UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lisdexanfetamina: desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida acoplada a detector de massas e avaliação farmacocinética preliminar

ELOISA COMIRAN

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lisdexanfetamina: desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida acoplada a detector de massas e avaliação farmacocinética preliminar

Tese apresentada por **Eloisa Comiran** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröehlich

PORTO ALEGRE, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.10.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Aline Rigon Zimmer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Félix Henrique Paim Kessler
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Kristiane de Cássia Mariotti
Polícia Federal

Comiran, Eloisa
Lisdexanfetamina: desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por cromatografia líquida acoplada a detector de massas e avaliação farmacocinética preliminar / Eloisa Comiran. -- 2015.
228 f.

Orientadora: Renata Pereira Limberger.
Coorientador: Pedro Eduardo Fröehlich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. lisdexanfetamina. 2. anfetamina. 3. cromatografia líquida-espectrometria de massas. 4. farmacocinética. 5. toxicologia. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Fröehlich, Pedro Eduardo, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arlindo e Clair Comiran, por serem minha base, por me oferecerem a oportunidade de estudar, incentivo, apoio incondicional, amor constante e me ensinarem a ser a pessoa que sou.

Ao meu irmão, Aluisio Comiran, pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao meu namorado, Rafael Hendler, por todo o amor, compreensão e suporte nos momentos difíceis.

À Profa. Renata Pereira Limberger pela orientação e oportunidade para realização desse trabalho.

Ao Prof. Pedro Eduardo Fröehlich pela orientação e esclarecimentos.

Ao Prof. Flavio Pechansky pelas etapas realizadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia e do Laboratório de Química Farmacêutica que estiveram em algum momento presentes e contribuíram de alguma forma nessa caminhada desde o tempo de iniciação científica. Especialmente à Ana Laura Jacques, Bruna Tassi Borille, Débora Prusch, Felipe D'Àvila, Gabriela Schmitt, Kristiane Mariotti, Madson Ralide, Maíra Kerpel dos Santos, Otávio Augustin, Paula Boehl, Roselena Schuh e Taís Regina Fiorentin por tornarem meus dias mais felizes, pela amizade, pelos momentos de descontração, alegria e discussões científicas.

À amiga Graciela Carlos pela amizade, auxílio, incentivo nos momentos difíceis e parceria na realização deste trabalho.

Ao pessoal do LANAGRO por ter me recebido e disponibilizado o equipamento, e especialmente ao Fabiano Barreto, exemplo de profissional e fundamental para a realização deste trabalho, por doar seu tempo, por toda ajuda inclusive nos momentos críticos, por contribuir para o meu conhecimento, crescimento e formação nas discussões científicas.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFRGS pela oportunidade de aprimoramento.

Aos voluntários, que permitiram a realização deste trabalho, disponibilizando seu tempo para ciência de maneira altruísta. Eles me fizeram acreditar que, mesmo sem uma profunda amizade, ainda existem pessoas boas que se doam sem esperar benefícios.

A CAPES pelo suporte financeiro.

EPÍGRAFE

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

Lisdexanfetamina (LDX) é um pró-fármaco estimulante de longa duração indicado para o tratamento dos sintomas do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e do transtorno da compulsão alimentar periódica. A hidrólise da ligação amida da LDX ocorre *in vivo* liberando a molécula terapeuticamente ativa *d*-anfetamina (*d*-ANF) e o aminoácido *l*-lisina. Visto que a LDX se biotransforma à *d*-ANF – um potente estimulante do sistema nervoso central com destaque tanto na clínica quanto na toxicologia – existe potencial para uso inadequado, abuso e desvio para fins não terapêuticos. Nos laboratórios de toxicologia, amostras biológicas com resultados positivos para anfetamina (ANF) são um desafio, uma vez que alguns testes toxicológicos podem detectar ANF devido à utilização de alguns medicamentos, dificultando a sua interpretação. Assim, são necessários métodos bioanalíticos eficientes aliados ao conhecimento farmacocinético, que permite a verificação da possibilidade de detecção, a estimativa da janela de detecção e as concentrações que podem ser alcançadas em diferentes matrizes biológicas. Dessa forma, neste trabalho, foram desenvolvidos métodos bioanalíticos para quantificação simultânea da LDX e de seu produto de biotransformação, a ANF, nas matrizes biológicas fluido oral, plasma e urina utilizando a cromatografia líquida acoplada a detector de massas sequencial (CL-EM/EM). A preparação de amostra é simples, utilizando a precipitação de proteínas para o plasma, com pouca quantidade de solvente orgânico, a diluição para o fluido oral e a filtração para urina, ambas com nenhuma quantidade de solvente orgânico. As curvas de calibração utilizando o padrão interno ANF deuterada apresentaram linearidade entre 1 e 128 ng/mL para o fluido oral e o plasma e entre 4 e 256 ng/mL para a urina. A menor concentração das curvas de calibração é igual ao limite inferior de quantificação. Precisão e exatidão intra e interdia ficaram dentro dos limites de ± 15% para os controles e ± 20% para o limite de quantificação. Os métodos foram seletivos e sem efeito residual, porém apresentaram um leve efeito matriz, frequentemente encontrado em métodos de CL-EM/EM. O método foi aplicado para análise das amostras do estudo farmacocinético da LDX e ANF nas matrizes biológicas fluido oral, plasma e urina após administração oral de LDX. Seis voluntários do sexo masculino coletaram amostras de fluido oral e plasma em tempos pré-determinados durante 72 horas e amostras de urina em intervalos pré-determinados durante 120 horas. Os dados foram

