons; Kryszak; Marzinke, 2021).

Um método verde, demonstrado pela métrica GAPI, para análise de dissolução de uma formulação contendo molnupiravir e favipiravir foi propositado, utilizando a técnica de HPLC-DAD associada a fase móvel micelar. Neste trabalho, além da curva de calibração, outros modelos quimiométricos multivariados foram desenvolvidos e validados para quantificação dos analitos. O método cromatográfico para o MPV, na formulação farmacêutica, obteve o mesmo desempenho que o método quimiométrico (Sharaf *et al.*, 2022).

Os nucleosídeos são moléculas com estrutura hidrofílica, majoritariamente neutra em uma ampla faixa de pH, e com significativa capacidade de absorver luz visível e ultravioleta (Struck *et al.*, 2011), o que lhes confere a possibilidade de serem analisados através de técnicas por eletromigração, que comumente empregam o sistema de detecção UV-VIS. Nesse caso, a CE possui grande destaque (Kawamura, 2006), de modo que a MEKC é geralmente empregada, pois a separação por CZE não é adequada para a separação de substâncias neutras, uma vez que essas espécies acabam migrando juntos no sentido do detector, com a mesma velocidade do fluxo eletrosmótico (Hancu *et al.*, 2013).

Dentro deste contexto, é interessante destacar que não foram encontrados registros de trabalhos descritos na literatura, até o momento, envolvendo técnicas analíticas de eletromigração em capilares aplicadas na quantificação de molnupiravir e/ou NHC em matéria-prima, conforme descrito neste trabalho. Logo, a proposição de metodologias analíticas novas ou alternativas corroboram com as exigências das normativas, acerca da estabilidade de produtos farmacêuticos, proporcionando maior segurança e eficácia aos medicamentos (FACCI *et al.*, 2020).

1.10 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O uso de planejamentos experimentais fundamentados em princípios estatísticos é uma ferramenta que permite otimizar o estudo de um sistema específico. Ao empregar essa abordagem, é possível maximizar a extração de informações realizando um número mínimo de experimentos, a fim de mitigar o tempo e custo envolvido neste processo. A descrição desses sistemas pode ser abordada por uma multiplicidade de técnicas, entretanto, cada uma possui um objetivo diferente. Portanto, a escolha dentre elas é uma decisão do pesquisador, que se orienta, substancialmente, daquilo que é preciso saber quando os experimentos estiverem terminado (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

As principais técnicas empregadas em planejamento de experimentos são apresentadas no Quadro 5. Neste estudo empírico, cada ferramenta proporciona níveis distintos de conhecimento sobre o sistema investigado.

Quadro 5. Abordagens convencionais para otimização

Objetivo	Técnica
Triagem das variáveis significativas	Planejamentos fracionários
Avaliação da influência das variáveis	Planejamentos fatoriais completos
Construção de modelos empíricos	Modelagem por mínimos quadrados
Otimização	Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e <i>simplex</i>
Construção de modelos mecanísticos	Dedução a partir de princípios gerais

Fonte: Adaptado (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Os planejamentos fatoriais completos são utilizados, essencialmente, quando presumimos conhecer quais variáveis possuem maior influência sobre o resultado experimental, diferentemente dos planejamentos fracionários que são utilizados no intuito de triagem. Além disso, eles são aplicados em contextos que incluem um pequeno número de variáveis, sendo capazes de avaliar também as interações entre elas (Neto; Scarminio; Bruns, 2001). Neste contexto, a propriedade de interesse é compreendida como a resposta do planejamento experimental, e os fatores são as variáveis que influenciam nessa resposta. Assim, o pesquisador deve ter o controle dos fatores, sejam quantitativos ou qualitativos, e presumir que estes fatores são pertinentes ao objetivo pretendido com aqueles experimentos (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Para executar um planejamento fatorial completo devem ser realizados experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores, no qual cada combinação define um ensaio. Considerando a existência de n níveis para cada fator k do planejamento, ao todo serão necessários n^k ensaios experimentais, no mínimo, pois para estimar o erro experimental serão necessários efetuar mais experimentos, mediante a repetição dos ensaios. Uma estratégia comumente utilizada consiste em estimar o erro através de n_{PC} repetições no nível central do planejamento (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Uma investigação na qual há dois fatores e três níveis, pode ser feita considerando um planejamento fatorial completo 3^2 , com triplicata no ponto central, na qual temos que $n = 3$, $k = 2$, $n_{PC} = 2$, e $n^k = 9$, totalizando 11 ensaios experimentais, de modo que o número total de ensaios, n_T , é definido pela Equação 13.

$$n_T = n^k + n_{PC} \quad (13)$$

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Neste tipo de planejamento a codificação das variáveis facilita a manipulação dos dados, considerando a possibilidade da construção de modelos empíricos por meio da MRM, embora, o processo de otimização por planejamentos fatorais não esteja condicionado a esta etapa da modelagem, visto que, a significância química e a significância estatística são priorizadas em conformidade com o objetivo da investigação.

Diante disso, o código, δ , de cada nível, χ , dos fatores pode ser calculado por meio da Equação 14 (Neto; Scarminio; Bruns, 2001):

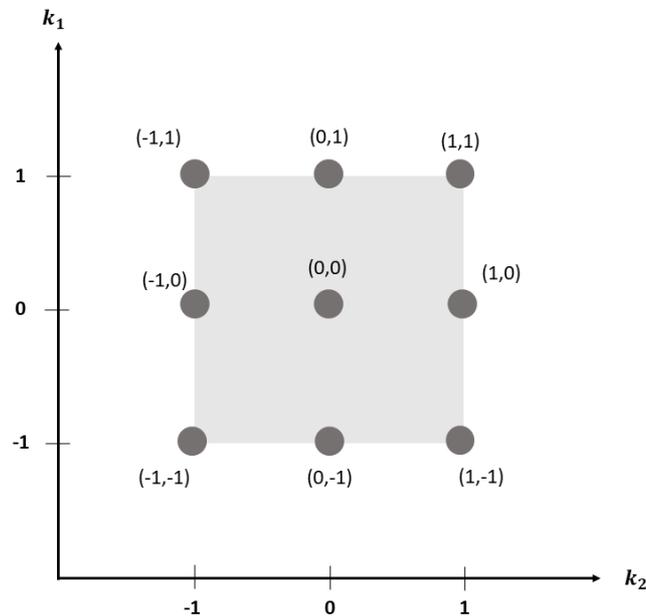
$$\delta = \frac{\chi - n_m}{\frac{n_s - n_i}{2}} \quad (14)$$

na qual n_s , n_i representam respectivamente os valores superior e inferior dos níveis do fator k ; n_m é a média aritmética dos valores de n_s , n_i .

Fonte: Adaptado de (Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Assim, para posterior elaboração da matriz de coeficientes de contraste, matriz contendo todos os ensaios codificados, cada fator k apresentará n códigos. Ao nível inferior de cada variável é atribuído o valor -1, ao nível intermediário 0, e ao nível superior equivale a +1 (Neto; Scarminio; Bruns, 2001), resultados obtidos através da Equação 14. Os ensaios codificados são apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Distribuição dos 9 ensaios experimentais de uma matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial completo 3^2 , representada pela região do quadrado com as coordenadas normalizadas



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

A aplicação de planejamentos fatoriais completos é apresentada como foco no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que não há relatos na literatura da otimização de nenhum eletrólito aplicado na separação dos fármacos apresentados por CE. Além disso, a escolha deste tipo de planejamento é fundamentada pelo conhecimento prévio dos fatores que influenciam na dinâmica das separações por eletroforese capilar, considerando as características dos fármacos apresentados e os mecanismos de separação, bem como os parâmetros instrumentais. Neste contexto, a aplicação desta ferramenta permite avaliar, de maneira simultânea, a influência da composição do sistema eletrolítico na separação, bem como discriminar quais fatores são relevantes, e as interações entre eles.

1.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos analíticos são ferramentas fundamentais para assegurar os atributos da qualidade do produto, no entanto, para alcançar os padrões necessários é essencial que esses métodos analíticos passem por um processo de validação adequado. A validação analítica consiste em uma abordagem formal, documentada, e sistemática que avalia a capacidade de um método analítico em produzir resultados precisos, confiáveis e reproduzíveis (Marson *et al.*,

2020), e deve ser realizada sempre que houver a necessidade de demonstrar que as características de desempenho deste método são compatíveis com os requisitos regulatórios exigidos para aplicação almejada (Eurachem, 2014; INMETRO, 2020). No contexto de análises químicas farmacêuticas, a validação deve ser refeita, por exemplo, se houver alterações na rota sintética do IFA for alterada, composição do produto acabado, ou no procedimento analítico (Pedersen-Bjergaard, Stig| Gammelgaard; Halvorsen, 2019).

Os critérios quantitativos que definem o escopo e a eficiência do método analítico são elucidados por meio das figuras de mérito, e a estimativa desses parâmetros, ou seja, o processo de validação, varia de acordo com a técnica analítica utilizada ou com o protocolo de validação adotado (Ribeiro *et al.*, 2008). Neste contexto, há uma diversidade de resoluções e guias para a validação de métodos analíticos, propostos pelas principais agências reguladoras do mundo.

Na década de 1990, as agências regulatórias dos Estados Unidos, Japão, e União Europeia se organizaram por meio da Conferência Internacional sobre Harmonização (do inglês *International Conference on Harmonisation*, ICH), a fim de estabelecer padrões para os parâmetros e metodologias aplicados na validação, no contexto de pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (Ribeiro *et al.*, 2008). Na mesma época, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) também produziu um guia para validação, levando em consideração as normativas da AOAC International, ICH, e Eurachem (Thompson; Ellison; Wood, 2002). No contexto brasileiro, tais diretrizes são apresentadas pela ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Dentro deste contexto, existem diversas definições descritas na literatura para o termo validação, tornando-o, portanto, um conceito sem uma definição específica (BRITO *et al.*, 2003), todavia, as agências reguladoras supracitadas convergem em sua acepção, tendo em vista o avanço das normativas e congruência transacional na busca pela melhoria da qualidade, conforme apresentado no Quadro 6 (Ferreira, 2018).

Quadro 6 – Definição sobre validação segundo as autoridades regulatórias

Órgãos reguladores	Definição do termo “validação”
FDA	“Processo de demonstrar que um procedimento analítico é adequado ao pretendido propósito”. (FDA, 2015)
Eurachem	“Processo de definição de um requisito analítico e confirmação de que o método em questão tem capacidades de acordo com o que sua aplicação requer”. (Eurachem, 2014)
ICH	“Demonstra que o método analítico é adequado ao propósito planejado”. (ICH, 2022)
IUPAC	“a validação de métodos faz uso de um conjunto de testes que avaliam as suposições nas quais o método analítico se baseia e estabelece e documenta as características de desempenho de um método, demonstrando se é adequado para uma finalidade analítica específica”. (Thompson; Ellison; Wood, 2002)
ANVISA	“Avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos”. (Brasil, 2017b)
INMETRO	“Confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. (INMETRO, 2020)
OMS	“Ato de provar e documentar que qualquer processo, procedimento ou método realmente e consistentemente conduz aos resultados esperados”.(OMS, 2006)

Fonte: Adaptado de Ferreira (2018) (Ferreira, 2018).

Dentro deste cenário, as definições dos parâmetros de desempenho analítico, figuras de mérito, por parte das agências reguladoras, nacionais e internacionais também são distintas, demonstrando a ausência de um procedimento normatizado que estabeleça a execução da validação de métodos instrumentais de separação (Ribani *et al.*, 2004).

De acordo com Ribani *et al.* (2004), a validação pode ser delineada em dois tipos: validação completa e validação laboratorial. O primeiro procedimento engloba minuciosamente todas as características de desempenho, e é conduzido por meio de um estudo

interlaboratorial para verificar a reprodutibilidade da metodologia proposta, sendo aplicado em diversos laboratórios. Por outro lado, o segundo procedimento, conhecido como validação laboratorial, é implementado nas fases iniciais do desenvolvimento de metodologias e também na divulgação de artigos, no qual se avaliam exaustivamente todas as características de desempenho da validação. Tais abordagens são cruciais para garantir a confiabilidade e a precisão dos resultados obtidos em estudos científicos (Ribani *et al.*, 2004).

No Brasil, as metodologias consolidadas para validação de métodos analíticos são baseados em modelos de calibração univariada (Valderrama; Braga; Poppi, 2009), e as figuras de mérito geralmente consideradas para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, e robustez. (Ribani *et al.*, 2004). Neste trabalho foram avaliados os parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Segundo legislação da ANVISA sobre métodos analíticos, a validação parcial deve analisar, ao menos, os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade. (Brasil, 2017b).

1.11.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico em identificar ou quantificar, de modo inequívoco, o analito na presença de outros componentes com potencial interferente, tais como impurezas, produtos de degradação, constituintes da matriz, ou bem como outros compostos com propriedades similares que possam eventualmente estar presentes (Brasil, 2017b; Marson *et al.*, 2020; Ribani *et al.*, 2004). Assim, esses possíveis interferentes não devem influenciar na resposta analítica do composto de interesse, em métodos quantitativos (Brasil, 2017b).

Diante disso, a seletividade é o parâmetro que deve iniciar o desenvolvimento analítico e validação, pois assegura que a resposta analítica seja exclusivamente do composto de interesse, caso contrário, a linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidos (Marson *et al.*, 2020; Ribani *et al.*, 2004).

A seletividade pode ser avaliada de diversas maneiras: comparação o sinal analítico da matriz isenta do analito com a matriz adicionada com padrão desta substância, sendo que, nesse caso, o método será seletivo se nenhum interferente eluir no tempo de retenção da substância de interesse, havendo a separação eficiente dos pares críticos na amostra. Outra abordagem pode ser feita considerando o uso de detector de arranjo de diodos ou espectrômetro de massas,

comparando o espectro do pico obtido na separação da matriz com o de um padrão, demonstrando a pureza do composto no sinal analítico (Ribani *et al.*, 2004).

1.11.2 Precisão

O parâmetro precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, padrões ou amostras semelhantes, preparados conforme descrito no método analítico a ser validado (Brasil, 2017b; Ribani *et al.*, 2004). Essa característica de desempenho expressa “o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas” (Valderrama; Braga; Poppi, 2009). Esse parâmetro pode ser avaliado mediante a dispersão dos resultados, sendo calculada pela estimativa do desvio padrão relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*, RSD) da série de medições, também denominado coeficiente de variação (CV), conforme Equação 15 (Brasil, 2017b; Ribani *et al.*, 2004):

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (15)$$

em que s é o desvio padrão amostral; e \bar{x} a média amostral dos resultados experimentais, sendo ambos estimadores dos respectivos parâmetros populacionais.

A precisão pode ser expressa por distintas abordagens: repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. Em todas essas maneiras, os critérios de aceitação devem ser definidos e fundamentos com base nos seguintes aspectos: objetivo do método; variabilidade intrínseca do método; concentração de trabalho; e concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017c).

Por repetibilidade entende-se “a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição” (Ribani *et al.*, 2004), e que devem ser feita em uma única corrida analítica, ou seja, o “conjunto de medições efetuadas em um grupo de amostras em intervalo de tempo pré-determinado, sob as mesmas condições”, tais como: procedimento; analista; instrumento usado e as condições instrumentais; local; e repetições em um curto intervalo de tempo (Brasil, 2017b). Segundo recomendação da ANVISA, são necessárias, no mínimo, nove determinações, considerando o intervalo linear do método analítico, distribuídas em três níveis de concentração: baixa, média e alta, com três réplicas autênticas em cada nível; ou 6 seis réplicas autênticas a uma concentração próxima ao valor esperado (Brasil, 2017b). Na ausência de ensaios genuínos, o

parâmetro estará sendo utilizado para avaliar somente a precisão instrumental (Ribani *et al.*, 2004).

A precisão intermediária expressa “a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos” (Brasil, 2017b), indicando se é possível obter os mesmos resultados dentro do mesmo laboratório (Ribani *et al.*, 2004). As diretrizes da ANVISA preconizam o uso das mesmas concentrações e do mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade (Brasil, 2017b).

Por fim, a reprodutibilidade “é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas”, isto é, diferentes equipamentos, analistas, e laboratórios (Ribani *et al.*, 2004). Essa abordagem é admissível em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais (Brasil, 2017b).

1.11.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico simboliza o nível de concordância observada entre os resultados individuais do método, em investigação, em relação a um valor aceito como verdadeiro (Brasil, 2017b; Ribani *et al.*, 2004). A exatidão deve ser verificada com nove determinações, no mínimo, abrangendo o intervalo linear do método analítico, distribuídas em nível baixo, médio e alto de concentração, com três réplicas autênticas em cada nível (Brasil, 2017b).

Para análise da exatidão de métodos analíticos, os processos comumente empregados são: utilização de materiais de referência certificados; comparação entre o método sob investigação e um método de referência (validado); adição de padrão; e ensaios de recuperação (Ribani *et al.*, 2004).

A recuperação é a “proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada”. O procedimental desta estratégia envolve a adição de solução padrão do analito, em concentração conhecida, à amostra, processo denominado fortificação ou *spiking*. Com isso, a recuperação é expressa pela relação percentual do quantitativo medido do analito, na amostra, em relação ao *spiking* (Ribani *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a recuperação foi a estratégia adotada para inferência da exatidão, a partir da fortificação das amostras com soluções padrão do analito, a partir da Equação 16:

$$R\% = \frac{A_{A+P} - A_A}{A_P} \quad (16)$$

em que $R\%$ é o percentual de recuperação, A_{A+P} é a área do analito na amostra com adição de padrão, A_A corresponde a área do analito na amostra, e A_P diz respeito a área do padrão (Faria; De Souza; De Oliveira, 2008).

1.11.4 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada em uma amostra, porém, não necessariamente quantificada, utilizando um protocolo experimental específico (Brasil, 2017b; Ribani *et al.*, 2004). Segundo definição da IUPAC, o LD é a menor concentração de analito na amostra analisada que pode ser confiavelmente distinguida de zero (Thompson; Ellison; Wood, 2002).

O valor de LD pode ser analisado pelas seguintes abordagens: método visual, método relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica (Brasil, 2017b; Ribani *et al.*, 2004).

A determinação de LD pela relação sinal-ruído é realizada pela comparação entre: os sinais medidos dos ruídos dos brancos, linha base do sinal analítico; e a partir de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito, afim de estimar a concentração mínima em que esse analito pode ser detectado (Ribani *et al.*, 2004). Segundo o INMETRO, o critério de aceitação estabelecido para esta figura de mérito é uma relação sinal-ruído 3:1 ou 2:1. É interessante salientar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido na amostra. (INMETRO, 2020).

Neste trabalho, o LD foi avaliado pela relação sinal-ruído e calculado pela Equação 17:

$$LD = \frac{3 \cdot s_b \cdot C_A}{H_{max} - H_{min}} \quad (17)$$

na qual s_b é o desvio padrão amostral da linha base, C_A é a concentração do analito, H_{max} é a altura máxima do pico do analito e H_{min} é a altura mínima do pico do analito (Faria; De Souza; De Oliveira, 2008).

Independentemente da abordagem estabelecida para estimar o valor de LD, considerando aquelas preconizadas pelos compêndios oficiais, este deve ser confirmado por

meio da análise de amostras autênticas (independentes) no mesmo nível de concentração do LD, a partir de 6 réplicas. Se algum dos ensaios não for detectado, significa que o LD possivelmente está subestimado, sendo necessário sua reavaliação (INMETRO, 2020).

1.11.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada sob um determinado procedimento experimental, com precisão e exatidão apropriadas (Brasil, 2017b; ICH, 2022; Ribani *et al.*, 2004).

Assim como o LD, o valor de LQ também pode ser avaliado por meio do método visual, da relação sinal-ruído ou da relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004). Os mesmos procedimentos para determinação da relação sinal-ruído de LD podem ser adotados para a determinação desta abordagem no LQ, entretanto, utilizando-se como critério de aceitação para a estimativa do LQ uma relação sinal-ruído de 10:1 (INMETRO, 2020).

Diante dessas considerações, neste trabalho, o LQ foi avaliado pela relação sinal-ruído e calculado pela Equação 18:

$$LQ = \frac{10 \cdot s_b \cdot C_A}{H_{max} - H_{min}} \quad (18)$$

em que s_b é o desvio padrão amostral da linha base, C_A é a concentração do analito, H_{max} é a altura máxima do pico do analito e H_{min} é a altura mínima do pico do analito (Faria; De Souza; De Oliveira, 2008).

1.11.6 Calibração

Na determinação de um analito, a sua concentração em uma amostra não é uma grandeza observável, sendo monitorada de maneira indireta mediante registro de outras grandezas, associadas as propriedades físico-químicas do sistema. Diante disso, é necessário estabelecer uma relação que associe as medidas experimentais com a concentração do analito, processo denominado calibração (Pimentel; Neto, 1996).