avaliados de maneira não-compartimental e compartimental. Considerando a análise não-compartimental, a concentração máxima média da *d*-ANF foi quase seis vezes inferior no plasma em relação ao fluido oral e ocorreu em 3,8 e 4 horas, respectivamente, após a administração oral. A LDX atingiu a concentração máxima no plasma e no fluido oral em 1,2 e 1,8 horas após a administração oral, respectivamente, com um valor médio de pico de concentração quase duas vezes mais elevado no plasma em comparação com o fluido oral. A eliminação da *d*-ANF a partir do plasma e a partir do fluido oral foi semelhante, porém para LDX a eliminação a partir do fluido oral foi mais lenta, mesmo com concentrações mais baixas do que no plasma. A detecção da *d*-ANF ocorreu até 48-72 horas no plasma e fluido oral e até 120 horas em urina. Já para a LDX, a detecção ocorreu até 3, 5 e 12 horas no plasma, fluido oral e urina, respectivamente. LDX intacta e *d*-ANF foram detectadas nas três matrizes avaliadas. Na análise compartimental, o melhor ajuste de modelo foi observado para 1 compartimento para ambos os analitos tanto no plasma quanto no fluido oral. Houve uma correlação entre as concentrações do fluido oral e do plasma para *d*-ANF e entre as proporções de LDX intacta/*d*-ANF pelo tempo no plasma e no fluido oral. O método analítico desenvolvido pode ser aplicado em diferentes áreas do conhecimento a fim de certificar os resultados de uma análise de triagem positiva para ANF. Porém, para interpretação das situações tanto de triagem quanto de confirmação é necessário aliar o conhecimento farmacocinético gerado no trabalho, que demonstra se há a possibilidade de detecção na matriz analisada e por quanto tempo após a administração da LDX. Isto auxilia na diferenciação do uso de outros medicamentos derivados da ANF e do uso ilegal, para que as devidas providências legais e de manejos clínicos de tratamento e controle de dependência sejam tomadas quando necessário.

Palavras-chave: lisdexanfetamina, anfetamina, cromatografia líquida-espectrometria de massas, farmacocinética, toxicologia.

ABSTRACT

Lisdexamfetamine: Development and validation of a method using liquid chromatography coupled to mass detector and preliminary pharmacokinetics evaluation

Lisdexamfetamine (LDX) is a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder and binge-eating disorder symptoms. In vivo hydrolysis of lisdexamfetamine amide bond releases the therapeutically active *d*-amphetamine (*d*-AMPH) and the amino acid *l*-lysine. Since LDX biotransformation gives rise to *d*-AMPH - a potent stimulant of the central nervous system that stands out in clinical and toxicology - there is potential for misuse, abuse and diversion for non-therapeutic purposes. In laboratories of toxicology, biological samples with positive results for amphetamine (AMPH) are a challenge, since some toxicological tests can detect AMPH due to the use of some medications hindering the interpretation. Therefore, we need efficient bioanalytical methods combined with the pharmacokinetic knowledge, which allows to verify the possibility of detection, to assess the detection window and the concentrations that can be reached in different biological matrices. Hence, bioanalytical methods were developed for simultaneous quantification of LDX and its main biotransformation product AMPH in the biological matrices oral fluid, plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). The sample preparation is simple, using protein precipitation for plasma, with a small amount of organic solvent, dilution for oral fluid and filtration to urine, both with no amount of organic solvent. Calibration curves using deuterated AMPH internal standard showed linearity between 1 and 128 ng/mL for oral fluid and plasma, and between 4 and 256 ng/mL for urine. The lowest concentration of the calibration curve is the lower limit of quantification. Intra and interday precision and accuracy were within the limits of ± 15% for controls and ± 20% for the limit of quantification. The methods were selective and no carry-over was observed, however with some matrix effect, often found in LC-MS/MS methods. The method was applied to analyze samples from LDX and AMPH pharmacokinetics study in the biological matrices oral fluid, plasma and urine following oral administration of LDX. Six male volunteers collected oral fluid and plasma samples at

predetermined times during 72 hours and urine samples at pre-determined intervals during 120 hours. Data were evaluated through non-compartmental and compartmental analysis. Considering the noncompartmental analysis, the mean maximum concentration of *d*-AMPH was almost 6-fold lower in plasma than in oral fluid and occurred at 3.8 and 4 hours, respectively, after LDX administration. LDX maximum concentration was reached at 1.2 and 1.8 hours after LDX oral administration for oral fluid and plasma, respectively, with a mean peak concentration almost 2-fold higher in plasma when compared with oral fluid. Elimination of *d*-AMPH from oral fluid and from plasma were similar, albeit for LDX elimination from oral fluid was slower even with lower concentrations than plasma. Detection occurred until 48 to 72 hours in plasma and oral fluid and until 120 hours in urine for *d*-AMPH. Whereas for LDX, detection could be done for up to 3, 5 and 12 hours in plasma, oral fluid and urine, respectively. Intact LDX and *d*-AMPH were detected in the three evaluated matrices. In compartmental analysis, the best model fit was observed for 1-compartment model for both analytes in plasma and in oral fluid. There was a correlation between oral fluid and plasma *d*-AMPH concentrations and between intact LDX/*d*-AMPH ratios along time in plasma as well as in oral fluid. The bioanalytical methods developed can be applied in different fields of knowledge in order to ensure the results of a positive screening analysis for AMPH. Nevertheless, for interpretation of situations in both screening and confirmation tests is necessary to combine the pharmacokinetic knowledge produced in this study, which shows if there is the possibility of detection in the analyzed matrix and for how long after the administration of LDX. This results aid in the differentiation from other AMPH derived drugs use and from illegal use, so that appropriate legal action and clinical management strategies for treatments and control of dependence be taken when necessary.