Sob esta ótica, o processo de calibração pode ser compreendido em duas etapas. Inicialmente pela etapa descritiva, na qual as medidas experimentais realizadas em padrões analíticos, de concentração conhecida, são utilizadas na elaboração do modelo que relaciona a grandeza monitorada com a concentração do composto de interesse. Na segunda etapa, a parte preditiva, esse modelo é utilizado para inferir sobre a concentração de um analito em outras amostras, a partir dos sinais analíticos registrados dessa nova realidade amostral (Pimentel; Neto, 1996). Com isso, a calibração inclui a seleção do modelo, isto é, a especificação da sua forma funcional, a estimativa dos parâmetros do modelo e dos erros associados a essas estimativas, e a validação do modelo (Barros Neto; Pimentel; Araújo, 2002).

Ao que diz respeito a descrição da função do modelo, no contexto de validação de métodos analíticos, alguns procedimentos de calibração são comumente empregados, como: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; e adição padrão (Ribani *et al.*, 2004), de tal modo que esses métodos de calibração, na etapa preditiva, devem levar em consideração as propriedades físico-químicas dos padrões analíticos e da amostra; os pressupostos estatísticos para construção da relação matemática, chamada de curva analítica; bem como a aplicabilidade, custo, tempo de análise, técnica analítica, exatidão requerida (Pimentel; Neto, 1996), quantidade de amostra disponível, e a ser analisada; impacto da fase pré-analítica; faixa de concentração esperada para o analito; interferentes (Skoog; Holler; Crouch, 2018), ou até mesmo se a função é linear, ou se passa pela origem (Thompson; Ellison; Wood, 2002), dentre outros fatores.

1.11.7 Linearidade

A linearidade representa a habilidade que um método apresenta em fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo específico de concentrações na qual o método será aplicado (ICH, 2022).

Para a determinação da linearidade, é recomendado um mínimo de cinco concentrações distribuídas de forma adequada ao longo da faixa; no entanto, concentrações adicionais podem ser necessárias para modelos mais complexos. Outras abordagens devem ser justificadas (ICH, 2022).

Diversas abordagens para o método de adição padrão são possíveis (Bader, 1980), e sua aplicabilidade depende do objetivo e contexto analítico. Dentro desta perspectiva, uma alternativa as curvas analíticas tradicionalmente utilizadas, o uso da adição padrão de ponto

único (do inglês *single-point standard addition*, SPSA) é um procedimento de calibração aplicável ao contexto no qual a faixa esperada de concentrações do analito é pequena (Harvey, 2000) (Cardone; Palermo; Sybrandt, 1980; De Souza *et al.*, 2020).

Alguns trabalhos na literatura fizeram uso dessa metodologia (De Oliveira Neves; Leal de Oliveira, 2020; De Souza *et al.*, 2020; Do Nascimento *et al.*, 2023; Neves; De Oliveira, 2020), uma condição de contorno à análise da linearidade em uma faixa de concentração, como de costume. O método de SPSA garante uma relação linear entre a concentração do analito e o sinal analítico, entretanto, avaliado em único nível de concentração. Não obstante, o aumento no número de níveis na calibração pode aumentar a precisão e exatidão. Diante dessas considerações, o método de SPSA é um método simples e rápido, além de levar em consideração o efeito de matriz na construção do modelo.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver e otimizar um método por cromatografia capilar eletrocinética micelar com detecção direta por arranjo de díodos (MEKC-DAD) para análise e estudo de degradação forçada do molnupiravir.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) otimizar o eletrólito de corrida através de um planejamento de experimentos para análise do molnupiravir e NHC;
- b) avaliar os parâmetros de validação para o método analítico otimizado;
- c) avaliar o desempenho da metodologia analítica na detecção dos produtos de degradação gerados sob as condições de estresse em meio alcalino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são detalhados os materiais e métodos utilizados no decurso deste trabalho.

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e padrões utilizados neste trabalho foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, USA). Metanol (MeOH) grau UV/HPLC, hidróxido sódio P.A. (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) P.A. foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, São Paulo, Brasil); Tris(hidroximetil) aminometano P.A. (Tris), bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃), carbonato de sódio anidro P.A. (Na₂CO₃), tetraborato de sódio anidro P.A. (TBS) (Pó) (Na₂B₄O₇), fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (NaH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Na₂HPO₄), peróxido de hidrogênio P.A. (H₂O₂) e dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*, SDS) da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Os padrões de NHC e molnupiravir foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), grau HPLC com pureza superior a 98%. As soluções estoques individuais de NHC e de MPV na concentração de 500 mg L⁻¹ foram preparadas em água deionizada ou solução tampão, com pH ajustado no valor de interesse, e estocadas em geladeira. As misturas dos padrões dos fármacos, NHC e MPV, descrita como solução MIX, foram preparadas no dia da injeção a partir da diluição conveniente dos estoques, em água deionizada.

A matéria-prima de molnupiravir foi fornecida pelo Grupo de Pesquisas em Metodologias Sintéticas (GPMS), vinculado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, cujo protocolo de desenvolvimento foi reportado por Pereira e colaboradores (2022) (Pereira *et al.*, 2022).

A solução aquosa de NaOH na concentração de 1 mol L⁻¹ foi preparada para o condicionamento do capilar e limpeza entre as corridas. Neste último procedimento, também foi provida a solução de HCl na concentração de 1,0 mol L⁻¹.

A solução estoque do fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), em pH 7,2, foi preparada na concentração de 200,0 mmol L⁻¹ em água deionizada, e armazenada em geladeira. No dia da realização dos ensaios foi diluída para concentração pertinente, em água deionizada.

A solução estoque do tampão Tris/HCl, em pH 8,2, foi preparada na concentração de 200,0 mmol L⁻¹/100,0 mmol L⁻¹ em água deionizada, e armazenada em geladeira. No dia da realização dos ensaios foi diluída para concentração conveniente, em água deionizada.

A solução estoque do tampão borato, em pH 9,7, foi preparada na concentração de 200,0 mmol L⁻¹ (50 mmol L⁻¹ de TBS), em água deionizada, e estocada em geladeira. No dia da realização das análises foi diluída concentração apropriada, em água deionizada.

A solução estoque do tampão carbonato NaHCO₃/Na₂CO₃, em pH 10,4, foi preparada na concentração de 200,0 mmol L⁻¹ em água deionizada, e armazenada em geladeira. No dia da realização dos ensaios foi diluída para concentração conveniente, em água deionizada.

A solução estoque de dodecil sulfato de sódio foi preparada em água deionizada na concentração de 250,0 mmol L⁻¹, e estocada em geladeira. No dia da realização dos ensaios foi diluída para a concentração adequada do estoque, em água deionizada.

3.2 PREPARO DE AMOSTRA

As soluções estoques de matéria-prima de molnupiravir na concentração nominal de 500 mg L⁻¹ foram preparadas água deionizada, e estocadas em geladeira. No dia da realização das análises foram diluídas pra concentração conveniente, em água deionizada.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção são descritos os procedimentos experimentais implicados no desenvolvimento deste trabalho.

3.3.1 Eletroforese Capilar

Os experimentos por eletroforese capilar foram realizados, integralmente, em equipamento Agilent Technologies modelo 7100 CE (Palo Alto, Califórnia, EUA), disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. O dispositivo é equipado com detector de arranjo de diodos (do inglês *diode array detector*, DAD) e *software* de aquisição, controle e tratamento de dados ChemStation A.06.01 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

Ainda sobre os experimentos mediados por eletroforese capilar, os capilares empregados foram de sílica fundida revestido de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com comprimento total de 48,5 cm e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 µm de diâmetro interno (d.i) e 375 µm de diâmetro externo (d.e). Além disso, a temperatura do cartucho foi mantida a 25 °C e o sistema operado sob polaridade normal com aplicação de voltagem

constante de + 20 kV, e injeção hidrodinâmica das amostras a 25 mbar por 4 s. As análises foram realizadas em comprimento de onda de 236 nm e 240 nm.

O planejamento experimental foi realizado sob as condições experimentais descritas anteriormente, bem como o método otimizado.

Testes posteriores a etapa de otimização foram realizados em capilares de sílica fundida revestido de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com comprimento total de 68,5 cm e 60,0 cm de comprimento efetivo, 50 μm de diâmetro interno (d.i) e 375 μm de diâmetro externo (d.e). Isto é, modificou-se somente as dimensões do capilar (comprimento total e efetivo, e o d.i) anteriormente empregado, mantendo as demais condições experimentais conforme já haviam sido descritas.

3.3.2 Espectroscopia de absorção ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), dos padrões dos fármacos de molnupiravir e NHC, foram obtidos experimentalmente no espectrofotômetro Ocean Optics modelo USB2000+XR1-ES, disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, usando cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm. Em paralelo, em todas análises realizadas por eletroforese capilar, os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos a partir do sistema de detecção por arranjo de diodos inerente ao aparelho.

3.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Todas as soluções cujo valor de pH foi ajustado foram mediadas em pHmetro digital Digimed modelo DM-22, utilizando o eletrodo modelo DME-CV1, disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para a utilização de um novo capilar foi realizado um condicionamento total de 80 minutos (min), fracionado em *flush* de 40 min de solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹, seguido por 20 min de água deionizada e, por último, 20 min da solução do eletrólito de trabalho.

Em um novo dia de trabalho, no início das análises, o capilar foi condicionado com solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹ por 20 min, água deionizada por 10 min e eletrólito por 10 min, respectivamente.

Em testes iniciais, a limpeza intercorrida do capilar foi realizada com *flush* de solução aquosa NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min e *flush* de solução do eletrólito por 1 min.

A limpeza do capilar entre as corridas foi efetuada na devida ordem: solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹, água deionizada, solução de HCl 1,0 mol L⁻¹, água deionizada e eletrólito, com *flush* de 1 minuto cada, totalizando 5 min de condicionamento intercorrida.

Ao final do dia de trabalho, o capilar foi submetido ao condicionamento final, descrito pela seguinte sequência de lavagem: solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹ por 10 min e água deionizada por 10 min. Posteriormente, o capilar permaneceu dentro do cartucho e à parte do equipamento de eletroforese capilar.

Os eletrodos de platina foram lavados, ao início e fim de cada dia de trabalho, com álcool isopropílico e metanol, nesta ordem, por 15 min cada em banho ultrassônico a temperatura ambiente, conforme rotina de trabalho implementada pelo Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), do Departamento de Química da UFJF.

As micropipetas utilizadas eram calibradas amiúde a fim de mitigar os possíveis erros sistemáticos, levando em consideração a exatidão e precisão das análises.

A cela de detecção foi lavada, regularmente, com álcool isopropílico em banho ultrassônico por 15 min.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas em lavadora ultrassônica por essa ordem: 15 min em detergente Extran MA 02 na proporção de 10 mL do mesmo para 2 L de água, 15 minutos com água e álcool comercial na proporção de 10 mL para 2 L de água, terminado o processo pelo enxágue por 5 vezes com água deionizada.

3.5 DEGRADAÇÃO FORÇADA EM MEIO ALCALINO

O estudo da degradação forçada do molnupiravir foi conduzido expondo a matéria-prima do fármaco às condições de estresse, como teste inicial, por hidrólise alcalina, conforme descrito no Quadro 7.

Quadro 7 - Procedimento de degradação utilizado nas diferentes condições do estudo de degradação forçada

Fator de estresse	Agente de degradação	Temperatura	Coleta
Hidrólise alcalina	Solução de NaOH a 0,1 mol L ⁻¹	ambiente	0h, 2h, 8h e 10h

Fonte: Adaptado de Farias (2020).

3.5.1 Preparo da solução degradante alcalina

A solução estoque do hidróxido de sódio foi preparada na concentração de 1 mol L^{-1} em água deionizada, e armazenada a temperatura ambiente. No dia da realização dos ensaios foi diluída para concentração conveniente, em água deionizada.

3.5.2 Procedimento da degradação, em meio alcalino

A solução estoque da amostra de matéria-prima foi preparada com concentração nominal de 550 mg L^{-1} , e diluída com solução degradante, para a concentração teórica de 250 mg L^{-1} , valor equivalente a concentração do padrão utilizada na otimização do método.

Para isso, uma alíquota de $228 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de matéria-prima, foi adicionada em vial âmbar de 2 mL . Em seguida, a solução estoque de $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ foi diluída para $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e $50 \text{ }\mu\text{L}$ desta solução de foi adicionado ao vial, e $222 \text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada foram adicionados a mistura a fim de completar o volume final de $500 \text{ }\mu\text{L}$. Após a homogeneização da solução em vórtex, por 30 s , o vial foi levado ao equipamento para análise utilizando o método analítico otimizado.

3.6 TRATAMENTO DOS DADOS

Os *softwares* utilizados para o tratamento estatístico dos dados foram: Excel, incluso no pacote da Microsoft Office 2019 Professional Plus 2019, e OriginPro 2018 SR1 b9.5.1.195 (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060, USA).

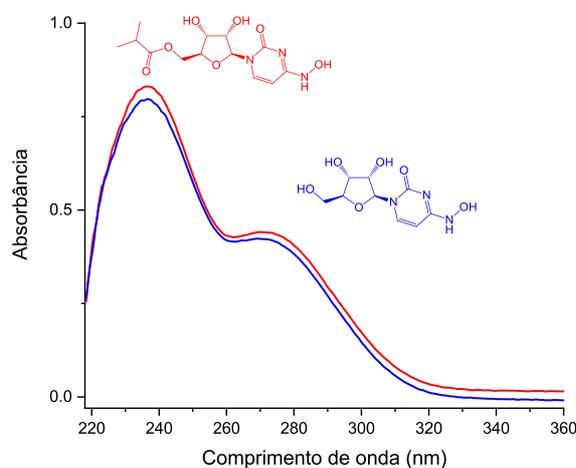
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção são descritos os resultados dos experimentos conduzidos para o desenvolvimento da metodologia analítica, etapa que envolve a adaptação de metodologias previamente validadas, ou proposição original a partir da aplicação de conhecimentos para desenvolver um método adequado (Eurachem, 2014). Diante dos conceitos de equilíbrio-químico, curvas de mobilidade efetiva, e mecanismos de separação em técnicas de eletromigração em capilar, diversos métodos por CE de zona foram implementados, sendo permeados por um processo de otimização utilizando planejamento de experimentos.

4.1 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA

Nos experimentos de eletroforese capilar, a fim de selecionar o comprimento de onda mais apropriado para realizar a detecção do molnupiravir e NHC, foram avaliados os espectros de absorção na região UV-VIS de ambos os fármacos obtidos por espectrofotômetro, com cubeta de 1,0 cm de caminho ótico. Na Figura 11 são apresentados os espectros de absorção de ambas as substâncias, e pode-se afirmar que nas proximidades de 236 nm está compreendido o comprimento de onda (λ) ótimo para a detecção, isto é, aquele que apresenta maior intensidade do sinal da absorbância. É interessante salientar que os espectros de absorção dos analitos são essencialmente similares, refletindo as características estruturais de ambas as moléculas, considerando a presença dos mesmos grupos cromóforos significativos para a absorvidade molar, no comprimento de onda mencionado, possivelmente associado a presença do grupo 4-(hidroxiamina)pirimidin-2(1H)-ona ou N(4)-hidroxicitosina. Portanto, como ambos os fármacos possuem absorvidade molar significativa, em 236 nm, λ com máximo valor de absorbância, deliberou-se que todos os experimentos por eletroforese capilar seriam realizados utilizando a detecção direta no comprimento de onda em questão.

Figura 11 – Espectros de absorção do molnupiravir (vermelho) e do NHC (azul), na concentração de 18 mg L⁻¹ e 14 mg L⁻¹, respectivamente



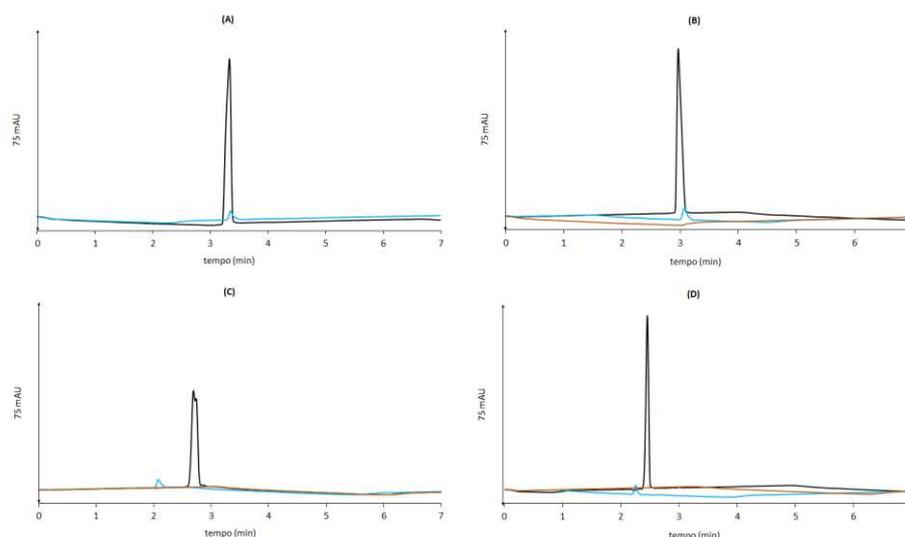
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

4.2 TESTES PRELIMINARES DE SEPARAÇÃO POR CZE

O êxito na separação dos analitos por CZE tem como parâmetro crítico o eletrólito utilizado, visto que a variação no pH do tampão que compõe o eletrólito pode modificar o fluxo eletrosmótico (EOF) ou a mobilidade efetiva, μ_{ef} . Diante disso, uma estratégia interessante para verificar em qual intervalo de pH a separação seria bem sucedida, o que significa identificar onde a mobilidade efetiva de cada um dos analitos se diferencia, poderia ser feita mediante o estudo da curva de μ_{ef} versus pH (Legendre; Ferrance; Landers, 2007; Spudeit *et al.*, 2016).

Com essa motivação, a fim de obter a curva de mobilidade efetiva do NHC e molnupiravir, foi realizado o estudo da mobilidade eletroforética destes analitos, μ_{NHC} e μ_{MPV} , respectivamente, após a injeção da solução aquosa contendo uma mistura dos padrões dos fármacos (solução MIX), na concentração de 250 mg L⁻¹ cada, em diferentes eletrólitos. As condições experimentais utilizadas para a determinação da mobilidade eletroforética, μ_{ep} , dos analitos foram idênticas para os distintos eletrólitos avaliados, e os eletroferogramas do eletrólito (linha marrom), do metanol (linha azul), e da mistura dos padrões dos fármacos, solução MIX, (linha preta) são apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Eletroferogramas da solução MIX com diferentes eletrólitos avaliados por CZE



Os eletrólitos avaliados foram solução tampão fosfato, em pH 7,2 (A); solução tampão Tris e HCl, em pH 8,2 (B); solução tampão TBS em pH 9,7 (C); solução tampão carbonato, em pH 10,4 (D); na concentração de 20,0 mmol L⁻¹ para todas as soluções, diluídas a partir das suas respectivas soluções estoque. Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); 75 µm d.i., 375 µm d.e; injeção hidrodinâmica 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

É interessante salientar a partir da Figura 12, que diante das condições experimentais definidas, não houve separação dos fármacos por CZE, tendo em vista que o tempo de migração dos analitos são iguais em todos os eletrólitos avaliados. Dessa forma, para facilitar a representação do cálculo das mobilidades eletrosmóticas de ambos analitos, μ_{NHC} , e μ_{MPV} , ambas serão denotadas apenas por μ_{obs} , assim como o tempo de migração do NHC, t_{NHC} , e molnupiravir, t_{MPV} , sendo descritos somente como t_{obs} , considerando a mistura de fármacos como um único composto, atentando-se para o perfil de separação.

O cálculo das mobilidades μ_{ep} , μ_{obs} , e a mobilidade do fluxo eletrosmótico, μ_{osm} , foi respaldado pelas Equações 6, 9 e 5 (Baker, 1995), nessa ordem, e os valores podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores extraídos dos eletroferogramas para o cálculo da mobilidade eletroforética dos fármacos

Eletrólito (20,0 mmol L ⁻¹)	t_{obs} (min)	t_{EOF} (min)	μ_{ep} 10 ⁻⁵ (cm ² s ⁻¹ V ⁻¹)
Tampão fosfato, em pH 7,2	3,342	3,368	0,374
Tampão Tris/HCl, em pH 8,2	2,981	3,075	1,652
Tampão TBS, em pH 9,7	2,694	2,081	-17,690
Tampão carbonato, em pH 10,4	2,449	2,254	-5,720

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

É interessante destacar os valores negativos, apresentados na Tabela 1. Tais valores de mobilidade eletroforética para os analitos, podem ser racionalizados por meio da Equação 9. Algebricamente, $\mu_{ep} < 0$ significa que o analito se move em direção contrária ao EOF, diante das condições experimentais avaliadas: EOF e polaridade normal. Outra maneira mais intuitiva pode ser mediante análise dos eletroferogramas da Figura 12.C e D, em ambos, o EOF possui um tempo de migração menor (pico azul), evidenciando que eles migram até o detector com velocidade maior que a dos analitos. Além disso, é observado o aumento nos dos valores da μ_{ep} dos analitos à medida em que há o aumento no valor de pH do meio, conforme esperado. Entretanto, o valor da mobilidade eletroforética em tampão TBS, pH 9,7, possui valor discrepante, em magnitude, em relação aos demais, possivelmente associado ao acúmulo de cargas na formação da dupla camada elétrica, no interior do capilar, devido a formação de complexos iônicos do tampão. Enquanto que em $7,2 < \text{pH} < 8,2$, os analitos tem mobilidade positiva, migrando com velocidade eletroforética na direção do cátodo, mesmo sentido do EOF. A magnitude destes valores está em conformidade com perfil dos eletroferogramas, pois o pico do EOF está junto ao pico dos analitos.

Na separação de compostos que possuem caráter de eletrólito fraco, deve-se considerar a contribuição da molécula ionizada e a não ionizada, com mobilidade zero; a fração de distribuição de todas as espécies, α , e a mobilidade eletroforética do analito, μ_{ep} . Para o cálculo da distribuição das espécies presentes nos equilíbrios químicos do sistema ácido-base diprótico, conforme Brønsted–Lowry, a partir de soluções aquosas de NHC e o molnupiravir, os valores de α_0 , α_1 e α_2 são dados pelas equações 19, 20 e 21, nesta ordem (Skoog, 2006):

$$\alpha_0 = \frac{10^{-2pH}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa1}10^{-pH} + 10^{-pKa1}10^{-pKa2}} \quad (19)$$

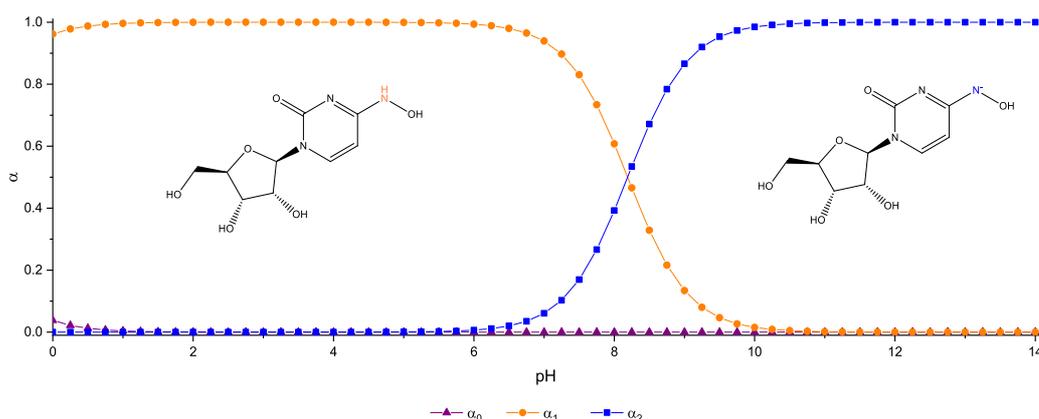
$$\alpha_1 = \frac{10^{-pH}10^{-pKa1}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa1}10^{-pH} + 10^{-pKa1}10^{-pKa2}} \quad (20)$$

$$\alpha_2 = \frac{10^{-pKa1}10^{-pKa2}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa1}10^{-pH} + 10^{-pKa1}10^{-pKa2}} \quad (21)$$

em que α_0 , α_1 e α_2 representam a distribuição das espécies catiônica, neutra e aniônica, nesta ordem, presentes nos sistema ácido-base de cada um dos analitos, em um dado valor de pH. As constantes de dissociação ácida dos analitos são pK_{a1} e pK_{a2} .

Na Figura 13 é apresentado as curvas de distribuição das espécies de NHC em função do pH, sendo possível inferir que em pH inferior a 6,0 a forma neutra é a espécie predominante da molécula, e em valores de pH superiores a 8,0, a espécie aniônica prevalece.

Figura 13 – Valores α para cada espécie de NHC em função do pH.

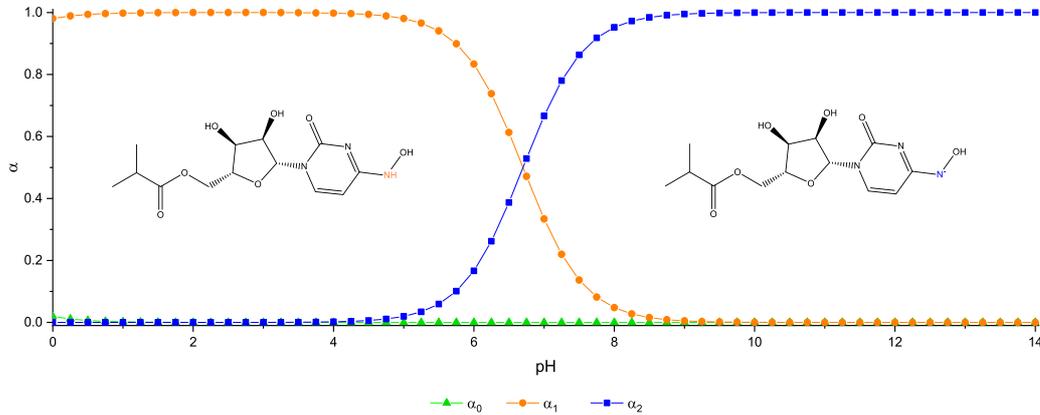


Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Considerando o mesmo silogismo para o molnupiravir, em pH inferior a 4,0 a espécie predominante é neutra, enquanto que em valores de pH superiores a 9,0, a espécie aniônica

prevalece, conforme valores α para cada espécie de molnupiravir em função do pH, apresentadas na Figura 14.

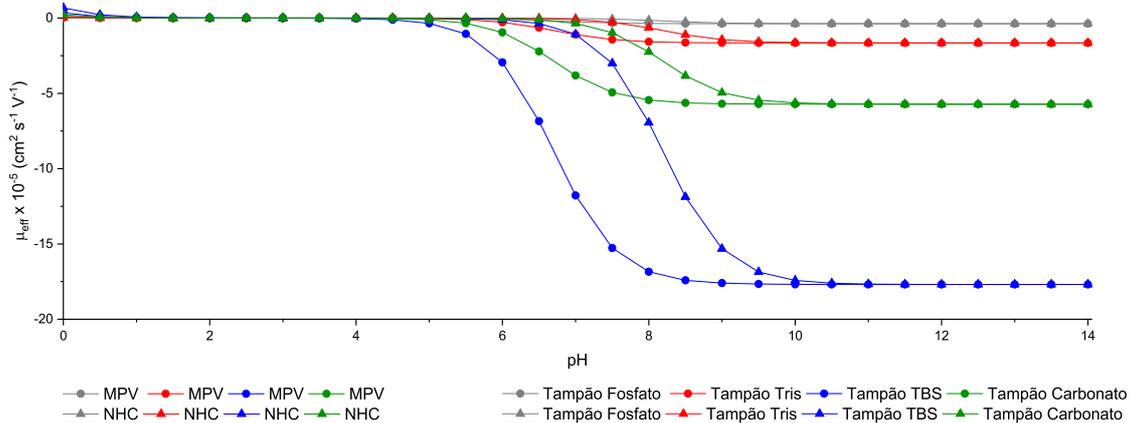
Figura 14 – Composição de soluções de molnupiravir em função do pH.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Dessa forma, outra maneira de avaliar a separação dos analitos pode ser feita pelas curvas de mobilidade efetiva em função do pH, conforme Figura 15.

Figura 15 – Curvas de mobilidade efetiva para o NHC e o molnupiravir em função do pH.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Diante dos dados até então apresentados, parece haver uma informação conflitante entre o perfil de separação dos fármacos e a informação que pode ser extraída tanto das curvas de distribuição (Figuras 13 e 14), quanto das curvas de mobilidade efetiva (Figura 15), para ambos os compostos. É possível observar na Figura 15, que entre valores de pH 6,0 e 9,0 a separação dos fármacos seria possível por CZE, dado a diferença de mobilidade efetiva entre os analitos.

Entretanto, este comportamento não é observado nos eletroferogramas apresentados na Figura 12.

É interessante salientar que os cálculos envolvidos, neste trabalho, na construção das curvas de mobilidade efetiva não conseguem descrever e abranger todos os fenômenos físico-químicos que se procedem no interior do capilar, no momento da separação, o que pode influenciar diretamente nos valores das mobilidades efetivas de cada espécie. Neste sentido, mais estudos seriam necessários para corroborar com a hipótese dos sistemas de complexação que poderiam ser formados a partir da matriz dos tampões, e interação destes com os analitos, sobretudo no uso de TBS, evento que pode estar ocorrendo neste sistema eletrolítico. Além disso, outro questionamento pertinente seria avaliar quais os valores mais adequados das constantes de dissociação ácida (K_a) dos analitos, mediante titulação potenciométrica, uma vez que os valores disponíveis na literatura são baseados em cálculos teóricos. Assim, os valores das constantes de dissociação ácida interferem diretamente nos cálculos das frações de distribuição das espécies (α) predominantes em diferentes intervalos de pH, que por sua vez, modificam o perfil da curva de mobilidade efetiva dos compostos de interesse.

Dessa forma, as curvas de mobilidade efetiva da Figura 15 não descrevem, nas condições experimentais avaliadas, o perfil de separação dos analitos, conforme os eletroferogramas da Figura 12, levando a conclusão que não houve êxito na separação dos fármacos por CZE. A separação é uma agremiação de duas estratégias: maximização das diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimização das causas de alargamento das zonas. Assim, uma possível alternativa, em referência a primeira abordagem, seria a adição de agentes tensoativos iônicos na composição do eletrólito a fim de alterar a mobilidade dos analitos.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste contexto, o estudo da otimização da composição do eletrólito foi realizado a partir de um planejamento fatorial 3^2 , sendo utilizados padrões dos fármacos molnupiravir e NHC, a fim de investigar qual eletrólito proporcionaria o melhor perfil de separação entre esses analitos. Os fatores avaliados foram o valor de pH, a partir de soluções tampão distintas com concentração fixada em $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e a concentração de SDS, havendo três níveis para cada fator, conforme matriz de planejamento descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 3²

Fator	Níveis		
	-1	0	+1
1 Solução tampão (20,0 mmol L ⁻¹)	Tris/HCl (pH = 8,2)	TBS (pH = 9,7)	NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ (pH = 10,4)
2 Concentração de SDS (mmol L ⁻¹)	20,0	40,0	60,0

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Neste caso, entende-se como condição ótima aquela com melhor perfil de separação entre todos os picos evidentes no eletroferograma em estudo, de modo tautócrono, e no menor intervalo de tempo possível. Dessa forma, pode-se elucidar tanto o caráter qualitativo, pelo perfil de separação, quanto o viés quantitativo, através da resolução cromatográfica, para a variável resposta do planejamento fatorial em questão, dispondo de tais estratégias conforme necessárias.

O viés quantitativo do perfil de separação poderia ser analisado mediante a resolução cromatográfica, entretanto, devido ao ICE limitado pela cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC), há uma alteração na expressão utilizada para o cálculo da resolução cromatográfica convencional. Dessa forma, de acordo com Nishi e Terabe (Terabe; Otsuka; Ando, 1985), a resolução em MEKC é dada pela Equação 22:

$$R_s = \frac{N^{\frac{1}{2}}}{4} \left(\frac{\phi - 1}{\phi} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left(\frac{1 - t_0/t_{mc}}{1 + (t_0/t_{mc})k'_1} \right) \quad (22)$$

sendo N a eficiência representada como o número de pratos teóricos, $\phi = \frac{k'_2}{k'_1}$ a seletividade, na qual os índices 1 e 2 subscritos fazem referência a ordem de eluição dos analitos; t_0 é o tempo de retenção de um marcador neutro e k' o fator de capacidade ou coeficiente de partição dos analitos.

Quando o tempo de migração da micela (t_{mc}) é muito maior que o tempo de migração do fluxo eletrosmótico (t_0), o último termo da Equação 22 (entre parênteses), tende ao valor unitário, reduzindo a equação a cromatografia convencional, conforme Equação 23 (Terabe *et al.*, 1984).

$$R_s = \frac{N^{\frac{1}{2}}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (23)$$

Outro desdobramento dessa relação é observado pelo fator capacidade de um analito neutro, dada pela Equação 24.

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0 - \left(1 - t_r/t_{mc} \right)} \quad (24)$$

Quando t_{mc} é muito maior que o tempo de retenção para um analito neutro (t_r), a expressão do fator de capacidade é equivalente a utilizada em cromatografia, de acordo com a Equação 25 (Terabe *et al.*, 1984).

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (25)$$

Contudo, quando se trata de um soluto eletricamente carregado, o fator capacidade é descrito pela Equação 26 (Baker, 1995), na qual μ_{eo} representa a mobilidade eletroosmótica, μ_{ep} a mobilidade eletroforética do analito, na ausência de micela, e μ_{mc} a mobilidade da micela.

$$k' = \frac{\mu_{eo}/\mu_{ep} - 1}{1 - \mu_{mc}/\mu_{ep}} \quad (26)$$

Com isso, a fim de analisar os pares críticos de dois picos consecutivos quantitativamente, seria necessário injetar além de um marcador de fluxo, como MeOH, para obtenção de t_0 , um marcador neutro como Sudan III, para obtenção de t_{mc} para os diferentes eletrólitos de corrida avaliados. Rigorosamente, o cálculo da resolução em MEKC implicaria em um maior número de experimentos na avaliação da separação entre molnupiravir e NHC, analitos eletricamente carregados nas condições estabelecidas. Uma vez que a finalidade do planejamento experimental é angariar as melhores condições juntamente com um número reduzido de experimentos, optou-se por efetuar um julgamento qualitativo do perfil de separação, a partir do planejamento experimental desenvolvido (Hancu *et al.*, 2013).

Diante destas considerações, nesse planejamento, a análise dos padrões dos fármacos foi realizada a partir de uma solução aquosa MIX, composta por 250 mg L⁻¹ de MPV e 250 mg L⁻¹ de NHC, mediante a diluição das respectivas soluções estoque de 500 mg L⁻¹. Além disso, os experimentos de eletroforese capilar foram realizados com 3 injeções consecutivas da

solução MIX, e do metanol, como marcador do tempo de retenção do fluxo eletrosmótico, uma vez que se deseja evidenciar as diferenças de mobilidade do EOF e dos analitos, uma condição que limitava a separação por CZE.

Os parâmetros de análise foram mantidos constantes para todos os níveis experimentais: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); diâmetro interno e externo do capilar: 75 μm e 375 μm , respectivamente; injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm e 240 nm. O condicionamento intercorridas de 5 min foi definido em *flush* de solução aquosa NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min, *flush* de solução HCl 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min e *flush* de solução do eletrólito por 1 min.

Isto posto, a matriz de coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 3² é apresentada na Tabela 3, totalizando 11 ensaios experimentais, com triplicata no ponto central, cujos eletroferogramas são expostos na Figura 16.

Tabela 3 – Matriz de coeficiente de contraste para um fatorial 3²

<i>Ensaio</i> *	Concentração de SDS (mmol L ⁻¹)	<i>Solução Tampão</i>
A (2)	-1.00	-1.00
B (11)	0.00	-1.00
C (5)	1.00	-1.00
D (8)	-1.00	0.00
E (3)	0.00	0.00
F (6)	1.00	0.00
G (4)	-1.00	1.00
H (10)	0.00	1.00
I (7)	1.00	1.00
J (1)	0.00	0.00
K (6)	0.00	0.00

*A ordem de execução dos experimentos é denotada pelo algarismo entre parênteses. Níveis: Concentração de SDS (mmol L⁻¹): (-1) 20; (0) 40; (1) 60. Soluções tampão (20 mmol L⁻¹): (-1) tampão Tris/HCl em pH = 8,0; (0) tampão TBS em pH = 9,0; (1) tampão carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) em pH = 10,0.

Fonte: Próprio autor.

A ordem dos experimentos foi apresentada na Tabela 3, pois almejava-se avaliar o planejamento considerando ferramentas estatísticas. Entretanto, a significância química prevaleceu na otimização. Conforme apresentado na Figura 16, o caráter qualitativo se mostrou

satisfatório para a escolha do melhor perfil de separação dos analitos. Assim, uma avaliação mais criteriosa de cada nível experimental é descrita a seguir.

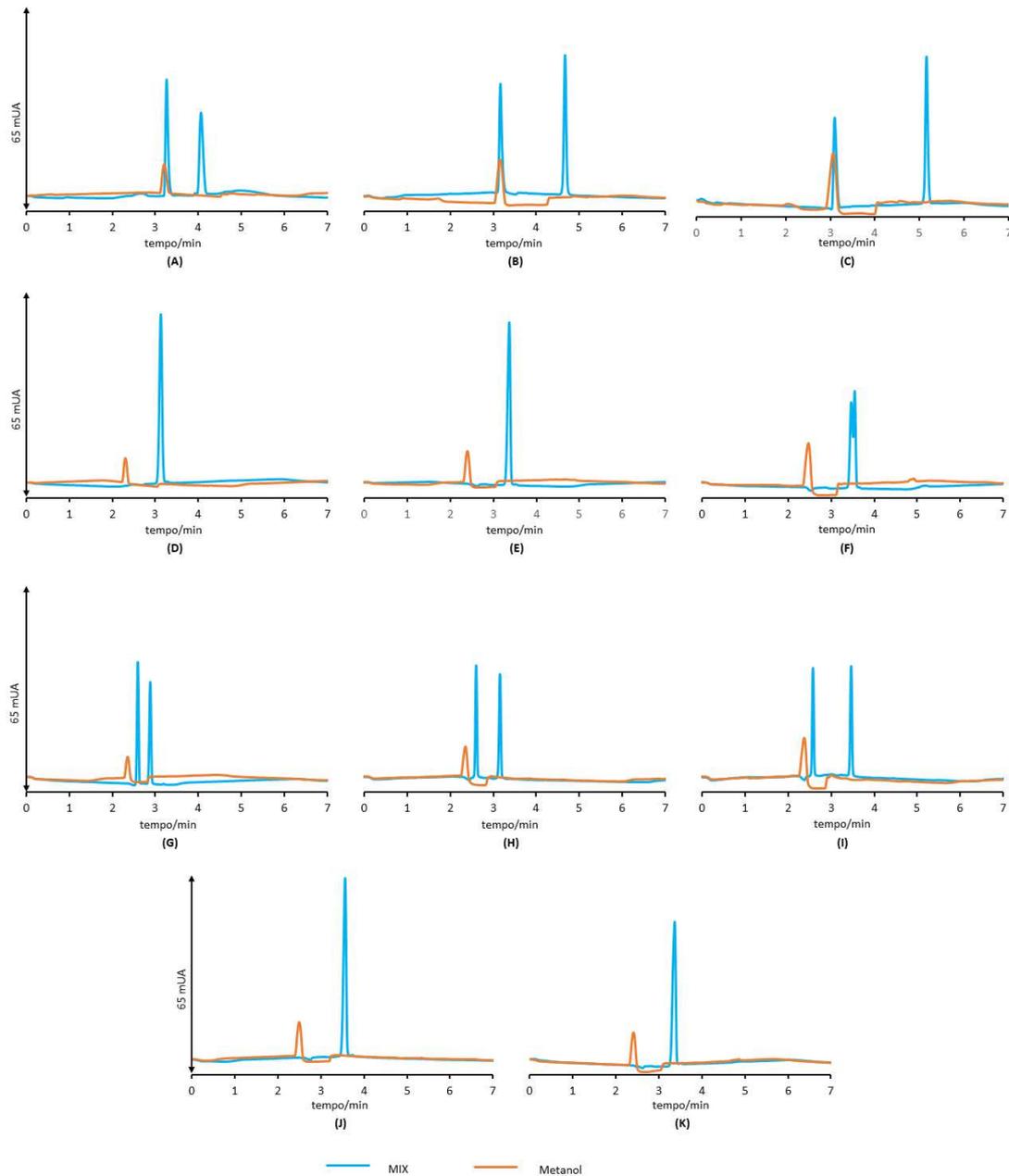
Nos ensaios D, E, J, K e F correspondentes ao eletrólito contendo SDS na concentração de 20,0, 40,0, 40,0, 40,0 e 60,0 mmol L⁻¹, respectivamente, juntamente com solução tampão TBS 20,0 mmol L⁻¹, em pH 9,7, não houve separação dos analitos em nenhum dos níveis de SDS avaliados, considerando a ausência de dois picos no eletroferograma. Neste contexto, a intensidade do sinal analítico, em cada ensaio, e a separação incompleta entre os picos do ensaio F corroboram para tal afirmação.