Keywords: lisdexamfetamine, amphetamine, liquid chromatography-mass spectrometry, pharmacokinetics, toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrólise enzimática da LDX em *d*-ANF e *l*-lisina. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sintomatologia em crianças x adultos. 32
Tabela 2: Medicamentos aprovados para o tratamento do TDAH no Brasil e nos Estados Unidos. 36
Tabela 3: Formas farmacêuticas de liberação imediata e prolongada utilizados no tratamento dos sintomas do TDAH. 37
Tabela 4: Identificação e propriedades químicas da LDX. 43
Tabela 5: Comparação de mecanismos farmacológicos de alguns medicamentos para TDAH. 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	Anfetamina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva do tempo 0 ao tempo infinito
ASC_{0-t}	Área sob a curva do tempo 0 ao último tempo de concentração determinada
ASC_{0-24}	Área sob a curva do tempo 0 a 24 horas
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada a detector de massas sequencial
C_{max}	Concentração máxima
$C_{max,ss}$	Concentração máxima observada no estado estacionário
C_{med}	Concentração média no estado estacionário
$C_{min,ss}$	Concentração mínima observada no estado estacionário
d-ANF	Dextroanfetamina
EA	Efeitos adversos
FDA	Food and Drug Administration
IF	Índice de flutuação
LDX	Lisdexanfetamina
LQ	Limite de quantificação
TCAP	Transtorno da Compulsão Alimentar Periódica
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
$t_{½}$	Tempo de meia vida
t_{max}	Tempo para atingir a concentração máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 OBJETIVOS 25

2.1 Objetivo geral 27

2.2 Objetivos específicos 27

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 29

3.1 Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) 31

3.1.1 Etiologia do TDAH 32

3.1.2 Comorbidades 34

3.1.3 TDAH e o trânsito 34

3.1.4 Impacto econômico 34

3.1.5 Tratamento dos sintomas 35

3.1.5.1 Medicamentos estimulantes 38

3.1.5.2 Medicamentos não estimulantes 39

3.2 Transtorno da Compulsão Alimentar Periódica (TCAP) 40

3.3 Lisdexanfetamina (LDX) 42

3.3.1 Farmacodinâmica 44

3.3.2 Características e outros estudos sobre a LDX 48

3.3.3 Eficácia, segurança e tolerabilidade 50

3.3.4 Toxicologia 54

3.3.5 Outros usos 58

3.3.6 Controle no trânsito 60

3.3.7 Ambiental 61

3.3.8 Métodos de detecção 62

3.4 Análise de derivados da ANF 63

3.5 Matrizes Biológicas 65

3.5.1 Relação fluido oral x plasma 67

3.6 Preparo de Amostras 69

3.7 Cromatografia líquida acoplada a detector de massas sequencial (CL-EM/EM) 70

3.8 Validação de métodos analíticos 70

4 CAPÍTULO 1 – *LISDEXANFETAMINA: REVISÃO FARMACOCINÉTICA* 71

4.1 Manuscrito I 73

5 CAPÍTULO 2 – *LISDEXANFETAMINA: REVISÃO DE POTENCIAL PARA ABUSO* 99

5.1 Manuscrito II 101

6 CAPÍTULO 3 – *INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO DETECTOR DE MASSAS NA ANÁLISE DA LISDEXANFETAMINA E DA ANFETAMINA* 117

6.1 Manuscrito III 119

7 CAPÍTULO 4 – *VALIDAÇÃO DE MÉTODO E DETERMINAÇÃO DE LISDEXANFETAMINA E DE ANFETAMINA EM FLUIDO ORAL, PLASMA E URINA POR CL-EM/EM* 141

7.1 Manuscrito IV 143

8 CAPÍTULO 5 – *FARMACOCINÉTICA DA LISDEXANFETAMINA E ANFETAMINA EM FLUIDO ORAL, PLASMA E URINA APÓS ADMINISTRAÇÃO CONTROLADA DE LISDEXANFETAMINA* 165
8.1 Manuscrito V 167
9 DISCUSSÃO GERAL 189
10 CONCLUSÕES 199
REFERÊNCIAS 203
ANEXOS 221
10.1 ANEXO I: Documento de aprovação ética e metodológica 223
10.2 ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 225

1 INTRODUÇÃO

O uso não terapêutico de medicamentos tem crescido e se tornado uma preocupação global de saúde pública. Em alguns países esse problema supera a prevalência de drogas ilegais, atrás apenas da canábis (International Narcotics Control Board, 2014). A real dimensão do problema é desconhecida devido aos reduzidos dados sobre o assunto. O uso não terapêutico de medicamentos é caracterizado pelo consumo de medicamentos de prescrição médica de forma, razões ou período diferentes do prescrito e aprovado pelas agências regulatórias ou por uma pessoa para quem a substância não foi prescrita. Ao serem utilizados de forma inapropriada, os medicamentos psicoativos podem levar a graves consequências para saúde e por isso devem ser controlados internacionalmente. Contudo, eles podem ser muito úteis no tratamento de diversas doenças e condições quando utilizados da maneira correta, melhorando a qualidade de vida dessas pessoas (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011). Como exemplo a ser abordado nessa situação podem ser citados os estimulantes derivados da anfetamina.

Os estimulantes derivados da anfetamina são utilizados há muitos anos na clínica para tratar alguns transtornos psiquiátricos devido a sua eficácia (Pliszka, 2007). A lisdexanfetamina (LDX) é o mais novo pró-fármaco da *d*-anfetamina (*d*-ANF) aprovado para o tratamento dos sintomas do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (American Psychiatric Association, 2013; Mickle *et al.*, 2006) e, nos Estados Unidos, do Transtorno da Compulsão Alimentar Periódica (TCAP) (Food and Drug Administration, 2015). Esse medicamento surgiu com a promessa de reduzido potencial de abuso com níveis de eficácia e duração de ação consistentes ao longo do dia (Krishnan e Zhang, 2008).

Apesar da importante aplicação clínica dos estimulantes tipo-anfetamínicos que estão disponíveis através de prescrição médica, eles também são amplamente abusados devido as suas características psicoativas (Cody, 2002). Assim, em toxicologia, muitas vezes é necessário diferenciar um uso terapêutico de um uso ilegal. Essa tarefa pode ser complexa e desafiadora visto que a maioria dos compostos dessa classe se biotransformam a um produto de biotransformação comum, a anfetamina (ANF), o que dificulta a interpretação de sua origem (Cody, 2002; Musshoff, 2000; Souza *et al.*, 2012). A toxicologia analítica traz ferramentas importantes para auxiliar na elucidação destes problemas, como a análise de

precursores intactos, produtos de biotransformação únicos, análises enantioméricas e estudo da proporção precursor/produto de biotransformação, aliado ao conhecimento farmacocinético. O conhecimento da farmacocinética da substância auxilia na interpretação dos resultados analíticos mostrando por quanto tempo a substância pode ser detectada em determinada matriz, bem como as concentrações biológicas que podem ser alcançadas.

A confiabilidade dos resultados analíticos é uma questão de grande importância, pois é um pré-requisito para a correta interpretação dos resultados toxicológicos. Assim, a comprovação da qualidade das medições analíticas é realizada através da validação e sua importância não deve ser subestimada, a fim de se obterem resultados inequívocos e incontestáveis (Peters e Maurer, 2002). Nesse contexto, a cromatografia líquida acoplada ao detector de massas sequencial (CL-EM/EM) é cada vez mais utilizada devido à sua versatilidade para determinações rápidas de moléculas mais polares e termolábeis em amostras biológicas, uma maior amplitude de analitos determinados em uma única injeção, simplificada preparação de amostras e eliminação do procedimento de derivatização, reduzindo o tempo e custo das análises (Maurer, 2005). A análise e interpretação corretas conduzem a um diagnóstico e tratamento adequados na clínica médica, pode ser a diferença entre uma ação punitiva e nenhuma ação no ambiente de trabalho, no trânsito e no doping, e pode ser importante na avaliação da causa da morte na área da análise *post-mortem* (Cody, 1993; Musshoff, 2000).

Diversas matrizes podem ser utilizadas na toxicologia, sendo algumas mais comumente empregadas. O fluido oral é considerado uma matriz alternativa e estudos mostram que esse tem sido um bom substituto para o sangue em monitorização terapêutica, estudos farmacocinéticos, avaliação de adesão ao tratamento, bem como a detecção de abuso drogas e uso indevido de medicamentos. Ainda, por possuir um método de coleta considerado pouco invasivo, facilita a coleta de amostras, principalmente na população pediátrica (Marchei *et al.*, 2010). Como o fluido oral possui um pH ligeiramente mais ácido do que o sangue e os derivados da ANF tem características de bases fracas, essas moléculas acabam se concentrando no fluido oral, tornando-o uma boa matriz para análise dessa classe.

Não foram encontradas publicações sobre métodos validados para a detecção da LDX em fluido oral e os métodos para plasma, apesar de utilizados em diversos artigos (Biederman, Boellner, *et al.*, 2007; Boellner *et al.*, 2010; Ermer *et al.*, 2011, 2012; Ermer, Corcoran e Martin, 2015; Ermer, Haffey, Mary B, *et al.*, 2013; Ermer, Haffey, Mary B., *et al.*, 2013; Jasinski e Krishnan, 2009a; Krishnan, Pennick e Stark, 2008; Krishnan e Stark, 2008; Krishnan e Zhang, 2008; Pennick, 2010, 2013; Roesch *et al.*, 2013; Rowley *et al.*, 2012), não trazem informações suficientes sobre as condições cromatográficas e de detecção de massas. Dentre a literatura consultada, os artigos de Boellner e colaboradores e de Ermer e colaboradores (Ermer, Corcoran e Martin, 2015) são os que trazem mais informações acerca do método para plasma e somente o trabalho de Thevis e colaboradores (Thevis *et al.*, 2014) descreve um método para identificação da LDX e do sulfato de 4-hidroxianfetamina, um produto de biotransformação da ANF, em urina para o controle de dopagem esportiva. Quanto aos dados da literatura em relação à farmacocinética da LDX, existem diversos artigos em plasma de pacientes pediátricos e adultos. Entretanto, estes dados plasmáticos foram analisados apenas de maneira não-compartimental. Além disso, não havia dados farmacocinéticos na literatura para outras matrizes biológicas como urina e fluido oral. Neste contexto, este estudo objetivou desenvolver e validar métodos bioanalíticos para quantificação da LDX e de seu produto de biotransformação, ANF, em fluido oral, urina e plasma por CL-EM/EM, bem como estabelecer o perfil farmacocinético preliminar nas matrizes citadas, visto a importância que esse medicamento esta assumindo na saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos bioanalíticos para a análise simultânea de LDX e seu principal produto de biotransformação ANF em matrizes biológicas humanas utilizando a CL-EM/EM e estabelecer os seus perfis farmacocinéticos preliminares.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar e otimizar o pré-tratamento necessário para extrair os analitos das amostras de fluido oral, plasma e urina;
- Desenvolver e validar um método rápido e sensível para a identificação e quantificação de LDX e ANF nas matrizes fluido oral, plasma e urina utilizando a CL-EM/EM;
- Avaliar a estabilidade do fármaco nas três matrizes de estudo;
- Determinar a farmacocinética preliminar da LDX nas matrizes biológicas fluido oral, plasma e urina após administração oral;
- Determinar a farmacocinética da *d*-ANF formada após administração oral da LDX nas matrizes biológicas fluido oral, plasma e urina;
- Verificar se a LDX pode ser detectada em fluido oral;
- Verificar se há correlação entre as matrizes biológicas plasma e fluido oral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)