Em contrapartida, os analitos foram separados em todos os ensaios com solução tampão Tris/HCl 20,0 mmol L⁻¹, em pH 8,2, na composição do eletrólito. Nestas condições (A, B e C), embora a separação entre os analitos tenha sido eficiente (em azul), um dos analitos possui o mesmo tempo de retenção que o fluxo eletrosmótico (EOF), evidenciado pela sobreposição do pico de metanol (laranja) com um dos analitos (em azul), comportamento observado em todos os fatores de SDS considerados (A - 20,0; B - 40,0 e C - 60,0 mmol L⁻¹). Com isso, tais características inviabilizam a utilização destas condições de análise.

Em todos os ensaios realizados com eletrólito em pH 10,4 (G, H e I), contendo solução tampão carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) 20,0 mmol L⁻¹, a separação entre os analitos pode ser considerada eficiente, de modo que separação entre o NHC e MPV, e entre os dois analitos e o fluxo eletrosmótico aumentam à medida em que a concentração de SDS se torna maior na composição do eletrólito. Entretanto, a baixa resolução, ainda que identificada de maneira qualitativa, entre o pico do analito com menor tempo de retenção e o fluxo eletrosmótico, observado no ensaio G, não demonstra um perfil de separação satisfatório.

Ao avaliar a os eletroferogramas referente aos ensaios H e I, o ensaio I apresenta maior resolução entre todos os picos de forma simultânea, havendo uma separação eficiente entre o pico do analito com menor tempo de retenção (pico 1), em azul, e o pico alusivo ao fluxo eletrosmótico (EOF) indicado pelo metanol (laranja), juntamente com o aumento da resolução entre os pares críticos, entre o pico 1 e o analito com maior tempo de retenção (pico 2).

Figura 16 – Eletroferogramas dos 11 ensaios experimentais (A-K) do planejamento fatorial 3^2 , conforme Tabela 3



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); 75 μm d.i, 375 μm d.e; injeção hidrodinâmica 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm. Em azul a solução MIX, contendo a mistura dos padrões de MPV e NHC na concentração de 250 mg L^{-1} , e em laranja metanol.

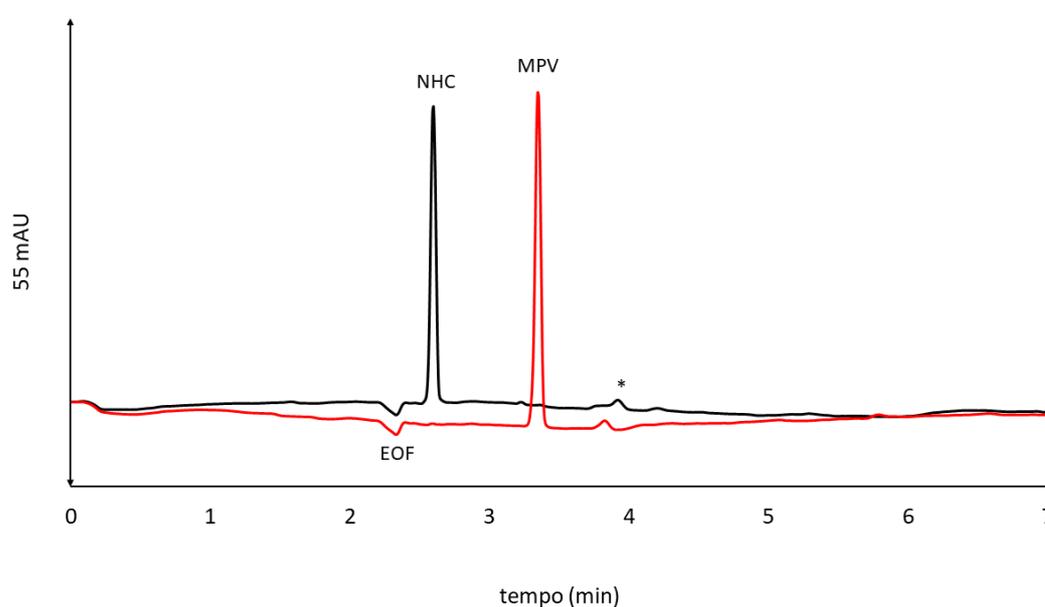
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Além disso, no ensaio I o aumento da resolução entre os fármacos não acarretou um aumento no tempo total da corrida. Dessa forma, este ensaio define a condição mais adequada

para obtenção do melhor perfil de separação entre os fármacos, diante do recorte experimental estudado.

No intuito de identificar a ordem de migração dos analitos no eletroferograma do ensaio I, os padrões dos fármacos foram injetados separadamente sob as condições experimentais otimizadas, conforme apresentado na Figura 17. O NHC (linha preta) e MPV (linha vermelha) apresentaram tempo de retenção t_{NHC} de 2,598 min, t_{MPV} de 3,349 min, respectivamente.

Figura 17 – Eletroferogramas dos analitos NHC (linha preta) e MPV (linha vermelha) utilizando o eletrólito otimizado



*pico não identificado. Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); 75 μm d.i, 375 μm d.e; injeção hidrodinâmica 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm. A solução de NHC (linha preta) na concentração de 250 mg L⁻¹, e MPV (linha preta) na concentração de 250 mg L⁻¹. Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Assumindo o caráter aniônico de ambas espécies, a ordem de migração dos compostos, conforme eletroferogramas da Figura 17, pode ser racionalizada mediante a interação das micelas de SDS com os analitos, quanto maior a extensão da associação entre soluto/micela maior o tempo de retenção dos solutos (Tavares, 1997), isto é, o MPV possui maior interação com as micelas aniônicas do que o NHC, e por isso, possui maior tempo de retenção. Estudos envolvendo técnicas computacionais de simulação em dinâmica molecular seriam uma possibilidade para a compreensão mais apurada dos mecanismos de formação dos complexos de inclusão, que poderiam ser formados no equilíbrio de partição, dos fármacos, entre as

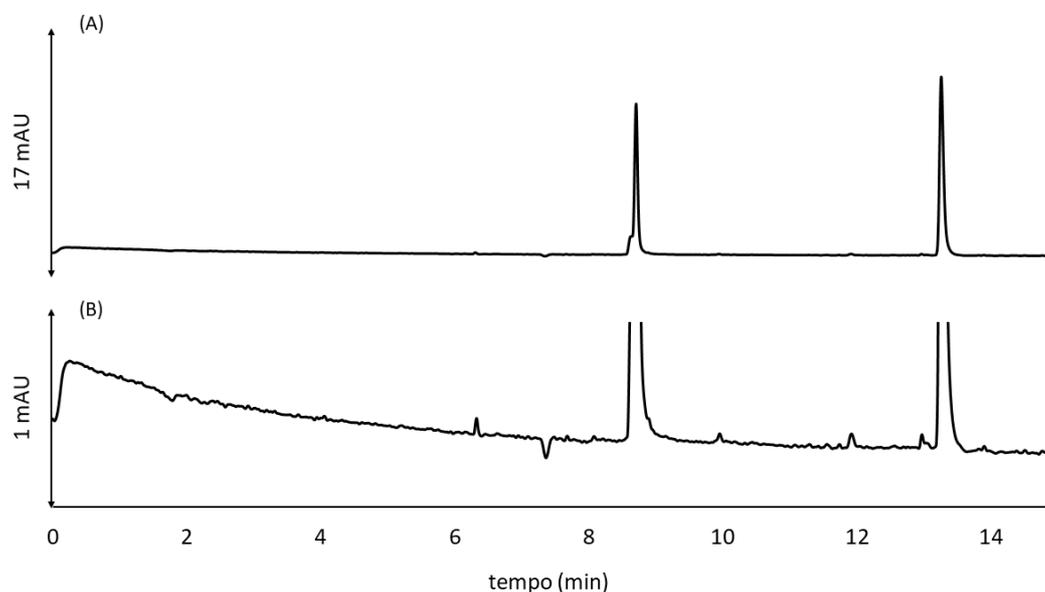
micelas e o tampão de carbonato, e por consequência, a sua influência na separação destes compostos em MEKC.

4.4 TESTE COM TROCA DAS DIMENSÕES DO CAPILAR

Um estudo após a otimização do eletrólito foi propositado, a fim de avaliar a influência na separação dos analitos, sobretudo na linha base, a partir das alterações nas dimensões do capilar, aumento no comprimento (total e efetivo) e redução do d.i. Diante destas considerações, neste estudo, a análise dos padrões dos fármacos foi realizada a partir de uma solução aquosa MIX, composta por 250 mg L⁻¹ de MPV e 250 mg L⁻¹ de NHC, mediante a diluição das respectivas soluções estoque de 500 mg L⁻¹.

Os ensaios foram conduzidos em capilares de sílica fundida revestido de poliimida, com comprimento total de 68,5 cm e 60,0 cm de comprimento efetivo, 50 µm de diâmetro interno (d.i) e 375 µm de diâmetro externo (d.e). As demais condições instrumentais e procedimentais dos parâmetros otimizados foram utilizadas: temperatura do cartucho mantida em 25,0 °C, voltagem positiva de 20 kV (modo normal); injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 4s; eletrólito constituído por solução tampão carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) na concentração de 20 mmol L⁻¹, em pH 10.4, e SDS na concentração de 60 mmol L⁻¹; detecção em 236 nm; tempo total de análise 22 minutos. O condicionamento entre as corridas foi estabelecido em *flush* de solução aquosa NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min, *flush* de solução HCl 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min e *flush* de solução do eletrólito por 1 min. Na Figura 18, pode ser observado os eletroferogramas do estudo da modificação nas dimensões do capilar.

Figura 18 – Eletroferogramas da solução MIX para avaliação da troca das dimensões do capilar



Condições de análise: capilar de 68,5 cm de comprimento total (60,0 cm efetivo); 50 μm d.i, 375 μm d.e; injeção hidrodinâmica 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm.

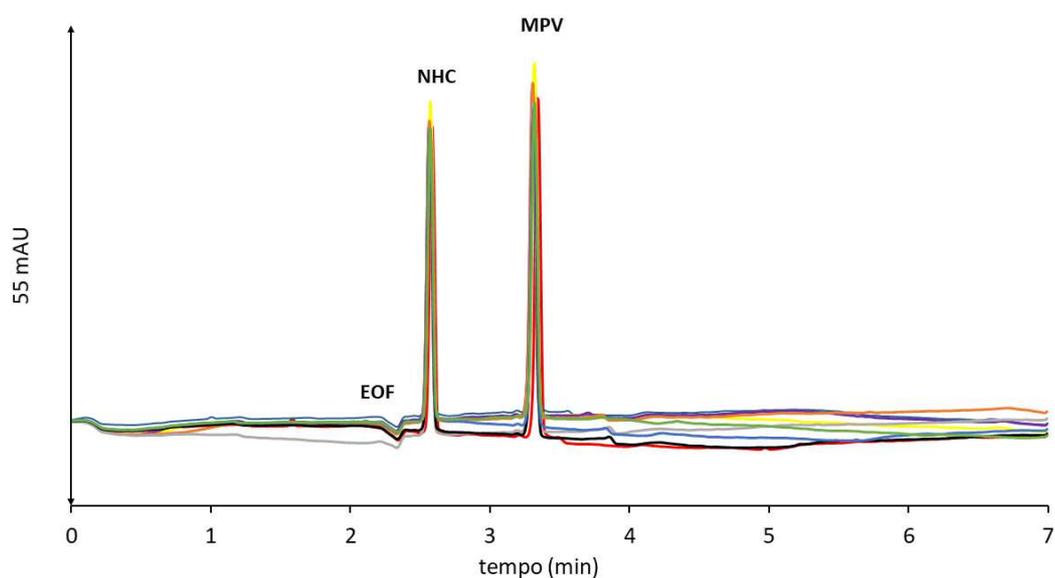
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A partir dos eletroferogramas da Figura 18.A, é possível inferir que houve um aumento na resolução da separação dos analitos, entretanto o tempo total de análise é aproximadamente duas vezes maior em relação ao método previamente otimizado, reduzindo a frequência analítica. Além disso, houve uma piora na estabilidade da linha base, aumentando significativamente a relação sinal/ruído, sobretudo nas imediações dos picos dos analitos, conforme apresentado na Figura 18.B. A redução no caminho ótico também afetou a intensidade do sinal analítico, conforme esperado, entretanto, isso afeta negativamente a sensibilidade analítica. Diante destas considerações, sob o recorte em investigação, um novo processo de otimização seria necessário. Com isso, o uso de capilares de sílica fundida revestido de poliimida, com comprimento total de 48,5 cm e 8,0 cm de comprimento efetivo, 50 μm de diâmetro interno (d.i) possuem melhor desempenho analítico do que os capilares em investigação, sendo portanto empregados nas análises subsequentes, juntamente com as condições as demais condições experimentais previamente estabelecidas.

4.5 REPETIBILIDADE DO ELETRÓLITO

A repetibilidade do eletrólito otimizado foi avaliada através da injeção de uma solução padrão com a mistura dos fármacos na concentração de 250 mg L⁻¹, de cada analito, sob as mesmas condições experimentais por nove vezes consecutivas, e os eletroferogramas correspondentes são apresentados na Figura 19. O pico referente ao EOF possui tempo de migração equivalente a 2,353 min. Os valores correspondentes ao RSD% para avaliação da área e tempo de retenção do molnupiravir (t_{MPV}), são apresentados na Tabela 4.

Figura 19 – Eletroferogramas do estudo de repetibilidade do eletrólito otimizado



*($n = 9$)

Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); 75 μ m d.i, 375 μ m d.e; injeção hidrodinâmica 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 4 – Estudo da repetibilidade do eletrólito otimizado para o molnupiravir

	Área	t_{MPV} (min)
Média*	111.86	3.317
RSD (%)*	3.32	0.328

*($n = 9$)

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Diante dos valores dispostos na Tabela 4, o ensaio experimental I apresentou baixo valor de RSD considerando, respectivamente, a área do molnupiravir e o tempo de migração, presentes em cada eletroferograma, conforme demonstrado na Figura 19, indicando que o ensaio experimental I é a condição mais adequada para a análise dos fármacos.

Logo, o método desenvolvido e otimizado pode ser descrito pelo uso de capilar de sílica fundida revestido externamente com poliimida com comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm efetivo) e 75 µm d.i x 375 d.e; temperatura do cartucho mantida em 25,0 °C, voltagem positiva de 20 kV; injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 4s; eletrólito constituído por solução tampão carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) na concentração de 20 mmol L⁻¹, em pH 10.4, e SDS na concentração de 60 mmol L⁻¹; detecção em 236 nm; tempo total de análise 12 minutos. O condicionamento entre as corridas foi estabelecido em *flush* de solução aquosa NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min, *flush* de solução HCl 1 mol L⁻¹ por 1 min, *flush* de água deionizada por 1 min e *flush* de solução do eletrólito por 1 min.

4.6 VALIDAÇÃO

Posteriormente a otimização das condições eletroforéticas, a validação parcial do método atentou-se aos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, sendo avaliados por meio de ensaios com soluções padrão e a matéria-prima.

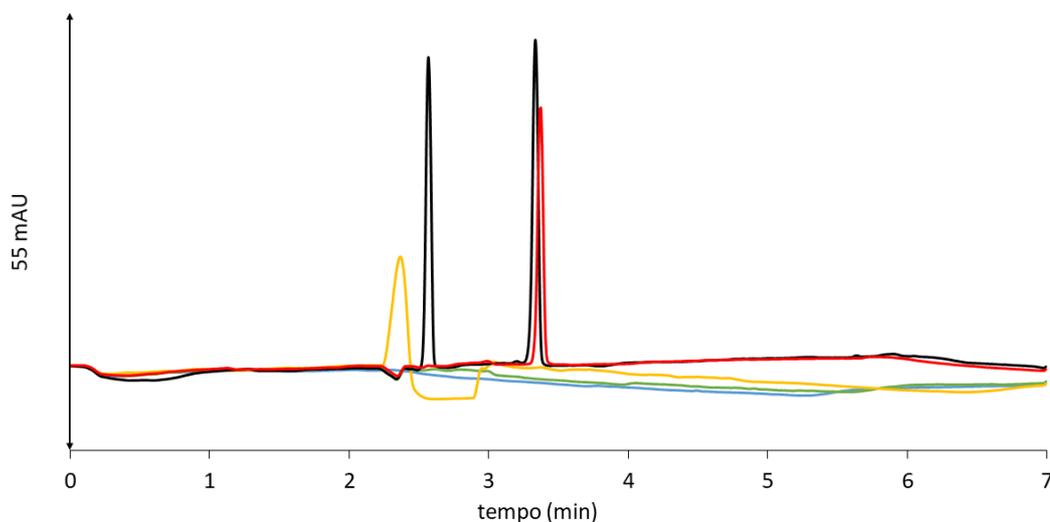
4.6.1 Seletividade

A análise da seletividade do método foi realizada através da comparação do perfil dos eletroferogramas da matéria-prima do molnupiravir (amostra), com o MIX dos padrões dos fármacos. Também foram injetados o eletrólito, metanol e água deionizada. A injeção da solução contendo a mistura dos fármacos na concentração de 253 e 250 mg L⁻¹ para MPV e NHC, respectivamente, e a solução aquosa da matéria-prima na concentração teórica de 235,2 mg L⁻¹, são apresentados nos eletroferogramas da Figura 20.

De acordo com os eletroferogramas da Figura 20, não são identificados a interferência do eletrólito (linha azul), da água (linha verde), e metanol (linha amarela) no eletroferograma referente a matéria-prima do molnupiravir (linha vermelha), que possui mesmo tempo de migração que o padrão de MPV, presente no eletroferograma da mistura dos padrões dos

fármacos (linha preta). Logo, é possível concluir que o método é seletivo para o molnupiravir diante da presença do NHC, sem efeito de matriz, conforme demonstrado na Figura 20.

Figura 20 – Eletroferogramas do estudo da seletividade do método desenvolvido e otimizado



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); 75 μm d.i, 375 μm d.e; injeção hidrodinâmica 25 mbar por 4,0 s; detecção em 236 nm. A solução de NHC (linha preta) na concentração de 250 mg L^{-1} , e MPV (linha preta) na concentração de 253 mg L^{-1} .

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

4.6.2 Precisão Instrumental

A precisão do método foi expressada por meio da repetibilidade, através da injeção da matéria prima do molnupiravir na concentração nominal de 235,2 mg L^{-1} , sob as mesmas condições por seis vezes consecutivas, em um único nível. Os valores correspondentes ao RSD para verificação da área e tempo de migração do molnupiravir, são apresentados na Tabela 5.

Além disso, a precisão também foi expressa pela precisão intermediária, que foi avaliada através do RSD das áreas do MPV e tempo de migração, provenientes de corridas sucessivas da matéria-prima realizadas em dois dias distintos, com o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade, conforme Tabela 5 (Brasil, 2017a). A amostra foi preparada na concentração nominal de 235,2 mg L^{-1} .

Tabela 5 – Valores de RSD para a repetibilidade e precisão intermediária

	Repetibilidade - RSD (%) [*]	Precisão intermediária - RSD (%) ^{**}
Área	0,91	1,18
t_m	0,14	3,49

^{*}($n = 6$), ^{**}($n = 12$)

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Os valores de RSD para as áreas do pico do molnupiravir na matéria-prima foram inferiores a 5%, relativo a repetibilidade e a precisão intermediária.

4.6.3 Exatidão

A exatidão do método foi analisada através de ensaios de recuperação, com fortificação das amostras com soluções padrão, em três níveis de concentração distintos de molnupiravir, em triplicata autêntica. Os níveis selecionados foram 80, 100 e 120% da concentração nominal de matéria-prima, correspondendo as concentrações 156,80 mg L⁻¹, 196,00 mg L⁻¹, 235,20 mg L⁻¹, respectivamente. A recuperação foi determinada pela Equação 16, e os dados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Porcentagem de recuperação média e desvio padrão para o molnupiravir

Nível	Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
80%	156,80	112,93 ± 4,83
100%	196,00	90,99 ± 3,76
120%	235,20	92,00 ± 12,74

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

De acordo com a Tabela 6, é possível inferir que a recuperação para o molnupiravir variou de 91% a 113%, na matéria-prima. Acredita-se que o valores de exatidão apresentariam melhor desempenho com o aumento no número de réplicas autênticas, em cada nível. Mais ensaios seriam necessários para confirmar tal proposição. Além disso, a identificação da faixa aceitável para os valores de recuperação do molnupiravir ainda não estão disponíveis em métodos compendiais para comparação com os valores reportados neste trabalho.

4.6.4 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método da relação sinal-ruído, extraído dos eletroferogramas da amostra, cujo cálculo é denotado pelas Equações 13 e 14, respectivamente. A matéria-prima foi preparada em seis réplicas autênticas, apresentando valores médios de LD igual a 3,40 mg L⁻¹, e LQ equivalente a 11,36 mg L⁻¹, para o molnupiravir. É interessante salientar que a amostra poderia ter sido injetada nas concentrações referidas, a fim de averiguar se os valores calculados estão em conformidade com o real desempenho analítico do método.

4.7 DEGRADAÇÃO FORÇADA

Nesta seção são detalhados os materiais e métodos utilizados no estudo de degradação forçada conduzidos em meio alcalino.

4.7.1 Amostra controle

A matéria-prima do molnupiravir foi injetada sem degradação, amostra controle, a fim de compará-la com as amostras que foram submetidas ao processo de degradação forçada. Esta solução foi utilizada como referência para o cálculo de teor de MPV e formação dos PDs, a fim de demonstrar que a formação dos PDs se deve, substancialmente, a ação da solução degradante.

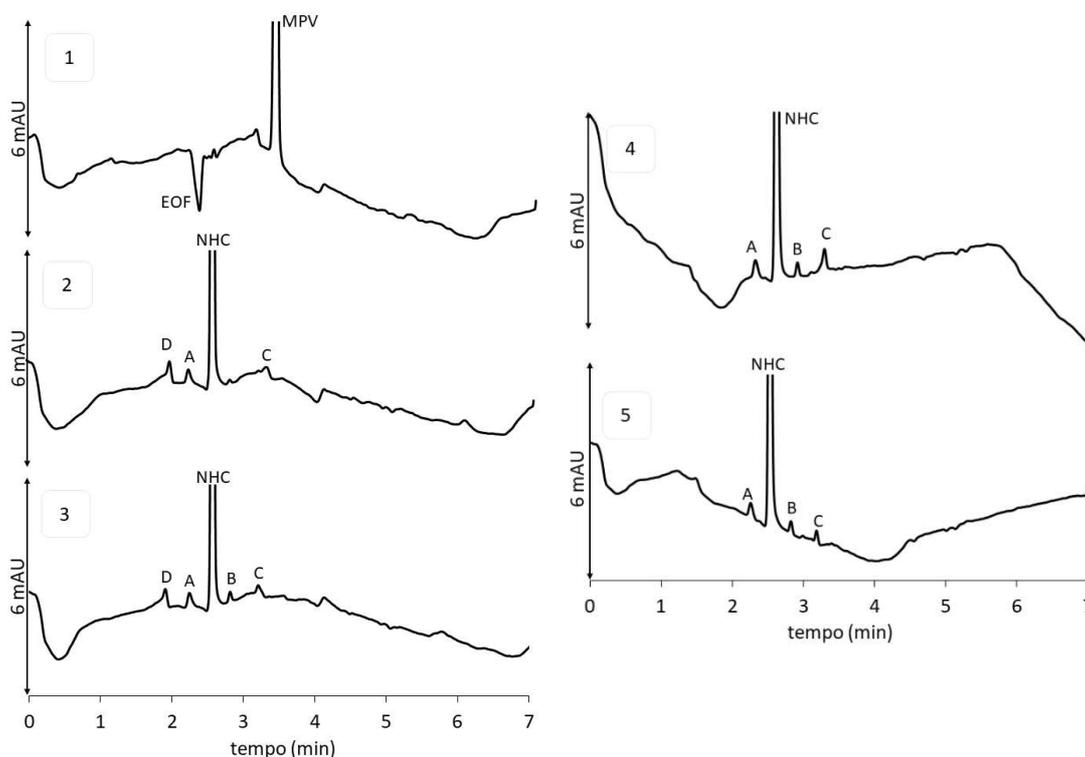
4.7.2 Degradação por hidrólise alcalina

Inúmeros medicamentos possuem água em sua formulação, possibilitando que a hidrólise seja um mecanismo de degradação muito comum. De modo geral, as indústrias farmacêuticas antepõem os estudos de degradação conduzidos por hidrólise ácida e alcalina em preparações de soluções e suspensões (Baertschi; Alsante; Reed, 2011).

Ainda que as atuais formulações de molnupiravir, disponíveis no mercado, sejam considerados uma forma farmacêutica sólida, a degradação forçada da matéria-prima por hidrólise alcalina pode contribuir para previsão da formação de possíveis produtos de degradação, caso novas formulações em meio líquido venham a ser desenvolvidas.

Neste sentido, a matéria-prima de molnupiravir foi submetida a hidrólise em meio alcalino ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), conforme procedimento experimental 3.5.2, de modo que o insumo farmacêutico ativo (IFA) apresentou degradação completa, conforme apresentado na Figura 21.2-5.

Figura 21 – Eletroferogramas da degradação por hidrólise alcalina, em diferentes tempos de exposição da matéria-prima à solução degradante de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura ambiente.



1: matéria-prima sem solução degradante; 2: matéria-prima imediatamente após a adição de degradante; 3: após 2 h de exposição a solução degradante; 4: após 8 h de exposição, e 5: após 10 h de estresse.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

A Figura 21 é um recorte dos eletroferogramas com enfoque na linha base, a fim de analisar a formação de PDs, gerados em baixa extensão. Além disso, é apresentado o eletroferograma da amostra controle, Figura 21.1, sendo possível observar o pico referente ao MPV e ao fluxo eletrosmótico (EOF), conforme esperado.

A força iônica das amostras, na qual o método foi otimizado, é substancialmente diferente da força iônica das amostras provenientes dos estudos de degradação forçada em meio alcalino. Dessa forma, para identificação satisfatório dos picos presentes nos eletroferogramas obtidos dos EDF, Figura 21, os picos não são identificados somente pelo tempo de migração de

cada pico, mas também pelo tempo de migração relativo (TMR), isto é, uma relação entre o tempo de migração de cada pico, presente nos eletroferogramas da Figura 21.2-5, e o tempo de migração do MPV, Figura 21.1, conforme apresentado na Tabela 7. Essa estratégia é interessante, pois em outras condições de estresse, expostas no Quadro 4, os picos ainda podem ser correlacionados, minimizando a interferência da força iônica da amostra, em diferentes condições típicas de estresse.

Tabela 7 – Tempo de retenção relativo dos picos considerados no EDF em meio alcalino

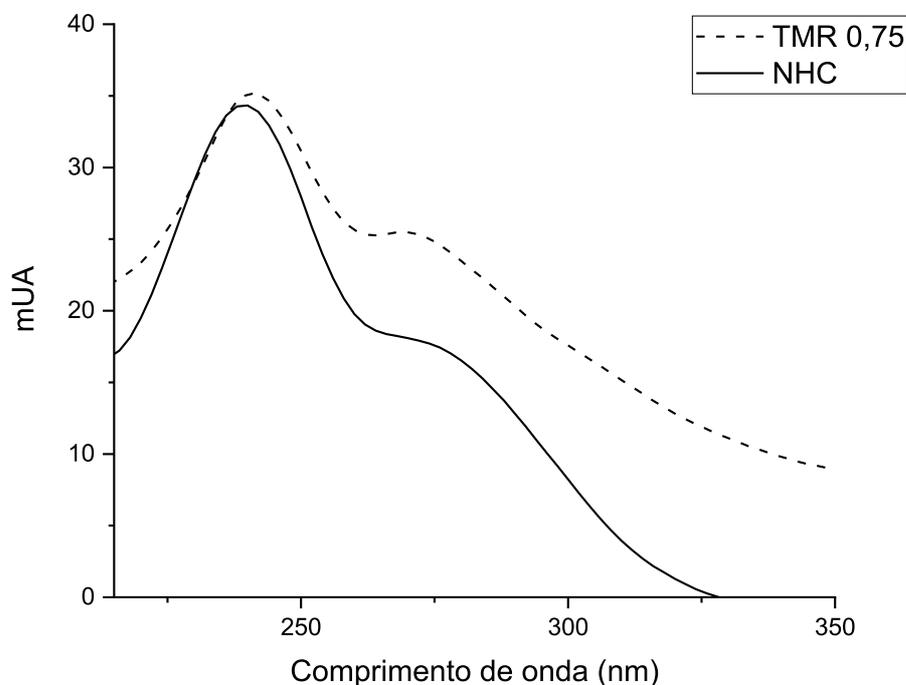
Pico	t_m (min)	TMR
MPV	3,409	1,00
E	1,473	0,43
D	1,973	0,58
A	2,236	0,66
EOF*	2,350	0,69
NHC	2,568	0,75
B	2,802	0,82
C	3,207	0,94

*EOF – fluxo eletroosmótico

Elaborado pelo autor (2023).

Imediatamente após o início do processo de degradação forçada em meio alcalino, o MPV foi degradado totalmente, conforme Figura 21.2, surgindo picos no eletroferograma correspondentes ao NHC, com TMR equivalente a 0,75, e três outros produtos de degradação (PDs) desconhecidos, indicados por D, A e C, com TMR correspondentes a 0,58, 0,66 e 0,94, respectivamente. A atribuição do NHC ao referido PD é fundamentada na semelhança entre os espectros de absorção na região UV-VIS do padrão de NHC 250 mg L⁻¹, e o espectro do pico do PD TMR 0,75, de concentração desconhecida, obtido durante a análise de eletroforese capilar, Figura 22.

Figura 22 – Espectro de absorção UV-VIS do produto de degradação TMR 0,75, e do padrão de NHC, obtido durante análise por eletroforese capilar



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após duas horas de estresse em meio alcalino, além dos PDs mencionados na Figura 21.2 (D, NHC, A e C), há o surgimento de um novo PD desconhecido, com TMR equivalente a 0,82, indicado pelo pico B. Considerando 8 e 10 horas de exposição da matéria-prima em meio alcalino, conforme apresentado pelos eletroferogramas da Figura 21.4 e 21.5, respectivamente, não há identificação da formação do PD desconhecido D, permanecendo presente somente os picos A, NHC, B e C, em ambos eletroferogramas.

Dessa forma, é possível concluir que a matéria-prima do molnupiravir apresenta alta reatividade em meio alcalino, sofrendo hidrólise em ampla extensão, havendo a identificação de um PD, nesta condição, possivelmente o NHC. Os dados referentes a degradação forçada, através da hidrólise alcalina, são apresentados na Tabela 8. É possível observar a área dos produtos de degradação formados a partir dos diferentes tempos de exposição, os principais produtos de degradação identificados, sendo reportados aqueles com área superior a $0,5 \text{ mUA}^2$, tendo em vista a relação sinal-ruído, integrada a partir dos picos presentes no eletroferograma da Figura 21.

Em função das limitações que a metodologia analítica proporciona, ao que diz respeito ao sistema detecção, alguns PDs com baixa absorvidade molar possivelmente não foram detectados. Além disso, alguns experimentos foram conduzidos com o método analítico otimizado aplicando-se voltagem por 15 min, e nenhum PDs foi identificado após 7 min, demonstrando que o método otimizado é adequado para análise dos PDs em meio alcalino. Ademais, na Tabela 8 são apresentados o TMR de cada substância presentes nos eletroferogramas da Figura 21, demonstrando não haver comigração de espécies em relação ao molnupiravir, sob as condições avaliadas.

Tabela 8 – Resultados das áreas dos produtos de degradação formados a partir da degradação forçada da matéria-prima do molnupiravir, em meio alcalino, sob diferentes tempos de exposição.

Pico	Tempo de exposição (horas)				TMR
	0	2	8	10	
MPV	-	-	-	-	1,00
D	1,7000	3,7531	-	-	0,58
A	1,5000	1,7169	1,8197	1,6414	0,66
NHC	80,9000	77,1837	75,5338	71,9322	0,75
B	-	0,7447	0,9354	0,9193	0,82
C	1,1000	1,1523	2,0213	0,9041	0,94
$\sum PDs$	85,2000	84,5507	80,3102	75,3970	-
DRBM	24,45%	25,03%	28,79%	33,15%	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Diante dos dados apresentados na Tabela 8, é possível verificar que em até 2 horas de exposição, em meio alcalino, a matéria-prima apresentou o maior número de PDs. A partir de 8 horas de exposição, possivelmente reações secundárias indesejadas se tornam proeminentes, tendo em vista a redução qualitativa e quantitativa de PDs formados. Logo, os ensaios de degradação forçada para a matéria-prima de molnupiravir, em meio alcalino, utilizando como agente degradante a solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, devem ser conduzidos com menor tempo de exposição, a temperatura ambiente, indicando que tais condições precisam ser otimizadas a fim de evitar a degradação completa do molnupiravir, conforme recomendado pelos compêndios de EDF. Uma possível alternativa, para os *endpoints* foi reportado por Tuba Reçber e

colaboradores, em que os estudos de degradação forçada em meio alcalino foram conduzidos em meio aquoso, a temperatura ambiente, por apenas 2 min. Outros fatores de estresse também foram avaliadas e todos possuem tempo de exposição inferior a 2 horas (Reçber *et al.*, 2022).

Segundo a ANVISA, o “balanço de massas: processo de adição do teor e dos níveis de produtos de degradação encontrados para avaliar a proximidade da soma deles a 100% do valor inicial de teor, com a devida consideração da margem de precisão e exatidão analítica”. O órgão ainda estabelece que, “cada um dos picos não desconsiderados no cromatograma do produto deve ter sua área quantificada. Inicialmente, cada pico pode ser quantificado pela porcentagem que sua área representa em relação à soma de todas as áreas” (BRASIL, 2017).

Na prática, a técnica de balanço de massas representa uma ferramenta valiosa para avaliar se a metodologia analítica utilizada é capaz de mensurar a geração de produtos de degradação, e o quão estreitamente este valor se vincula à redução ou aumento de teor do IFA. Neste trabalho, optou-se por fazer o cálculo do balanço de massa considerando a deficiência relativa de balanço de massas (DRBM), apresentado na Tabela 8, conforme Equação 27 (Brasil, 2022e):

$$DRBM = 100 - \left(\frac{PD_D - PD_i}{T_i - T_D} \times 100 \right) \quad (27)$$

em que T_i representa a área do IFA na amostra não degradada; PD_i o somatório da área de produtos de degradação na amostra não degradada; T_D é a área do IFA na amostra após degradação; e PD_D o somatório das áreas dos produtos de degradação na amostra após degradação.

O cálculo do balanço de massa a partir da DRBM, de acordo com a ANVISA, possibilita uma avaliação mais apropriada da diferença entre os valores obtidos na prática e o valor teórico do balanço de massas esperado (100%). Outrossim, o valor de DRBM estima o percentual dos PDs esperados que não estão sendo detectados pela metodologia analítica (Brasil, 2022e). Em todos os eletroferogramas avaliados da amostra controle, os valores de PD_i equivale a zero. A degradação completa do molnupiravir anula o valor de T_D , para todos os cálculos de DRBM. A área do pico de MPV, T_i , na amostra controle do eletroferograma da Figura 21, equivale a 112,78 mUA², com 0h de exposição. O valor de T_i não sofreu variação significativa durante a realização dos experimentos, tendo em vista que a amostra controle foi avaliada como referência, para cada um dos tempos de exposição, dispostos na Tabela 8.

É interessante destacar a possibilidade de um balanço de massa positivo ou negativo, levando em consideração os seguintes aspectos (BRASIL, 2017):

1. Variação intrínseca do procedimento analítico, considerando o desempenho da precisão, na validação do método;
2. Presença de artefatos do método ou da degradação;
3. Probabilidade de perda de algum produto de degradação por evaporação;
4. Eventual alteração do grupo cromóforo e conseqüente modificação drástica do fator resposta de determinada impureza. Nesta situação, é recomendada a comparação do espectro de UV-VIS de cada impureza com o do(s) IFA(s), avaliando se houve alteração dos máximos de absorção, e na relação entre esse máximo e algum outro comprimento de onda de baixa absorbância.
5. Viabilidade de destruição do grupo cromóforo e conseqüente não detecção de determinada impureza. Nesse caso, deve ser avaliada a possibilidade de análise em outro comprimento de onda.

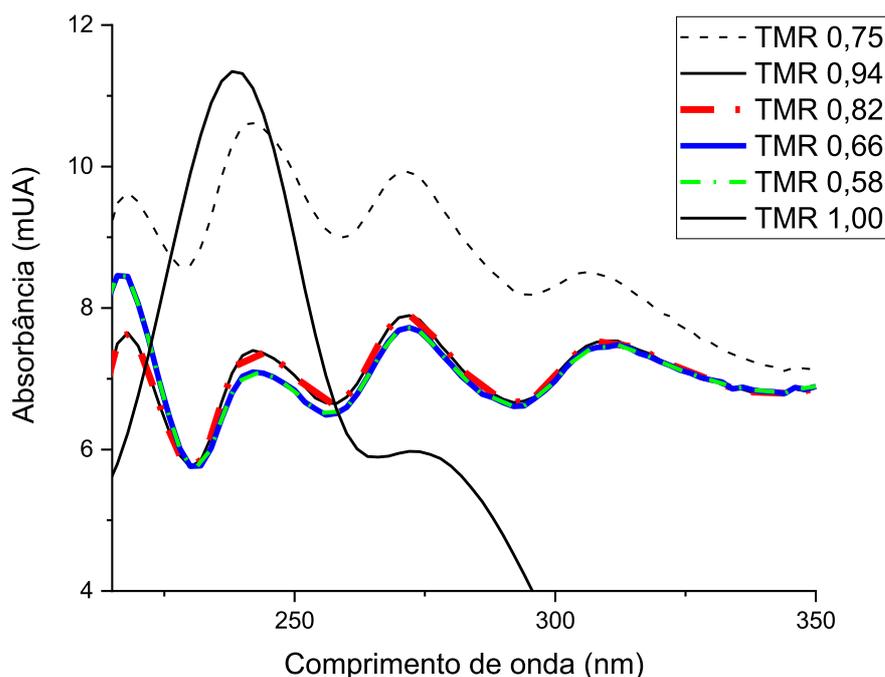
Diante destas considerações, o balanço de massas nem sempre é factível na prática, uma vez que não assegura a correspondência exata entre o fator de resposta dos produtos de degradação e do princípio ativo. Isso ocorre devido a várias limitações inerentes à metodologia empregada, entre outras considerações, conforme observado na Tabela 8 (Brasil, 2019b).

A partir dos valores apresentados na Tabela 8, é possível afirmar que o valor médio do DRBM foi de 28%, considerando todos os tempos de exposição, isto é, somente 28% dos PDs gerados, em média, não foram detectados pela metodologia analítica, demonstrando a seletividade da metodologia analítica desenvolvida. Possivelmente, este valor está associado a perda de algum PD por evaporação, ou perda do grupo cromóforo com absorvidade molar significativa em 236 nm.

Os espectros UV-VIS de todos os picos identificados no eletroferograma da Figura 21.3 foram obtidos durante a análise por eletroforese capilar, e são apresentados na Figura 23. Tendo em vista a semelhança entre o perfil do espectro UV-VIS do MPV (TMR 1,00), obtido a partir do eletroferograma da Figura 21.1 (amostra referência), e demais PDs, é possível inferir que não há uma alteração significativa do grupo cromóforo entre os compostos. Como isso, espera-se um fator resposta similar para tais substâncias, substancialmente em 236 nm, comprimento de onda utilizado nas análises. Tais resultados corroboram para a adequabilidade do cálculo do

balanço de massa pelo DRBM, diante do EDF em questão. Outros comprimentos de onda não foram monitorados.

Figura 23 – Espectros de absorção UV-VIS dos PDs* presentes no eletroferograma da Figura 21.3, obtidos durante análise por eletroforese capilar



*Com exceção do pico TMR 1,00 (MPV), obtido sem exposição a condição degradante (Figura 21.1). O sinal analítico foi reduzido, três vezes, para melhor comparação do perfil espectral. O sinal analítico dos demais espectros não foi modificado.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A partir deste EDF em meio alcalino, foi possível obter um perfil de degradação potencial do IFA, a partir da matéria-prima avaliada. Considerando a seletividade do método, na identificação do molnupiravir e seus PDs, sob as condições avaliadas, pode-se afirmar que o método proposto é indicativo de estabilidade. Além disso, o IFA é substancialmente sensível a hidrólise em meio alcalino, fornecendo informações em relação aos cuidados que devem ser tomados no desenvolvimento, produção, manipulação, e conservação deste medicamento ou matéria-prima de molnupiravir. Diante do EDF, é possível afirmar que possivelmente o principal PD de degradação formado seja o NHC.