O TDAH é caracterizado por um padrão de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade, mais severo e frequente do que o observado em indivíduos de mesmo nível de desenvolvimento, que interfere com o funcionamento ou desenvolvimento e pode ser classificado como predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo ou combinado – que possui tanto sintomas de desatenção como de hiperatividade/impulsividade (American Psychiatric Association, 2013). A desatenção se manifesta comportamentalmente como falta de persistência, dificuldade em manter o foco e desorganização. Hiperatividade refere-se à atividade motora excessiva quando não é apropriado ou inquietação ou fala excessiva. Impulsividade refere-se a ações precipitadas que ocorrem no momento, sem premeditação e que têm alto potencial de dano ao indivíduo (por exemplo, correndo para a rua sem olhar). A impulsividade pode refletir um desejo de recompensas imediatas ou uma incapacidade de adiar a gratificação. Comportamentos impulsivos podem se manifestar como intromissão social (por exemplo, interromper os outros excessivamente) e/ou como tomar decisões importantes sem considerar as consequências em longo prazo (American Psychiatric Association, 2013). O TDAH está presente em aproximadamente 5% das crianças e 2,5% dos adultos, sendo mais frequente em homens do que mulheres (American Psychiatric Association, 2013). Ao ser diagnosticado em crianças, esse transtorno pode persistir durante a adolescência e a vida adulta (Barkley *et al.*, 2002).

O TDAH possui uma apresentação clínica complexa devido à heterogeneidade dos sintomas (Spencer, 2009) e estes devem estar presentes em mais de um ambiente, por exemplo, casa e escola ou casa e trabalho (American Psychiatric Association, 2013). Os sintomas diferem de acordo com a maturidade, em pré-escolares, crianças e adolescentes em idade escolar, e adultos, o que pode complicar o diagnóstico dessa condição, assim como as comorbidades (Vierhile, Robb e Ryan-Krause, 2009). Tanto adultos quanto crianças com TDAH têm os mesmos sintomas principais de desatenção, impulsividade e hiperatividade. No entanto, os sinais indicativos podem ser diferentes (Tabela 1) considerando que as manifestações do TDAH dependem da fase de desenvolvimento e do contexto do estilo de vida (Johnson *et al.*, 2011).

Tabela 1: Sintomatologia em crianças x adultos.

Crianças	Adultos
Contorcimento, remeximento	Precisa se movimentar
Dificuldade de ficar sentado	Dificuldade de sentar durante refeições/reuniões
Não consegue esperar a vez	Impaciente
Corre/sobe nas coisas excessivamente	Dirige muito rápido
Não consegue brincar tranquilamente	Prefere trabalhos mais ativos
Parecem “movimentadas por motor”	Baixa tolerância à frustração
Fala excessivamente	Fala excessivamente
Dá respostas abruptamente e impulsivamente	Faz comentários inapropriados
Intromete-se/interrompe os outros	Interrompe os outros

FONTE: Adaptado de Johnson *et al.* (2011).

Alguns sintomas não são específicos para o TDAH, mas estão frequentemente associados, como atrasos leves em linguagem, desenvolvimento motor ou social, baixa tolerância à frustração, irritabilidade, instabilidade do humor, desempenho acadêmico ou de trabalho prejudicado. Ao início da idade adulta, o TDAH está associado a um aumento do risco de tentativa de suicídio, principalmente quando associado a uma comorbidade, como transtornos de humor, conduta ou por uso de substâncias (American Psychiatric Association, 2013). Ainda, na idade adulta pode causar redução da produtividade no trabalho com impacto nos custos dos empregadores (Goodman, 2010).

O diagnóstico é feito utilizando, em geral, os critérios descritos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* - DSM), tanto na prática clínica diária quanto para inclusão de pacientes em pesquisas clínicas. O acompanhamento do tratamento geralmente é feito da mesma forma, porém há evidências de que estes critérios devem ser complementados por outras medidas de resposta terapêutica, principalmente em adultos (Brown *et al.*, 2011; Martin, P. T. *et al.*, 2014).

3.1.1 Etiologia do TDAH

As causas do TDAH ainda não estão totalmente elucidadas. Estudos mostram que o córtex pré-frontal do cérebro desempenha um papel crucial na regulação da

atenção, do comportamento e da emoção. O córtex pré-frontal requer um nível adequado de norepinefrina e dopamina para a execução de suas funções regulatórias. A norepinefrina influencia o córtex pré-frontal estimulando os receptores alfa-2A melhorando sua função através do fortalecimento (aumento dos "sinais") de conexões adequadas relacionadas à atenção, comportamento e emoção. A dopamina estimula os receptores D1 exercendo seus efeitos benéficos ao enfraquecer (diminuição do "ruído") conexões inadequadas relacionadas à triagem do que é irrelevante para as demandas da tarefa do momento. Quantidade insuficientes de catecolaminas estão associadas com cansaço e TDAH e o excesso está relacionado com estresse ou doses muito altas de estimulantes. Assim, doses terapêuticas de estimulantes ou outros medicamentos utilizados no tratamento do TDAH normalizam os níveis de catecolaminas fazendo o córtex pré-frontal funcionar de forma adequada (Arnsten, 2009).