4.8 TRABALHOS FUTUROS

O método analítico desenvolvido e otimizado neste trabalho consiste na análise simultânea de molnupiravir e NHC em matéria-prima. Neste contexto, sugestões de investigação para complementar e/ou melhorar os resultados reportados, são indexadas:

- A. Determinação das constantes de dissociação ácida do MPV e NHC, por meio de titulação potenciométrica, e comparação com os valores já reportados na literatura.
- B. Realizar as análises para completar a validação do método analítico, desenvolvido e otimizado, considerando os parâmetros analíticos: linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, e robustez.
- C. Realizar a degradação forçada da matéria-prima sob as condições de estresse sob ação de agentes externos como: luz, temperatura, calor, umidade, solução ácida, oxidante, e íons metálicos.
- D. Otimizar a condição de estresse conduzida em meio alcalino, a fim de atingir um nível de degradação do IFA entre 5-20%, conforme preconizadas pelos compêndios.
- E. Realizar os estudos de degradação forçada conforme Tuba Reçber (Reçber *et al.*, 2022), e comparar os resultados com o método analítico desenvolvido neste trabalho.
- F. Aplicação do método analítico desenvolvido em amostras de comprimido para quantificação do molnupiravir, por adição padrão de ponto único, quando estes estiverem disponíveis no mercado. Esta possível abordagem de avaliação da linearidade poderia ser mediada pela avaliação em um único nível de concentração, uma vez que se espera um reduzido intervalo de concentração para o molnupiravir na matéria-prima.
- G. Aplicação do método desenvolvido e otimizado em amostras biológicas, a fim de avaliar o desempenho da metodologia desenvolvida na quantificação do molnupiravir em amostras de plasma e urina.

6 CONCLUSÃO

Considerando a ausência de registros na literatura mediante a utilização da eletroforese capilar para análise simultânea de molnupiravir e NHC, diferentes metodologias analíticas inéditas foram propositadas. Neste contexto, embora os valores das constantes de dissociação ácida, para ambos os fármacos, indiquem que há uma faixa de pH na qual a separação por CZE seja viável, a análise das suas mobilidades efetivas indica que há a necessidade da utilização de MEKC. Assim, foi possível desenvolver e otimizar um método para análise de molnupiravir, em matéria-prima, por cromatografia capilar eletrocínica micelar com detecção direta, em 236 nm, tendo em vista a alta absorvidade molar dos analitos.

As condições do método desenvolvido e otimizado foram: voltagem positiva de 20 kV; temperatura do cartucho mantida em 25,0 °C; injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 4s; detecção em 236 nm; uso de capilar de sílica fundida revestido externamente com poliimida com comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm efetivo) e 75 µm d.i x 375 d.e; eletrólito constituído por solução tampão carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃) na concentração de 20 mmol L⁻¹, em pH 10,4, e SDS na concentração de 60 mmol L⁻¹; com tempo total de análise 12 minutos.

Neste trabalho, foi possível aplicar ferramentas quimiométricas, como planejamentos de experimentos, na otimização da composição do eletrólito de corrida. O uso desta abordagem auxiliou na investigação do melhor perfil de separação para os fármacos, sendo considerado para tal, aquele com maior resolução entre os picos e com menor tempo de análise, sendo necessário um número reduzido de experimentos. Por meio da análise qualitativa dos eletroferogramas do planejamento, foi possível extrair a condição ótima do recorte experimental, demonstrando que a “significância química” e a “significância estatística” devem ser empregadas de forma apropriada, considerando que ambas desempenham um papel crucial na tomada de decisões no processo de otimização.

Embora alguns testes não tenham fornecido esclarecimentos satisfatórios, como: mecanismo de interação entre a fase micelar de SDS e os fármacos; a mobilidade efetiva dos analitos em tampão TBS, em pH 9,4; bem como, a estabilidade intrínseca do molnupiravir em meio alcalino, foi possível elaborar um cenário sobre o comportamento do molnupiravir e NHC mediante diferentes sistemas eletrolíticos empregando técnicas de eletroforese capilar de zona.

A validação do método foi efetuada considerando os seguintes parâmetros analíticos: seletividade e exatidão. O último parâmetro indexado, a exatidão, possivelmente apresentaria melhor desempenho com o aumento no número de ensaios em cada nível avaliado, sendo necessário a realização de mais estudos para sua melhoria. Ao que diz respeito aos limites de

detecção e quantificação, ainda se faz necessário sua certificação a partir da injeção da amostra nos respectivos níveis de concentração calculados.

Diante do estudo de degradação forçada avaliado, o método otimizado pode ser considerado adequado para a detecção de até cinco produtos de degradação do molnupiravir em meio alcalino, diante das condições avaliadas. Neste contexto, presume-se que o principal produto de degradação formado seja o NHC, tendo em vista a caracterização por espectroscopia UV-VIS. Diante dessas considerações, o método desenvolvido e otimizado demonstra alta seletividade, podendo classificá-lo como indicativo de estabilidade para a matéria-prima monitorada. Entretanto, é preciso salientar que as condições experimentais para a condução do estresse ainda precisam ser otimizadas, tendo em vista que houve a degradação completa do molnupiravir, condição inicialmente não recomendada pelos órgãos regulatórios. O resultado do balanço de massa, a partir do método desenvolvido, demonstra que cerca de 28% dos produtos de degradação gerados, em meio alcalino, não estão sendo detectados pela metodologia analítica.

Por fim, as possibilidades de aplicação do método desenvolvido e otimizado por MEKC-DAD são diversas, dentro do campo farmacêutico, englobando pesquisas sobre degradação forçada, controle de qualidade de impurezas, e auxiliando no desenvolvimento de novas formulações de molnupiravir.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, E. Global estimates of excess deaths from COVID-19. **Nature**, v. 613, n. 7942, p. 31–33, 5 jan. 2023.

AGÊNCIA SENADO. **Fim da emergência de saúde da covid pode impactar legislação e políticas públicas**. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2022/04/20/fim-da-emergencia-de-saude-da-covid-pode-impactar-legislacao-e-politicas-publicas>>. Acesso em: 16 ago. 2023.

AKHTAR, M. J. COVID19 inhibitors: A prospective therapeutics. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, n. January, p. 104027, ago. 2020.

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y.; The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 29–37, 2007.

AMARA, A.; PENCHALA, S. D.; ELSE, L.; HALE, C.; FITZGERALD, R.; WALKER, L.; LYONS, R.; FLETCHER, T.; KHOO, S.; The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of Molnupiravir and its metabolite β -d-N4-hydroxycytidine in human plasma and saliva. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 206, p. 114356, 2021.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ANNADI, A. M.; EL ZAHAR, N. M.; EL-DIN A. ABDEL-SATTAR, N.; MOHAMED, E. H.; MAHMOUD, S. A.; ATTIA, M. S.; Development and validation of molnupiravir assessment in bulk powder and pharmaceutical formulation by the RP-HPLC-UV method. **RSC Advances**, v. 12, n. 53, p. 34512–34519, 2022.

ARANTES, P. C. Relevância da determinação de produtos de degradação em medicamentos no Brasil. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 5, n. n.18 abril-junho, 2018.

ARIENZO, A.; GALLO, V.; TOMASSETTI, F.; PITARO, N.; PITARO, M.; ANTONINI, G.; A narrative review of alternative transmission routes of COVID 19: what we know so far. **Pathogens and Global Health**, v. 47, n. 00, p. 1–15, 23 jun. 2023.

BADER, M. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 57, n. 10, p. 703, 1 out. 1980.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. v. 210, 2 ed. London; New York: Informa Healthcare, 2011.

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability testing of pharmaceutical products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 3, p. 129–138, 2012.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis (Techniques in Analytical Chemistry)**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.

BANERJEE, S.; BANERJEE, D.; SINGH, A.; KUMAR, S.; POOJA, D.; RAM, V.; KULHARI, H.; SAHARAN, V. A.; A Clinical Insight on New Discovered Molecules and Repurposed Drugs for the Treatment of COVID-19. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 332, 1 fev. 2023.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods : fundamentals and applications**. 2nd. ed. United States of America: John Wiley & Sons Inc., 2011.

BARNARD, D. L.; HUBBARD, V. D.; BURTON, J.; SMEE, D. F.; MORREY, J. D.; OTTO, M. J.; SIDWELL, R. W.; Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus (SARSCoV) by Calpain Inhibitors and β -D-N 4 -Hydroxycytidine. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 15–22, 23 fev. 2004.

BARROS NETO, B. DE; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U.; Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856–865, 2002.

BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K.; Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, jun. 2014.

BORBONE, N.; PICCIALI, G.; ROVIELLO, G. N.; OLIVIERO, G.; Nucleoside Analogs and Nucleoside Precursors as Drugs in the Fight against SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 986, 13 fev. 2021.

BOTELHO, S. F.; REIS, A. M. M.; Pharmacovigilance risk mitigation plans: Action in public health to promote the safe use of medication. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 20, n. 12, p. 3897–3905, 2015.

BRASIL. **Regulamento Sanitário Internacional - RSI 2005. Versão em português aprovada pelo Congresso Nacional por meio do Decreto Legislativo 395/2009, publicado no DOU de 10/07/09, pág. 11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**. 1ª edição ed. Brasília. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/regulamento-sanitario-internacional/arquivos/7181json-file-1>. Acesso em 15 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 45, de 09 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Brasília: Diário Oficial da União. 2012.

BRASIL. **Plano de Resposta às Emergências em Saúde Pública / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Perguntas & Respostas. Assunto: RDC 53/2015 e Guia 04/2015**. 2.1 ed. Brasília. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União,. 2017a.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017** - Ministério da Saúde – MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 318, de 06 de novembro de 2019**. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. 2019a.

BRASIL. **Processo nº 25351.596152/2016-01 Expediente nº 0497652/18-5 Análise do recurso administrativo interposto pela Farmoquímica S/A frente o indeferimento da petição de registro do medicamento similar referente ao produto Dina (desloratadina) Área responsável: GG MED**. 2019b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/composicao/diretoria-colegiada/reunioes-da-diretoria/votos/2019/1a-rop-de-2019/voto-105-2018-dire5.pdf>. Acesso em: 01 set. 2023.

BRASIL. **Anvisa aprova nova indicação de remdesivir para Covid-19**. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-indicacao-de-remdesivir-para-covid-19>. Acesso em: 16 ago. 2023.

BRASIL. **Anvisa aprova uso emergencial do medicamento molnupiravir para Covid-19**. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-uso-emergencial-do-medicamento-molnupiravir-para-covid-19#:~:text=No%20cen%C3%A1rio%20internacional%2C%20o%20medicamento,em%20uso%20em%2017%20pa%C3%ADses>. Acesso em: 15 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022** [recurso eletrônico]. 1ª edição. 2022c.

BRASIL. **Anvisa aprova venda do medicamento Lagevrio (molnupiravir) em farmácias**. 2022d. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-venda-do-medicamento-lagevrio-molnupiravir-em-farmacias>. Acesso em: 16 ago. 2023.

BRASIL. **Guia para realização dos estudos de degradação forçada em medicamentos e para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação - Guia nº XX/XXXX – versão X**. 2022e. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6631540/Minuta+Guia+degrada%C3%A7%C3%A3o+for%C3%A7ada+medicamentos.pdf/ed76a25b-9d28-4367-bb58-aae250918e44?version=1.0>. Acesso em: 01 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 801, DE 2 DE JUNHO DE 2023** (Publicada no DOU nº 106, de 5 de junho de 2023). 2023a. Dispõe sobre a permissão para uso, comercialização e distribuição das vacinas e medicamentos autorizados para uso emergencial nos termos da Resolução RDC nº 688/2022, que dispõe sobre procedimentos e requisitos para manutenção das autorizações já concedidas e para novos pedidos de autorização temporária de uso emergencial (AUE), em caráter experimental, de medicamentos

e vacinas contra a Covid-19 para o enfrentamento da pandemia de SARS-COV-2, que tenham sido fabricados até 21 de maio de 2023.

BRASIL. **Agência esclarece sobre vacinas e medicamentos com autorização de uso emergencial**. 2023b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/agencia-esclarece-sobre-vacinas-e-medicamentos-com-autorizacao-de-uso-emergencial>. Acesso em: 16 ago 2023.

BRITO, N. M.; DE AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n. jan./dez., p. 129–146, 31 dez. 2003.

CARDONE, M. J.; PALERMO, P. J.; SYBRANDT, L. B. Potential error in single-point-ratio calculations based on linear calibration curves with a significant intercept. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1187–1191, 1 jul. 1980.

CARMO, E. H.; PENNA, G.; OLIVEIRA, W. K. DE. Emergências de saúde pública: conceito, caracterização, preparação e resposta. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 19–32, dez. 2008.

CAS. **CAS SciFinder[®]**. Disponível em: <https://www.cas.org/cas-solutions>. Acesso em 15 ago. 2023

CASTRO, R. O Fim Da Pandemia ?*. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2020, p. 1–5, 2021.

CRF. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Orientação sobre administração de medicamentos injetáveis em farmácias**. Disponível em: <https://portal.crfsp.org.br/orienta%C3%A7%C3%A3o-farmac%C3%Aautica/641-fiscaliza%C3%A7%C3%A3o-orientativa/farm%C3%A1cia/9647-fiscaliza%C3%A7%C3%A3o-parceira2.html>. Acesso em 28 ago. 2023.

CHAUHAN, S. Comprehensive review of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Biomedical Journal**, v. 43, n. 4, p. 334–340, 2020.

CHERA, A.; TANCA, A. Remdesivir: the first FDA-approved anti-COVID-19 Treatment for Young Children. **Discoveries**, v. 10, n. 2, p. e151, 30 jun. 2022.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 75–84, 1999.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512–518, 1997.

COSTANTINI, V. P.; WHITAKER, T.; BARCLAY, L.; LEE, D.; MCBRAYER, T. R.; SCHINAZI, R. F.; VINJÉ, J.; Antiviral activity of nucleoside analogues against norovirus. **Antiviral Therapy**, v. 17, n. 6, p. 981–991, 2012.

COX, R. M.; WOLF, J. D.; PLEMPER, R. K. Therapeutically administered ribonucleoside

analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 11–18, 3 jan. 2021.

CRUZ, G.; ACOSTA, J.; DEL ARCO, J.; CLEMENTE-SUAREZ, V. J.; DERONCELE, V.; FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; Enzyme-mediated synthesis of Molnupiravir: paving the way for the application of biocatalysis in pharmaceutical industry. **ChemCatChem**, v. 14, n. 13, 7 jul. 2022.

COSTA, G. N.; VIANA, G. M.; LIMA FILHO, U. F.; CABRAL, L. M.; DIRETRIZES PARA ELABORAÇÃO DE UM PROTOCOLO E RELATÓRIO DE ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE MEDICAMENTOS DE ACORDO COM A RDC 53/2015. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 3, p. 194–202, 9 out. 2018.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guideline for calibration in analytical chemistry— Part 1. Fundamentals and single component calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993–1014, 1998.

OLIVEIRA NEVES, L. N.; LEAL DE OLIVEIRA, M. A. Quantification of lactose and lactulose in hydrolysed-lactose UHT milk using capillary zone electrophoresis. **International Dairy Journal**, v. 106, p. 104710, jul. 2020.

QUEIROZ, S. C. DO N.; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese capilar. **Revista Chemkeys**, n. 8, p. 1–9, 17 set. 2018.

SOUZA, J. C. Q.; CHELLINI, P. R.; VIÇOSA, A. L.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L.; Simultaneous separation of artesunate and mefloquine in fixed-dose combination tablets by CZE-UV. **Analytical Methods**, v. 12, n. 47, p. 5709–5717, 2020.

DEY, R.; NAYAK, S.; DAS, P.; YADAV, S.; Short Synthesis of Molnupiravir (EIDD-2801) via a Thionated Uridine Intermediate. **ACS Omega**, v. 6, n. 42, p. 28366–28372, 26 out. 2021.

NASCIMENTO, M. P.; MARINHO, M. V.; SOUSA, R. A. DE; LEAL DE OLIVEIRA, M. A.; Mixture design of an electrolyte system for the simultaneous separation of Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , and HCO_3^- in shrimp-farming water by CZE-UV. **Analytical Methods**, v. 15, n. 3, p. 311–321, 2023.

DRUGBANK. **N4-Hydroxycytidine**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB15660>. Acesso em 15 ago. 2023.

DUTTA, A.; ROY, A.; ROY, L.; CHATTOPADHYAY, S.; CHATTERJEE, S.; Immune response and possible therapeutics in COVID-19. **RSC Advances**, v. 11, n. 2, p. 960–977, 2021.

EASTMAN, Q. **The Little Pill That Could**. Disponível em: https://news.emory.edu/features/2021/11/molnupiravir_georgePainter_covid_19-11-2021/index.html. Acesso em: 15 ago. 2023.

EHTESHAMI, M.; TAO, S.; ZANDI, K.; HSIAO, H.-M.; YONG, J.; EMILY, H.; FRANCK, A.; OLIVIA, O. R.; ANDRES, M.; SCHINAZIA, R. F. .; Characterization of Beta-D-N4-

Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–6, 2017.

EMORY NEWS CENTER. **Molnupiravir and Drug Development at Emory**. Disponível em: <https://news.emory.edu/tags/topic/molnupiravir/index.html>. Acesso em: 15 ago 2023.

EURACHEM. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Magnusson, B.; Örnemark, U., Eds.; 2nd ed.; 2014.

FACCI, J.; DINIZ, L.; REIS, N.; FERNANDES, C.; EVOLUÇÃO DA LEGISLAÇÃO E DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE INSUMOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS. **Química Nova**, v. 43, n. 7, p. 959–973, 2020.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389–396, 2008.

FARIAS, Fernanda Fernandes. **Estudo de degradação forçada e caracterização das principais impurezas da cápsula líquida de ibuprofeno por LC-MS-QTOF**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. 2015.

FDA. **FDA Approves First Treatment for COVID-19**. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19>. Acesso em: 16 ago. 2023.

FENTON, C.; KEAM, S. J. Emerging small molecule antivirals may fit neatly into COVID-19 treatment. **Drugs & Therapy Perspectives**, v. 38, n. 3, p. 112–126, 28 mar. 2022.

FERREIRA, C. C. DE O. **Validação de metodologia analítica: elaboração de um guia prático para os laboratórios de pesquisa acadêmicos**. Monografria. Niterói, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13662-017-1121-6><https://doi.org/10.1007/s41980-018-0101-2><https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2018.04.019><https://doi.org/10.1016/j.cam.2017.10.014><http://dx.doi.org/10.1016/j.apm.2011.07.041><http://arxiv.org/abs/1502.020>. Acesso em 15 ago. 2023.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 100, p. 7–27, dez. 2020.

FIER, P. S.; XU, Y.; POIRIER, M.; BRITO, G.; ZHENG, M.; BADE, R.; SIROTA, E.; STONE, K.; TAN, L.; HUMPHREY, G. R.; CHANG, D.; BOTHE, J.; ZHANG, Y.; BERNARDONI, F.; CASTRO, S.; ZOMPA, M. A.; TAYLOR, J.; SIRK, K. M.; DIAZ-

SANTANA, A.; DIRIBE, I.; EMERSON, K. M.; KRISHNAMURTHI, B.; ZHAO, R.; WARD, M.; XIAO, C.; OUYAND, H.; ZHAN, J.; MORRIS, W. J.; Development of a Robust Manufacturing Route for Molnupiravir, an Antiviral for the Treatment of COVID-19. **Organic Process Research & Development**, v. 25, n. 12, p. 2806–2815, 17 dez. 2021.

FIOCRUZ. **Fiocruz e MSD firmam acordo para produzir primeiro antiviral oral contra Covid-19 no Brasil**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/fiocruz-e-msd-firmam-acordo-para-produzir-primeiro-antiviral-oral-contra-covid-19-no-brasil>. Acesso em: 15 ago. 2023.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J.; Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, jul. 2012.

GENSINI, G. F.; YACOUB, M. H.; CONTI, A. A. The concept of quarantine in history: From plague to SARS. **Journal of Infection**, v. 49, n. 4, p. 257–261, 2004.

GILEAD. BULA AO PROFISSIONAL DE SAÚDE - Veklury® (rendesivir). Disponível em: https://www.gilead.com/-/media/files/pdfs/other/veklury_bula-profissional-de-saude.pdf. Acesso em 28 ago. 2023.

GIRI, M.; PURI, A.; WANG, T.; GUO, S.; Clinical features, comorbidities, complications and treatment options in severe and non-severe COVID-19 patients: A systemic review and meta-analysis. **Nursing Open**, v. 8, n. 3, p. 1077–1088, 27 maio 2021.

GOMES, E. C. DE S. **Conceitos e ferramentas da epidemiologia**. Recife: Universitária da UFPE, 2015.

GOPALSAMUTHIRAM, V.; KADAM, A. L.; NOBLE, J. K.; SNEAD, D. R.; WILLIAMS, C.; JAMISON, T. F.; SENANAYAKE, C.; YADAW, A. K.; ROY, S.; SIRASANI, G.; GUPTON, B. F.; BURNS, J.; COOK, D. W.; STRINGHAM, R. W.; AHMAD, S.; KRACK, R.; Toward a Practical, Nonenzymatic Process for Investigational COVID-19 Antiviral Molnupiravir from Cytidine: Supply-Centered Synthesis. **Organic Process Research & Development**, v. 25, n. 12, p. 2679–2685, 17 dez. 2021.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A. A.; HAAGMANS, B. L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A. M.; NEUMAN, B. W.; PENZAR, D.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SAMBORSKIY, D. V.; SIDOROV, I. A.; SOLA, I.; ZIEBUHR, J.; The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

GREENHALGH, T.; KNIGHT, M.; A’COURT, C.; BUXTON, M.; HUSAIN, L.; Management of post-acute covid-19 in primary care. **BMJ**, v. 370, p. m3026, 11 ago. 2020.

GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V.; SEHGAL, K.; NAIR, N.; MAHAJAN, S.; SEHRAWAT, T. S.; BIKDELI, B.; AHLUWALIA, N.; AUSIELLO, J. C.; WAN, E. Y.; FREEDBERG, D. E.; KIRTANE, A. J.; PARIKH, S. A.; MAURER, M. S.; NORDVIG, A. S.; ACCILI, D.; BATHON, J. M.; MOHAN, S.; BAUER, K. A.; LEON, M. B.; KRUMHOLZ, H. M.; URIEL, N.; MEHRA, M. R.; ELKIND, M. S. V.; STONE, G. W.; SCHWARTZ, A.; HO, D. D.; BILEZIKIAN, J. P.; LANDRY, D. W.; Extrapulmonary manifestations of COVID-19.

Nature Medicine, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 10 jul. 2020.

HACHUL, D.; ALMEIDA, T.; SCANAVACCA, M. Disautonomias Pós-COVID: Importância do Reconhecimento Precoce e da Implementação de Programas de Recuperação. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 120, n. 3, p. 1–5, 20 mar. 2023.

HANCU, G.; SIMON, B.; RUSU, A.; MIRCIA, E.; GYÉRESI, Á.; Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2013.

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. 1st. ed. United States of America: James M. Smith, 2000.

HUSAIN, A. Forced Degradation Studies. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 6, p. 54–57, 14 dez. 2016.

HUYNH-BA, K. **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. New York, NY: Springer New York, 2009.

ICH-Q1A(R2). **Guidance for Industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration**. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 11 abr. 2021.

ICH. **Validation of analytical procedures: ICH guidelines Q2(R2)**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline#current-effective-version---currently-under-revision,-see-below-section>. Acesso em 01 set. 2023.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008. **Coordenação Geral de Acreditação**, 2020.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363–373, jun. 2001.

JUNQUEIRA, C.; CRESPO, Â.; RANJBAR, S.; DE LACERDA, L. B.; LEWANDROWSKI, M.; INGBER, J.; PARRY, B.; RAVID, S.; CLARK, S.; SCHRIMPF, M. R.; HO, F.; BEAKES, C.; MARGOLIN, J.; RUSSELL, N.; KAYS, K.; BOUCAU, J.; DAS ADHIKARI, U.; VORA, S. M.; LEGER, V.; GEHRKE, L.; HENDERSON, L. A.; JANSSEN, E.; KWON, D.; SANDER, C.; ABRAHAM, J.; GOLDBERG, M. B.; WU, H.; MEHTA, G.; BELL, S.; GOLDFELD, A. E.; FILBIN, M. R.; LIEBERMAN, J.; FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. **Nature**, v. 606, n. 7914, p. 576–584, 16 jun. 2022.

KABLAN, S. E.; REÇBER, T.; TEZEL, G.; TIMUR, S. S.; KARABULUT, C.; KARABULUT, T. C.; EROĞLU, H.; KIR, S.; NEMUTLU, E.; Voltammetric sensor for COVID-19 drug Molnupiravir on modified glassy carbon electrode with electrochemically reduced graphene oxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 920, n. March, 2022.

KARIA, R.; GUPTA, I.; KHANDAIT, H.; YADAV, A.; YADAV, A.; COVID-19 and its Modes of Transmission. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, n. 10, p. 1798–1801, 1

out. 2020.

KAWAMURA, K. Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2006. p. a1404.

KEUSCH, G. T.; AMUASI, J. H.; ANDERSON, D. E.; DASZAK, P.; ECKERLE, I.; FIELD, H.; KOOPMANS, M.; LAM, S. K.; DAS NEVES, C. G.; PEIRIS, M.; PERLMAN, S.; WACHARAPLUESADEE, S.; YADANA, S.; SAIF, L.; Pandemic origins and a One Health approach to preparedness and prevention: Solutions based on SARS-CoV-2 and other RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 42, 18 out. 2022.

KOJI, O.; SHIGERU, T. Micellar electrokinetic chromatography. **Molecular Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 253–271, jun. 1998.

KRISHNA, G.; PILLAI, V. S.; VEETTIL, M. V. Approaches and advances in the development of potential therapeutic targets and antiviral agents for the management of SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, n. June, p. 173450, 2020.

KRISHNAN, A.; HAMILTON, J. P.; ALQAHTANI, S. A.; A.WORETA, T. A narrative review of coronavirus disease 2019 (COVID-19): clinical, epidemiological characteristics, and systemic manifestations. **Internal and Emergency Medicine**, 16 jan. 2021.

KUPFERSCHMIDT, K.; WADMAN, M. End of COVID-19 emergencies sparks debate. **Science**, v. 380, n. 6645, p. 566–567, 12 maio 2023.

LAMB, Y. N. Remdesivir: First Approval. **Drugs**, v. 80, n. 13, p. 1355–1363, 1 set. 2020.

LAMONTAGNE, F.; AGARWAL, A.; ROCHWERG, B.; SIEMIENIUK, R. A.; AGORITSAS, T.; ASKIE, L.; LYTVYN, L.; LEO, Y.-S.; MACDONALD, H.; ZENG, L.; AMIN, W.; DA SILVA, A. R. A.; ARYAL, D.; BARRAGAN, F. A. J.; BAUSCH, F. J.; BURHAN, E.; CALFEE, C. S.; CECCONI, M.; CHACKO, B.; CHANDA, D.; DAT, V. Q.; DE SUTTER, A.; DU, B.; FREEDMAN, S.; GEDULD, H.; GEE, P.; GOTTE, M.; HARLEY, N.; HASHMI, M.; HUNT, B.; JEHAN, F.; KABRA, S. K.; KANDA, S.; KIM, Y.-J.; KISSOON, N.; KRISHNA, S.; KUPPALLI, K.; KWIZERA, A.; CASTRO-RIAL, M. L.; LISBOA, T.; LODHA, R.; MAHAKA, I.; MANAI, H.; MENDELSON, M.; BATTISTA MIGLIORI, G.; MINO, G.; NSUTEBU, E.; PRELLER, J.; PSHENICHNAYA, N.; QADIR, N.; RELAN, P.; SABZWARI, S.; SARIN, R.; SHANKAR-HARI, M.; SHARLAND, M.; SHEN, Y.; RANGANATHAN, S. S.; SOUZA, J. P.; STEGEMANN, M.; SWANSTROM, R.; UGARTE, S.; UYEKI, T.; VENKATAPURAM, S.; VUYISEKA, D.; WIJEWICKRAMA, A.; TRAN, L.; ZERAATKAR, D.; BARTOSZKO, J. J.; GE, L.; BRIGNARDELLO-PETERSEN, R.; OWEN, A.; GUYATT, G.; DIAZ, J.; KAWANO-DOURADO, L.; JACOBS, M.; VANDVIK, P. O.; A living WHO guideline on drugs for covid-19. **BMJ**, v. 372, p. m3379, 4 set. 2020.

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3rd ed. ed. New York, 2008.

LAUXMANN, M. A.; SANTUCCI, N. E.; AUTRÁN-GÓMEZ, A. M. The SARS-CoV-2 coronavirus and the COVID-19 outbreak. **International Braz J Urol**, v. 46, n. Suppl 1, p. 6–

18, 2020.

LEGENDRE, L. A.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. **Microfluidic devices for electrophoretic separations: Fabrication and use. Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, Third Edition**, 335-360, 2007.

LEO, B. F.; LIN, C. Y.; MARKANDAN, K.; SAW, L. H.; MOHD NADZIR, M. S.; GOVINDARAJU, K.; SHARIFFUDDIN, I. I.; SANKARA, R.; TIONG, Y. W.; PAKALAPATI, H.; KHALID, M.; An overview of SARS-CoV-2 transmission and engineering strategies to mitigate risk. **Journal of Building Engineering**, v. 73, n. May, p. 106737, 2023.

LIU, F.; DEMOSTHENES, P. Real-world data: a brief review of the methods, applications, challenges and opportunities. **BMC Medical Research Methodology**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2022.

LJUBIN-STERNAK, S.; MEŠTROVIĆ, T.; LUKŠIĆ, I.; MIJAČ, M.; VRANEŠ, J.; Seasonal Coronaviruses and Other Neglected Respiratory Viruses: A Global Perspective and a Local Snapshot. **Frontiers in Public Health**, v. 9, n. July, p. 1–10, 5 jul. 2021.

MAJUMDER, J.; MINKO, T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **AAPS Journal**, v. 23, n. 1, 2021.

MALONE, B.; CAMPBELL, E. A. Molnupiravir: coding for catastrophe. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 28, n. 9, p. 706–708, 13 set. 2021.

MARSON, B.; CONCENTINO, V.; JUNKERT, A.; FACHI, M.; VILHENA, R.; PONTAROLO, R.; VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED ON HPLC METHODS. **Química Nova**, v. 43, n. 8, p. 1190–1203, 2020.

MASYENI, S.; IQHRAMMULLAH, M.; FREDIANSYAH, A.; NAINU, F.; TALLEI, T.; EMRAN, T. BIN; OPHINNI, Y.; DHAMA, K.; HARAPAN, H.; Molnupiravir: A lethal mutagenic drug against rapidly mutating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2—A narrative review. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 7, p. 3006–3016, 2 jul. 2022.

MEGANCK, R. M.; BARIC, R. S. Developing therapeutic approaches for twenty-first-century emerging infectious viral diseases. **Nature medicine**, v. 27, n. 3, p. 401–410, 2021.

MEHTA, O. P.; BHANDARI, P.; RAUT, A.; KACIMI, S. E. O.; HUY, N. T.; Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. January, p. 1–9, 2021.

MEO, S. A.; KLONOFF, D. C. Human monkeypox outbreak: global prevalence and biological, epidemiological and clinical characteristics – observational analysis between 1970-2022. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 15, p. 5624–5632, 2022.

MERCK. **EIDD-2801**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/sml2873>. Acesso em: 15 ago. 2023.

MIRCO, J.; ROCHA, M. S. DA. Estudo de Estabilidade de Medicamentos. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 2, n. 7, p. 1–12, 2015.

MSEMBURI, W.; KARLINSKY, A.; KNUTSON, V.; ALESHIN-GUENDEL, S.; CHATTERJI, S.; WAKEFIELD, J.; The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. **Nature**, v. 613, n. 7942, p. 130–137, 5 jan. 2023.

NALBANDIAN, A.; SEHGAL, K.; GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V; MCGRODER, C.; STEVENS, J. S.; COOK, J. R.; NORDVIG, A. S.; SHALEV, D.; SEHRAWAT, T. S.; AHLUWALIA, N.; BIKDELI, B.; DIETZ, D.; DER-NIGOGHOSSIAN, C.; LIYANAGEDON, N.; ROSNER, G. F.; BERNSTEIN, E. J.; MOHAN, S.; BECKLEY, A. A.; SERES, D. S.; CHOUEIRI, T. K.; URIEL, N.; AUSIELLO, J. C.; ACCILI, D.; FREEDBERG, D. E.; BALDWIN, M.; SCHWARTZ, A.; BRODIE, D.; GARCIA, C. K.; ELKIND, M. S. V; CONNORS, J. M.; BILEZIKIAN, J. P.; LANDRY, D. W.; WAN, E. Y.; Post-acute COVID-19 syndrome. **Nature Medicine**, 22 mar. 2021.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, Editora Unicamp, 2001.

NEVES, L. N. DE O.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Determination of lactose and lactulose isomers in UHT milk by CZE-UV. **LWT**, v. 118, p. 108766, jan. 2020.

NICOLAOU, K. C.; SORENSEN, E. J. **Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods**. 1st. ed. Weinheim: VHC, 1996.

NIH. **Molnupiravir**. Disponível em:

<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/antivirals-including-antibody-products/molnupiravir/>. Acesso em: 25 ago. 2023.

NOGUEIRA, P. **Fim da emergência de saúde pública para a covid-19 decretado pela OMS não implica término da pandemia, alerta pesquisadora da Unesp**. Disponível em: <https://jornal.unesp.br/2023/05/09/fim-da-emergencia-de-saude-publica-para-a-covid-19-decretado-pela-oms-nao-implica-termino-da-pandemia-alerta-pesquisadora-da-unesp/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

ODUSANYA, O.; ODUGBEMI, B.; ODUGBEMI, T.; AJISEGIRI, W.; COVID-19: A review of the effectiveness of non-pharmacological interventions. **Nigerian Postgraduate Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 261, 2020.

OLIVEIRA, K. F. DE; OLIVEIRA, J. F. DE; WERNET, M.; PASCHOINI, M. C.; RUIZ, M. T.; Vertical transmission and COVID-19: a scoping review. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 74, n. suppl 1, p. 1–11, 2021.

OLIVEIRA, M. A. L. DE; SOARES, D. DO C.; TOSTES, G. S.; GUIMARÃES, M. DO C.; VAZ, F. A. S.; Optimization of an Alternative Methodology for Simultaneous Analysis of Nitrite and Nitrate in Water from Urban Stream by Capillary Electrophoresis under Direct UV Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 07, p. 484–490, 2012.

OMS. Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well

Established Drug Substances in Conventional Dosage Forms. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 863, p. 65–80, 1996.

OMS. Technical Report Series, Nº. 929, 2005, Annex 5, Guidelines for Registration of Fixed-Dose Combination Medicinal Products, Appendix 3, Pharmaceutical Development (or Preformulation) Studies. **OMS**, n. 929, p. 94–142, 2005.

OMS. **A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021**. 2021. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.1. Acesso em 15 ago. 2023.

OMS. **Annex 3. Good manufacturing practices: guidelines on validation**. 2006. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/production/trs1019-annex3-gmp-validation.pdf>. Acesso em: 15 ago 2023.

OMS. **Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it**. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Acesso em: 15 ago. 2023a.

OMS. **World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Licence: C ed. Geneva: World Health Organization, 2023b.

OMS. **World Health Statistics 2023 - A visual summary**. Disponível em: <https://www.who.int/data/stories/world-health-statistics-2023-a-visual-summary>. Acesso em: 15 ago. 2023c.

OMS. **WHO updates its treatment guidelines to include molnupiravir**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/03-03-2022-molnupiravir>. Acesso em: 15 ago. 2023d.

OPAS. **Excesso de mortalidade associado à pandemia de COVID-19 foi de 14,9 milhões em 2020 e 2021**. Disponível em: [https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2022-excesso-mortalidade-associado-pandemia-covid-19-foi-149-milhoes-em-2020-e-2021#:~:text=O excesso de mortalidade é,em dados de anos anteriores](https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2022-excesso-mortalidade-associado-pandemia-covid-19-foi-149-milhoes-em-2020-e-2021#:~:text=O%20excesso%20de%20mortalidade%20%C3%A9,em%20dados%20de%20anos%20anteriores). Acesso em: 15 ago. 2023a.

OPAS. **OMS declara fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19**. , 2023a. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publica-importancia-internacional-referente>. Acesso em: 15 ago. 2023b.

OPAS. **Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em: 18 jun. 2023c.

ORIQUI, L. R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P.; FREITAS, S. R.; GUILHERME, J.; SANTOS, M.; Definição De Shelf Life Para Produtos Químicos-a Importância De Um Guia De Estabilidade Específico Para O Segmento. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1869–1874, 2011.

PAINTER, G. R.; BOWEN, R. A.; BLUEMLING, G. R.; DEBERGH, J.; EDPUGANTI, V.; GRUDDANTI, P. R.; GUTHRIE, D. B.; HAGER, M.; KUIPER, D. L.; LOCKWOOD, M.

A.; MITCHELL, D. G.; NATCHUS, M. G.; STICHER, Z. M.; KOLYKHALOV, A. A.; The prophylactic and therapeutic activity of a broadly active ribonucleoside analog in a murine model of intranasal venezuelan equine encephalitis virus infection. **Antiviral Research**, v. 171, n. September, p. 104597, 2019.

PAINTER, G. R.; BLUEMLING, G. R.; NATCHUS, M. G.; GUTHRIE, D.; **WO Pat. WO2019173602.** , 2019.

PAINTER, G. R.; NATCHUS, M. G.; COHEN, O.; HOLMAN, W.; PAINTER, W. P.; Developing a direct acting, orally available antiviral agent in a pandemic: the evolution of molnupiravir as a potential treatment for COVID-19. **Current Opinion in Virology**, v. 50, p. 17–22, 2021a.

PAINTER, W. P.; HOLMAN, W.; BUSH, J. A.; ALMAZEDI, F.; MALIK, H.; ERAUT, N. C. J. E.; MORIN, M. J.; SZEWCZYK, L. J.; PAINTER, G. R.; Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 5, 19 abr. 2021b.

PANDEY, A.; NIKAM, A. N.; SHREYA, A. B.; MUTALIK, S. P.; GOPALAN, D.; KULKARNI, S.; PADYA, B. S.; FERNANDES, G.; MUTALIK, S.; PRASSL, R.; Potential therapeutic targets for combating SARS-CoV-2: Drug repurposing, clinical trials and recent advancements. **Life Sciences**, v. 256, n. January, p. 117883, set. 2020.

PARSONS, T. L.; KRYSZAK, L. A.; MARZINKE, M. A. Development and validation of assays for the quantification of β -D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β -D-N4-hydroxycytidine-triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1182, n. September, 2021.

PEDERSEN-BJERGAARD, STIG| GAMMELGAARD, B.; HALVORSEN, T. G. **Introduction to Pharmaceutical Analytical Chemistry**. Second ed. 2019.

PEDROSO, A. C. B. DA R.; DUTRA, H. T.; SANTOS, D. R. DOS; UBEDA, E. Z.; QUEIROZ, P. J. B.; BRANDSTETTER, L. R. G.; O papel do Médico Veterinário no enfrentamento da pandemia de Covid-19: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e2479119684, 2020.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—Analytical GREEnness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 21 jul. 2020.

PENG, Y.; TAO, H.; SATYANARAYANAN, S. K.; JIN, K.; SU, H.; A comprehensive summary of the knowledge on COVID-19 treatment. **Aging and Disease**, v. 12, n. 1, p. 155–191, 2021.

PEREIRA, V. R. D.; BEZERRA, M. A. M.; GOMEZ, M. R. B. P.; MARTINS, G. M.; DA SILVA, A. D.; DE OLIVEIRA, K. T.; DE SOUZA, R. O. M. A.; AMARANTE, G. W.; Concise two-step chemical synthesis of molnupiravir. **RSC Advances**, v. 12, n. 46, p. 30120–30124, 2022.

PHILLIPS, N. The coronavirus is here to stay — here's what that means. **Nature**, v. 590, n. 7846, p. 382–384, 18 fev. 2021.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.

PINHEIRO, B. C. S. **Como ser um educador antirracista**. 1ª ed. São Paulo: Planeta do Brasil, 2023.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, 15 jan. 2021.

PRUIJSSERS, A. J.; DENISON, M. R. Nucleoside analogues for the treatment of coronavirus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 35, n. January, p. 57–62, 2019.

PUSTAKE, M.; TAMBOLKAR, I.; GIRI, P.; GANDHI, C.; SARS, MERS and CoVID-19: An overview and comparison of clinical, laboratory and radiological features. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 11, n. 1, p. 10, 2022.

PYELL, U. Micellar and Microemulsion Electrokinetic Chromatography. In: **Capillary Electromigration Separation Methods**. Elsevier, 2018. p. 113–142.

RAHMAH, L.; ABARIKWU, S. O.; ARERO, A. G.; ESSOUMA, M.; JIBRIL, A. T.; FAL, A.; FLISIAK, R.; MAKUKU, R.; MARQUEZ, L.; MOHAMED, K.; NDOW, L.; ZARĘBSKA-MICHALUK, D.; REZAEI, N.; RZYMSKI, P.; Oral antiviral treatments for COVID-19: opportunities and challenges. **Pharmacological Reports**, v. 74, n. 6, p. 1255–1278, 25 dez. 2022.

RAHMAN, H. S.; AZIZ, M. S.; HUSSEIN, R. H.; OTHMAN, H. H.; SALIH OMER, S. H.; KHALID, E. S.; ABDULRAHMAN, N. A.; AMIN, K.; ABDULLAH, R.; The transmission modes and sources of COVID-19: A systematic review. **International Journal of Surgery Open**, v. 26, p. 125–136, 2020.