Ainda, características neuroanatômicas estão envolvidas. Há evidências de uma maturação pré-frontal mais lenta em alguns pacientes com TDAH e de uma diminuição de outras regiões do cérebro ligadas ao córtex pré-frontal, tais como o núcleo caudado e o cerebelo, em alguns estudos de crianças com TDAH. Além disso, estudos de imagem em adultos com sintomas do TDAH mostram evidências de função diminuída do córtex pré-frontal e de volume reduzido do córtex pré-frontal direito, e de rupturas na substância branca pré-frontal em ambos os pais e seus filhos quando todos com TDAH, sendo que esse último suporta a ideia deste transtorno ser hereditário (Arnsten, 2009). Nessa mesma linha, 20 estudos com gêmeos estimaram a herdabilidade do TDAH em 76% (Faraone *et al.*, 2005). A contribuição genética para o TDAH é complexa e pode decorrer de vários genes de pequeno risco, como é comum em doenças psiquiátricas (Arnsten, 2009; Faraone *et al.*, 2005). Estudos ecogenéticos de interações gene-gene e interações gene-ambiente são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais os genes de risco interagem uns com os outros e com fatores não genéticos para produzir o fenótipo comportamental do TDAH (Faraone *et al.*, 2005).

3.1.2 Comorbidades

Os indivíduos com TDAH possuem um maior risco de comorbidades psiquiátricas, o que pode dificultar o diagnóstico diferencial e alterar a resposta aos tratamentos do TDAH. O tratamento do TDAH geralmente vai melhorar os principais sintomas do TDAH, mas terá apenas modesto, se algum, efeito na comorbidade. Assim, ambos os transtornos devem ser apropriadamente diagnosticados e tratados. Indivíduos diferentes podem requerer tratamentos ou combinações de tratamentos diferentes, assim como o mesmo indivíduo pode precisar modificar seu tratamento com o tempo. O diagnóstico e tratamento precoces podem prevenir o agravamento dos prejuízos funcionais e maus resultados em longo prazo associados com esses transtornos (Spencer, 2009). Uma das comorbidades psiquiátricas que pode estar presente em pacientes com TDAH são as desordens do uso de substâncias como o abuso e dependência de álcool e drogas (American Psychiatric Association, 2013; Spencer, 2009)

3.1.3 TDAH e o trânsito

O TDAH pode interferir com a competência para dirigir, predispondo a maiores riscos e prejuízos relacionados à condução de veículos (Barkley e Cox, 2007), tais como a maior frequência de acidentes de trânsito e infrações entre motoristas com o transtorno (American Psychiatric Association, 2013). O tratamento eficaz com medicamentos estimulantes pode minimizar os riscos e melhorar o desempenho na condução de veículos (Barkley e Cox, 2007).

3.1.4 Impacto econômico

A alta prevalência e efeitos, às vezes, vitalícios resultam em um significante impacto econômico relacionado ao TDAH. Uma meta-análise avaliando os custos do TDAH relacionadas com a saúde, a educação, a perda de trabalho dos pais e justiça juvenil estimou o custo anual do TDAH em $14.576 (valor do dólar relativo a 2005) por indivíduo. Considerando uma taxa de prevalência de 5%, o custo total anual estimado do transtorno em crianças e adolescentes foi de $42,5 bilhões (Vierhile, Robb e Ryan-Krause, 2009).

Resultados relativos a custos médicos indicam consistentemente que crianças e adultos com TDAH têm gastos anuais mais elevados por indivíduo em comparação com controles pareados ou não, cerca de $1500 a mais para crianças e aproximadamente $3000 a mais para adultos com TDAH (Vierhile, Robb e Ryan-Krause, 2009).

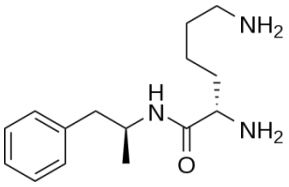
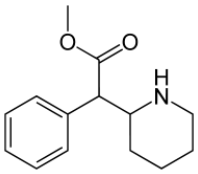
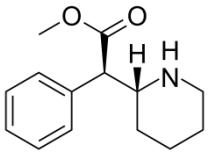
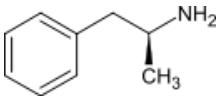
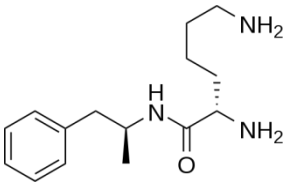
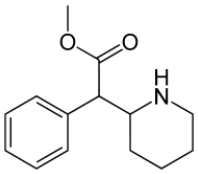
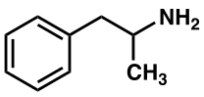
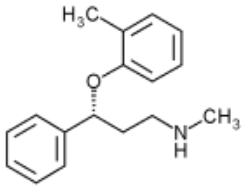
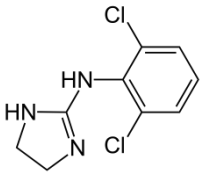
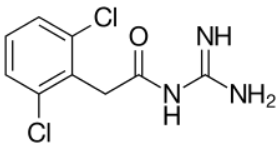
Ainda, a perda total de produtividade de trabalho associados com o TDAH foi estimado entre $67 bilhões e $116 bilhões (Vierhile, Robb e Ryan-Krause, 2009).

3.1.5 Tratamento dos sintomas

Um grande estudo sistemático incluindo 579 crianças com TDAH do tipo combinado com idade entre 7 a 9,9 anos avaliou o papel das intervenções comportamentais e/ou medicação no tratamento do TDAH durante 14 meses. Os resultados mostraram que os grupos da medicação e da medicação mais intervenção comportamental apresentaram as maiores reduções nos sintomas do TDAH comparado ao tratamento comportamental sozinho e ao controle (MTA Cooperative Group, 1999). Cerca de 80% das crianças que precisam de medicação para TDAH continuam a necessitar quando adolescentes, e mais de 50% continuará a necessitar quando adultos (Vierhile, Robb e Ryan-Krause, 2009). Mudanças nos comportamentos sintomáticos, e no comprometimento que eles podem apresentar, exigem revisão contínua do tratamento medicamentoso, incluindo ajuste ou interrupção quando justificada (Cowles, 2009). Estes estudos demonstram a importância da medicação nas intervenções para o tratamento dos sintomas do TDAH.

Os sintomas do TDAH podem ser tratados com medicamentos estimulantes ou não estimulantes (Tabela 2).

Tabela 2: Medicamentos aprovados para o tratamento do TDAH no Brasil e nos Estados Unidos.

País	Estimulantes	Não estimulantes	Referência
Brasil	Lisdexanfetamina  Metilfenidato 		(Associação Brasileira do Déficit de Atenção, 2014; Brasil, 2014a)
Estados Unidos	Dexmetilfenidato  Dextroanfetamina  Lisdexanfetamina  Metilfenidato  Sais mistos de anfetamina 	Atomoxetina  Clonidina  Guanfacina 	(Wolraich *et al.*, 2011)

Estes fármacos são comercializados pelas indústrias farmacêuticas nas formas de liberação imediata ou liberação prolongada (Tabela 3), porém muitos dos medicamentos de liberação prolongada são mais caros. Algumas vezes os medicamentos de liberação imediata podem ser combinados com a administração de medicamentos de liberação prolongada (Daughton e Kratochvil, 2009).

Tabela 3: Formas farmacêuticas de liberação imediata e prolongada utilizados no tratamento dos sintomas do TDAH.

Mecanismo de liberação	Fármaco	Nome comercial*	Observações
Liberação imediata	Anfetamina	Dexedrine	
	Anfetamina	Dextrostat	
	Atomoxetina	Strattera	
	d-Metilfenidato	Focalin	
	Metilfenidato	Ritalin	
	Metilfenidato	Methylin	
	Sais mistos de anfetamina	Adderall	
Liberação prolongada	Anfetamina	Dexedrine Spansule	Liberação imediata de dose inicial e o restante é liberado gradualmente
	d-Metilfenidato	Focalin XR	50% liberação imediata e 50% 4 horas mais tarde
	Clonidina	Kapvay	
	Guanfacina	Intuniv	Liberação gradual a partir da matriz
	Lisdexanfetamina	Vyvanse	Pró-fármaco da ANF, a quebra da molécula no organismo libera a molécula ativa ANF e o aminoácido lisina
	Metilfenidato	Concerta	Sistema OROS bomba osmótica, 18% liberação imediata (revestimento exterior) e 82% liberados gradualmente osmoticamente; concebidos para mimetizar liberação imediata de 3 vezes ao dia

Mecanismo de liberação	Fármaco	Nome comercial*	Observações
	Metilfenidato	Daytrana	Adesivo que libera gradualmente metilfenidato, utilizado por até 9 horas por dia
	Metilfenidato	Metadate CD	30% liberação imediata e 70% 3 horas mais tarde
	Metilfenidato	Metadate ER	Liberação gradual a partir da matriz cera
	Metilfenidato	Methylin ER	Liberação gradual a partir da matriz cera
	Metilfenidato	Ritalin LA	50% liberação imediata e 50% 4 horas mais tarde
	Metilfenidato	Ritalin SR	Liberação gradual a partir da matriz cera
	Sais mistos de anfetamina	Adderall XR	50% liberação imediata e 50% 4 horas mais tarde

FONTE: Daughton e Kratochvil (2009), Findling (2008) e Kaplan e Newcorn (2011).
* Nome comercial dos Estados Unidos visto que há fármacos e formas farmacêuticas não comercializados no Brasil.

Os tratamentos farmacológicos de sucesso para o TDAH, estimulantes ou não estimulantes em doses terapêuticas, imitam ou aumentam os efeitos benéficos das catecolaminas na função do córtex pré-frontal, regulando a atenção e comportamento e, assim, reduzindo os sintomas do TDAH. Assim, esses agentes normalizariam a transmissão de catecolaminas em pacientes com anormalidades genéticas nessas vias (Arnsten, 2009). Ainda, essa ação sobre os neurotransmissores também é responsável pelos efeitos adversos e pelo potencial para o abuso e uso indevido devendo haver um equilíbrio entre a maximização da eficácia terapêutica e a manutenção dos efeitos adversos a um nível aceitável (Rowley *et al.*, 2012).

3.1.5.1 Medicamentos estimulantes

Os estimulantes têm sido utilizados há mais de 70 anos para tratar os sintomas do TDAH (Bradley, 1937) e são considerados primeira escolha de tratamento (American Academy of Pediatrics, 2001; Goodman, 2010). A eficácia

destes medicamentos é bem estabelecida e a segurança é geralmente considerada favorável, porém para alguns indivíduos eles podem não ser adequados devido à falta ou parcialidade de resposta, efeitos adversos intoleráveis, contraindicações médicas, potencial para abuso e comorbidades (Wigal, Sharon B, 2009; Wigal, Sharon B., 2009). Algumas características são importantes considerando a terapêutica com estes medicamentos, como sistemas de liberação de medicamento adequados, a duração de ação adequada e reduzido potencial para o abuso (Biederman, Boellner, *et al.*, 2007).

Estudos mostram que aproximadamente 65 a 75% de crianças e adultos tratados com medicamentos estimulantes respondem ao tratamento (Pliszka, 2007). Ainda, resultados de uma meta-análise de ensaios clínicos de medicamentos para TDAH indica que, em geral, medicamentos estimulantes são superiores aos medicamentos não estimulantes para o tratamento destes pacientes (Faraone e Glatt, 2010).

O principal mecanismo de ação farmacológico dos estimulantes ANF e metilfenidato é a liberação pré-sináptica de catecolaminas dos seus locais de armazenamento nas terminações nervosas (Goodman & Gilman, 2005).

3.1.5.2 Medicamentos não estimulantes

Os medicamentos não estimulantes são especialmente úteis no tratamento dos sintomas do TDAH em pacientes que não podem utilizar estimulantes devido aos efeitos adversos, comportamentos involuntários e repetitivos (tiques), impulsos agressivos e propensão ao abuso de drogas (Arnsten, 2009). Porém, estudos demonstram que eles podem ser menos efetivos do que os estimulantes (Wigal *et al.*, 2005).