RAJ, C. T. D.; KANDASWAMY, D. K.; DANDUGA, R. C. S. R.; RAJASABAPATHY, R.; JAMES, R. A.; COVID-19: molecular pathophysiology, genetic evolution and prospective therapeutics—a review. **Archives of Microbiology**, 8 fev. 2021.

RAY, A. S.; BHATTACHARYA, K. An Overview on the Zoonotic Aspects of COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, 26 abr. 2023.

REÇBER, T.; TIMUR, S. S.; ERDOĞAN KABLAN, S.; YALÇIN, F.; KARABULUT, T. C.; NESLIHAN GÜRISOY, R.; EROĞLU, H.; KIR, S.; NEMUTLU, E.; A stability indicating RP-HPLC method for determination of the COVID-19 drug molnupiravir applied using nanoformulations in permeability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 214, n. February, 2022.

REINHARDT, É. L. Transmissão da COVID-19: um breve reexame das vias de transmissão por gotículas e aerossóis. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 47, p. 1–9, 2022.

- REYNARD, O.; NGUYEN, X. N.; ALAZARD-DANY, N.; BARATEAU, V.; CIMARELLI, A.; VOLCHKOV, V. E.; Identification of a new ribonucleoside inhibitor of ebola virus replication. **Viruses**, v. 7, n. 12, p. 6233–6240, 2015.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.
- RIBEIRO, F. A. DE L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. DA; SCHNEIDER, R. P.; Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.
- RIEKKOLA, M.-L.; JÖNSSON, J. Å.; SMITH, R. M. Terminology for analytical capillary electromigration techniques (IUPAC Recommendations 2003). **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 443–451, 1 jan. 2004.
- RODRIGUES, L.; BENTO CUNHA, R.; VASSILEVSKAIA, T.; VIVEIROS, M.; CUNHA, C.; Drug Repurposing for COVID-19: A Review and a Novel Strategy to Identify New Targets and Potential Drug Candidates. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2723, 23 abr. 2022.
- ROSENKE, K.; HANSEN, F.; SCHWARZ, B.; FELDMANN, F.; HADDOCK, E.; ROSENKE, R.; MEADE-WHITE, K.; OKUMURA, A.; LEVENTHAL, S.; HAWMAN, D.; RICOTTA, E.; BOSIO, C.; SATURDAY, G.; FELDMANN, H.; JARVIS, M.; Orally delivered MK-4482 inhibits SARS-CoV-2 replication in the Syrian hamster model. **Research square**, 8 out. 2020.
- ROZENFELD, S.; RANGEL, I. T. M. A farmacovigilância. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 4, n. 3, p. 336–341, set. 1988.
- RUIZ-MEDINA, B. E.; VARELA-RAMIREZ, A.; KIRKEN, R. A.; ROBLES-ESCAJEDA, E.; The SARS-CoV-2 origin dilemma: Zoonotic transfer or laboratory leak? **BioEssays**, v. 44, n. 1, p. 2100189, 22 jan. 2022.
- SAHA, B. K.; BONNIER, A.; CHONG, W. Antimalarials as Antivirals for COVID-19: Believe it or Not! **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 360, n. 6, p. 618–630, dez. 2020.
- SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, n. October 2021, p. 123046, fev. 2022.
- SALMAN, B. I.; IBRAHIM, A. E.; EL DEEB, S.; SARAYA, R. E.; Fabrication of novel quantum dots for the estimation of COVID-19 antiviral drug using green chemistry: application to real human plasma. **RSC Advances**, v. 12, n. 26, p. 16624–16631, 2022.
- SĂNDULESCU, O.; APOSTOLESCU, C. G.; PREOȚESCU, L. L.; STREINU-CERCEL, A.; SĂNDULESCU, M.; Therapeutic developments for SARS-CoV-2 infection—Molecular mechanisms of action of antivirals and strategies for mitigating resistance in emerging variants in clinical practice. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, n. March, p. 1–10, 2 mar.

2023.

SARAYA, R. E.; DEEB, S. EL; SALMAN, B. I.; IBRAHIM, A. E.; Highly sensitive high-performance thin-layer chromatography method for the simultaneous determination of molnupiravir, favipiravir, and ritonavir in pure forms and pharmaceutical formulations. **Journal of Separation Science**, v. 45, n. 14, p. 2582–2590, 12 jul. 2022.

SENDI, P.; RAZONABLE, R. R.; NELSON, S. B.; SORIANO, A.; GANDHI, R. T.; First-generation oral antivirals against SARS-CoV-2. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 9, p. 1230–1235, set. 2022.

SHAH, W.; HILLMAN, T.; PLAYFORD, E. D.; HISHMEH, L.; Managing the long term effects of covid-19: Summary of NICE, SIGN, and RCGP rapid guideline. **The BMJ**, v. 372, p. 10–13, 2021.

SHARAF, Y. A.; EL DEEB, S.; IBRAHIM, A. E.; AL-HARRASI, A.; SAYED, R. A.; Two Green Micellar HPLC and Mathematically Assisted UV Spectroscopic Methods for the Simultaneous Determination of Molnupiravir and Favipiravir as a Novel Combined COVID-19 Antiviral Regimen. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 1–15, 2022.

SHEAHAN, T. P.; SIMS, A. C.; ZHOU, S.; GRAHAM, R. L.; HILL, C. S.; LEIST, S. R.; SCHÄFER, A.; DINNON, K. H.; MONTGOMERY, S. A.; AGOSTINI, M. L.; PRUIJSSERS, A. J.; CHAPPELL, J. D.; BROWN, A. J.; BLUEMLING, G. R.; NATCHUS, M. G.; SAINDANE, M.; KOLYKHALOV, A. A.; PAINTER, G.; HARCOURT, J.; TAMIN, A.; THORNBURG, N. J.; SWANSTROM, R.; DENISON, M. R.; BARIC, R. S.; An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 and multiple endemic, epidemic and bat coronavirus. **bioRxiv**, v. 5883, n. April, 2020.

SHOU, C.; WANG, C.; YANG, H. Vertical Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Current Evidence and Perspectives. **Maternal-Fetal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 65–68, abr. 2023.

SILVA, J. A. F. DA; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M.; Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, jun. 2007.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J.; Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SINGER, B. J.; THOMPSON, R. N.; BONSALE, M. B. The effect of the definition of ‘pandemic’ on quantitative assessments of infectious disease outbreak risk. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 2547, 28 jan. 2021.

SKOOG. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição ed. 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. Seventh Ed ed. Boston: Cengage Learning, 2018.

SPUDEIT, D. A.; GONÇALVES, S.; BRETANHA, L. C.; CLAUMANN, C. A.; MACHADO, R. A. F.; MICKE, G. A.; A systematic procedure to develop a capillary electrophoresis method using a minimal experimental data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 11, p. 1974–1979, 2016.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

STEINER, A.; ZNIDAR, D.; ÖTVÖS, S. B.; SNEAD, D. R.; DALLINGER, D.; KAPPE, C. O.; A High-Yielding Synthesis of EIDD-2801 from Uridine**. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2020, n. 43, p. 6736–6739, 22 nov. 2020.

STICHER, Z. M.; LU, G.; MITCHELL, D. G.; MARLOW, J.; MOELLERING, L.; BLUEMLING, G. R.; GUTHRIE, D. B.; NATCHUS, M. G.; PAINTER, G. R.; KOLYKHALOV, A. A.; Analysis of the potential for N4-hydroxycytidine to inhibit mitochondrial replication and function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 1–11, 2020.

STRUCK, W.; WASZCZUK-JANKOWSKA, M.; KALISZAN, R.; MARKUSZEWSKI, M. J.; The state-of-the-art determination of urinary nucleosides using chromatographic techniques “hyphenated” with advanced bioinformatic methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 7, p. 2039–2050, 2011.

STUYVER, L. J.; WHITAKER, T.; MCBRAYER, T. R.; HERNANDEZ-SANTIAGO, B. I.; LOSTIA, S.; THARNISH, P. M.; RAMESH, M.; CHU, C. K.; JORDAN, R.; SHI, J.; RACHAKONDA, S.; WATANABE, K. A.; OTTO, M. J.; SCHINAZI, R. F.; Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhoea and hepatitis C viruses in culture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 244–254, 2003.

SYED, Y. Y. Molnupiravir: First Approval. **Drugs**, v. 82, n. 4, p. 455–460, 20 mar. 2022.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F.; A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2–3, p. 75–88, abr. 1998.

TAVARES, M. F. G. Eletroforese capilar: conceitos basicos. **Quimica Nova. Nova**, v. 19, n. 2, p. 182–189, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quimica Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ICHIKAWA, K.; TSUCHIYA, A.; ANDO, T.; Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111–113, 1 jan. 1984.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ANDO, T. Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 834–841, 1985.

THE ECONOMIST. **Tracking covid-19 excess deaths across countries**. Disponível em: <https://www.economist.com/graphic-detail/coronavirus-excess-deaths-tracker>. Acesso em: 15 ago. 2023.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 1 jan. 2002.

TIAN, F.; FENG, Q.; CHEN, Z.; Efficacy and Safety of Molnupiravir Treatment for COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 62, n. 2, p. 106870, 5 ago. 2023.

TIAN, L.; QIANG, T.; LIANG, C.; REN, X.; JIA, M.; ZHANG, J.; LI, J.; WAN, M.; YUWEN, X.; LI, H.; CAO, W.; LIU, H.; RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors: The current landscape and repurposing for the COVID-19 pandemic. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 213, p. 113201, mar. 2021.

TIAN, L.; PANG, Z.; LI, M.; LOU, F.; AN, X.; ZHU, S.; SONG, L.; TONG, Y.; FAN, H.; FAN, J.; Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 4 abr. 2022.

TOOTS, M.; YOON, J.-J.; COX, R. M.; HART, M.; STICHER, Z. M.; MAKHSOUS, N.; PLESKER, R.; BARRENA, A. H.; REDDY, P. G.; MITCHELL, D. G.; SHEAN, R. C.; BLUEMLING, G. R.; KOLYKHALOV, A. A.; GRENINGER, A. L.; NATCHUS, M. G.; PAINTER, G. R.; PLEMPER, R. K.; Characterization of orally efficacious influenza drug with high resistance barrier in ferrets and human airway epithelia. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 515, p. eaax5866, 23 out. 2019.

TROVATO, M.; SARTORIUS, R.; D'APICE, L.; MANCO, R.; DE BERARDINIS, P.; Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–20, 2020.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

VENKATANARAYANA, P.; KOLLI, D.; SEELAMA, N. V.; RAMAKRISHNA, D. S.; Synthesis of molnupiravir (MK-4482, EIDD-2801): a promising oral drug for the treatment of COVID-19 starting from cytidine. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 42, n. 6, p. 427–435, 3 jun. 2023.

VENTURA, D. DE F. L.; AITH, F. M. A.; RACHED, D. H. A emergência do novo coronavírus e a “lei de quarentena” no Brasil. **Revista Direito e Práxis**, v. 12, n. 1, p. 102–138, jan. 2021.

WADMAN, M. When is a pandemic officially ‘over’? **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1077–1078, 11 mar. 2022.

WAHL, A.; GRALINSKI, L. E.; JOHNSON, C. E.; YAO, W.; KOVAROVA, M.; DINNON, K. H.; LIU, H.; MADDEN, V. J.; KRZYSTEK, H. M.; DE, C.; WHITE, K. K.; GULLY, K.; SCHÄFER, A.; ZAMAN, T.; LEIST, S. R.; GRANT, P. O.; BLUEMLING, G. R.; KOLYKHALOV, A. A.; NATCHUS, M. G.; ASKIN, F. B.; PAINTER, G.; BROWNE, E. P.; JONES, C. D.; PICKLES, R. J.; BARIC, R. S.; GARCIA, J. V.; SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. **Nature**, v. 591, n. September 2020, 2021.

WANG, H.; PAULSON, K. R.; PEASE, S. A.; WATSON, S.; COMFORT, H.; ZHENG, P.; ARAVKIN, A. Y.; BISIGNANO, C.; BARBER, R. M.; ALAM, T.; FULLER, J. E.; MAY, E. A.; JONES, D. P.; FRISCH, M. E.; ABBAFATI, C.; ADOLPH, C.; ALLORANT, A.; AMLAG, J. O.; BANG-JENSEN, B.; BERTOLACCI, G. J.; BLOOM, S. S.; CARTER, A.; CASTRO, E.; CHAKRABARTI, S.; CHATTOPADHYAY, J.; COGEN, R. M.; COLLINS, J. K.; COOPERRIDER, K.; DAI, X.; DANGEL, W. J.; DAOUD, F.; DAPPER, C.; DEEN, A.; DUNCAN, B. B.; ERICKSON, M.; EWALD, S. B.; FEDOSSEEVA, T.; FERRARI, A. J.; FROSTAD, J. J.; FULLMAN, N.; GALLAGHER, J.; GAMKRELIDZE, A.; GUO, G.; HE, J.; HELAK, M.; HENRY, N. J.; HULLAND, E. N.; HUNTLEY, B. M.; KERESSELIDZE, M.; LAZZAR-ATWOOD, A.; LEGRAND, K. E.; LINDSTROM, A.; LINEBARGER, E.; LOTUFO, P. A.; LOZANO, R.; MAGISTRO, B.; MALTA, D. C.; MÅNSSON, J.; MANTILLA HERRERA, A. M.; MARINHO, F.; MIRKUZIE, A. H.; MISGANAW, A. T.; MONASTA, L.; NAIK, P.; NOMURA, S.; O'BRIEN, E. G.; O'HALLORAN, J. K.; OLANA, L. T.; OSTROFF, S. M.; PENBERTHY, L.; REINER JR, R. C.; REINKE, G.; RIBEIRO, A. L. P.; SANTOMAURO, D. F.; SCHMIDT, M. I.; SHAW, D. H.; SHEENA, B. S.; SHOLOKHOV, A.; SKHVITARIDZE, N.; SORENSEN, R. J. D.; SPURLOCK, E. E.; SYAILENDRAWATI, R.; TOPOR-MADRY, R.; TROEGER, C. E.; WALCOTT, R.; WALKER, A.; WIYSONGE, C. S.; WORKU, N. A.; ZIGLER, B.; PIGOTT, D. M.; NAGHAVI, M.; MOKDAD, A. H.; LIM, S. S.; HAY, S. I.; GAKIDOU, E.; MURRAY, C. J. L.; Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020–21. **The Lancet**, v. 399, n. 10334, p. 1513–1536, abr. 2022.

WERNECK, G. L.; CARVALHO, M. S. A pandemia de COVID-19 no Brasil: Crônica de uma crise sanitária anunciada. **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 5, p. 1–4, 2020.

WHO. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. 2022a. Disponível em: <https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 30 mar. 2021.

WHO. **WHO updates its treatment guidelines to include molnupiravir**. 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/03-03-2022-molnupiravir#:~:text=Under the care of a,it can help prevent hospitalization>. Acesso em: 15 ago 2023.

WHO. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. **WHO Director General's speeches**, n. 2005, p. 1–6, 2023a.

WHO. **What's the difference between Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) and pandemic?**. 2023b. Disponível em: <https://youtube/GAfZlnbtioY>. Acesso em: 15 ago. 2023.

WILSON, N.; CORBETT, S.; TOVEY, E. Airborne transmission of covid-19. **The BMJ**, v. 370, p. 10–11, 2020.

WISE, J. Covid-19: WHO declares end of global health emergency. **BMJ**, v. 368, n. May, p. p1041, 9 maio 2023.

YAN, D.; YAN, B. Viral target and metabolism-based rationale for combined use of recently authorized small molecule COVID-19 medicines: Molnupiravir, nirmatrelvir, and remdesivir. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 37, n. 4, p. 726–738, 25 ago. 2023.

YE, Z. W.; YUAN, S.; YUEN, K. S.; FUNG, S. Y.; CHAN, C. P.; JIN, D. Y.; Zoonotic origins of human coronaviruses. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1686–1697, 2020.

YOON, J. J.; TOOTS, M.; LEE, S.; LEE, M. E.; LUDEKE, B.; LUCZO, J. M.; GANTI, K.; COX, R. M.; STICHER, Z. M.; EDPUGANTI, V.; MITCHELL, D. G.; LOCKWOOD, M. A.; KOLYKHALOV, A. A.; GRENINGER, A. L.; MOORE, M. L.; PAINTER, G. R.; LOWEN, A. C.; TOMPKINS, S. M.; FEARNNS, R.; NATCHUS, M. G.; PLEMPER, R. K.; Orally efficacious broad-spectrum ribonucleoside analog inhibitor of influenza and respiratory syncytial viruses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, p. 1–18, 2018.

YOUSEFI, H.; MASHOURI, L.; OKPECHI, S. C.; ALAHARI, N.; ALAHARI, S. K.; Repurposing existing drugs for the treatment of COVID-19/SARS-CoV-2 infection: A review describing drug mechanisms of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, n. July 2020, p. 114296, 2021.

APÊNDICE A – Produção acadêmica**1. Colaboração em artigo publicado na *Analytical Methods***

Moreira, O. B. de O.; de Souza, J. C. Q.; Candido, J. M. B.; do Nascimento, M. P.; Chellini, P. R.; Marco, de L. L.; de Oliveira, M. A. L.; *Factorial design applied to LC-ESI-QTOF mass spectrometer parameters for untargeted metabolomics*. 2023;15(20):2512-2521. [https://doi.org/10.1039/D3AY00094J]

2. Colaboração em artigo publicado na *Journal of the Brazilian Chemical Society*

Moreira, O. B. de O.; Berlande, B. M.; de Souza, J. C. Q.; Candido, J. M. B.; Jaeger, L. H.; Adriano, L. H. C.; Brito, D. A. M. A.; do Nascimento, M. P.; Geraldo, P. A.; Chellini, P. R.; de Oliveira, M. A. L.; *Capillary Electromigration Techniques Applied to Clinical Chemistry Investigations and Alternative Diagnostic Assays: Possibilities and Perspectives*. 2023 (online) 00;(00):1-23 [http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230096]

3. Colaboração em artigo publicado na *Talanta*

Moreira, O. B. de O.; de Souza, J. C. Q.; Candido, J. M. B.; do Nascimento, M. P.; Chellini, P. R.; de Lemos, L. M.; de Oliveira, M. A. L.; *Determination of creatinine in urine and blood serum human samples by CZE-UV using on-column internal standard injection*. 2023, 258, 124465. [http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124465]

4. Artigo publicado na *Química Nova*

de Oliveira, M. A. L.; Watanabe, A. S. A.; Cesar, D. E.; Candido, J. M. B.; Lima, N. M.; Moreira, O. B. de O.; Chellini, P. R.; TESTES DIAGNÓSTICOS PARA O SARS-COV-2: UMA REFLEXÃO CRÍTICA. 2022;45(6):760-766. [http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170895]

5. Colaboração em artigo publicado na *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*

Moreira, O. B. de O.; de Souza, J. C. Q.; Candido, J. M. C.; do Nascimento, M. P.; Penna, E. A.; Chellini, P. R.; de Oliveira, M. A. L.; *Capillary Electrophoresis Applied to Human Urine Analysis for Clinical Diagnosis: New Trends and Perspectives*. 2022;10(39):17-51. [http://dx.doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.RV-13-2022]

6. Artigo de revisão publicado na *Electrophoresis*

Geraldo, P. A.; Velasco, A. W. de C.; Berlande, B. M.; de Souza, J. C. Q.; Candido, J. M. B.; Adriano, L. H. C.; Brito, M. A. D. A.; do Nascimento, M. P.; Moreira, O. B. de O.; de Oliveira, M. A. L.; *Fatty acids analysis by Capillary Electrophoresis: fundamentals, advantages and applications.*

7. Artigo publicado na *Química Nova*

Adriano, L. H. C.; Candido, J. M. B.; Moreira, O. B. de O.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; de Oliveira, M. A. L. *Tutorial para aplicação didática de planejamentos de misturas utilizando LibreOffice e RStudio.*

8. Colaboração em artigo submetido à *Analytica Chimica Acta*

Moreira, O. B. de O.; Adriano, L. H. C.; de Souza, J. C. Q.; Candido, J. M. B.; do Nascimento, M. P.; Chellini, P. R.; de Lemos, E. B. T.; Pinto, I. S. B.; de Lemos, L. M.; de Oliveira, M. A. L.; *Target metabolomics and machine learning associated to CZE-UV as screening method for COVID-19 investigations in human urine.*

9. Artigo em elaboração para ser submetido à *Journal Chemical Education*

Candido, J. M. B.; Afonso, A. F.; de Oliveira, M. A. L.; *Evaluation of undergraduate chemistry students' learning on the dilution factor in spectrophotometric titrations.*

10. Artigo em desenvolvimento para ser submetido à *Analytical Methods*

Candido, J. M. B.; de Oliveria, M. A. L.; *Factorial Design of Electrolyte System for the Separation of Molnupiravir and NHC using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography.*