A atomoxetina bloqueia seletivamente os transportadores de norepinefrina, aumentando os níveis de norepinefrina e dopamina, pois como já citado previamente os transportadores de norepinefrina atuam também na recaptação de dopamina no córtex pré-frontal (Arnsten, 2009). A atomoxetina tem a vantagem de não ser controlada e ter um menor potencial de abuso, porém seu efeito parece ser menor comparado aos estimulantes. Em geral, esse fármaco é considerado quando os estimulantes não foram efetivos ou não foram bem tolerados, ou ainda, quando há

um histórico de abuso de substâncias ou dependência (Daughton e Kratochvil, 2009).

A guanfacina age diretamente nos receptores alfa-2A pós-sinápticos no córtex pré-frontal, onde mimetiza o efeito benéfico da norepinefrina e regula a atenção e o comportamento (Arnsten, 2009). Pode ser utilizada juntamente com os estimulantes. Também cuidados relativos ao seu efeito hipotensor devem ser tomados (Kaplan e Newcorn, 2011).

A clonidina também age nos receptores alfa-2A pós-sinápticos de forma menos específica que a guanfacina. Tem um início de efeito muito rápido que pode ser útil em situações de emergências, porém tem efeitos sedativo e hipotensivo significantes (Arnsten, 2009; Kaplan e Newcorn, 2011).

Os medicamentos antidepressivos como a imipramina, desipramina e bupropiona são algumas vezes utilizados na clínica para o tratamento dos sintomas do TDAH, porém não são aprovados para esse fim ainda que alguns estudos mostrem sua aplicabilidade. O modafinil possui eficácia para o TDAH, todavia sua aprovação foi negada devido à possibilidade de desenvolvimento da síndrome de Stevens-Johnson (Kaplan e Newcorn, 2011), reação de hipersensibilidade tardia caracterizada por reações graves na pele e membranas mucosas com elevado potencial para morbidade e mortalidade (Bulisani *et al.*, 2006).

Pesquisas continuam sendo feitas com o intuito de encontrar novos medicamentos que possam ser utilizados como tratamentos alternativos para o TDAH com maior segurança e tolerabilidade. Podem ser citados como exemplos o Org 25676, um novo modulador alostérico do receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiônico (AMPA), que visa regular a neurotransmissão de glutamato (Adler *et al.*, 2012) e o ABT-089, um novo agonista parcial do receptor nicotínico neuronal α(4)β(2) (Apostol *et al.*, 2012; Bain *et al.*, 2012; Wilens *et al.*, 2011).

3.2 Transtorno da Compulsão Alimentar Periódica (TCAP)

O TCAP é caracterizado por episódios de compulsão alimentar, ocorrendo pelo menos uma vez por semana durante três meses, acompanhados por uma sensação de falta de controle e sem comportamentos compensatórios regulares. A

compulsão alimentar é definida como comer uma quantidade de alimentos definitivamente maior do que a maioria das pessoas consumiria em um período de tempo semelhante em circunstâncias semelhantes (American Psychiatric Association, 2013). A primeira descrição do TCAP data de 1959 e somente em 2013 houve sua inclusão no DSM (Citrome, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência mundial deste transtorno está entre 0,2 e 4,7%, sendo o Brasil o país com o maior índice (Kessler *et al.*, 2013).

Comer em excesso patologicamente pode estar relacionado com disfunções da dopamina e norepinefrina, como evidenciado por achados genéticos e farmacológicos e modelos animais (Mcelroy *et al.*, 2015). Os tratamentos psicológicos são considerados como primeira linha no manejo do TCAP e até então não houve nenhum medicamento aprovado para ser utilizado como tratamento farmacológico (Citrome, 2015). Diversos medicamentos são discutidos neste contexto, porém não necessariamente melhoram os sintomas ou outros efeitos superam o benefício (Citrome, 2015; McElroy *et al.*, 2015).

Os inibidores de apetite do tipo anfetamínico femproporex (que se biotransforma à ANF) e anfepramona eram comercializados no Brasil (SOUZA et al., 2012) até 2011, quando seus registros foram cancelados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) devido a incertezas relacionadas à eficácia e segurança (Brasil, 2011a; b). Nesta mesma resolução outro inibidor do apetite, o mazindol sofreu as mesmas sanções, assim deixando no Brasil apenas uma alternativa - e mais controlada - para ser utilizada como adjunto no tratamento da obesidade, a sibutramina (Brasil, 2011b). Em 2014, a agência voltou atrás na decisão e aprovou um novo regulamento técnico referente aos anorexígenos no País. A nova resolução prevê que as empresas interessadas em comercializar medicamentos contendo mazindol, femproporex e anfepramona deverão requerer novo registro, devendo comprovar a eficácia e a segurança dos produtos (Brasil, 2014b). Todavia, até o presente momento as empresas que comercializavam estes medicamentos não estão investindo em um novo registro, provavelmente devido aos custos necessários para realização de ensaios clínicos. Nos Estados Unidos e Europa estes medicamentos nunca foram registrados ou tiveram seu registro cancelado há anos (Brasil, 2011a).

Assim, durante as mudanças constantes na legislação brasileira e a incerteza do futuro, a LDX, já utilizada no tratamento dos sintomas do TDAH em diversos países, foi aprovada para o TCAP nos Estados Unidos. Este transtorno não contava com nenhum medicamento aprovado para o seu tratamento. Não se deve confundir esta aprovação com a utilização para perda de peso, a qual não é aprovada nem recomendada, pois não há estudos de eficácia referentes a esta utilização (Food and Drug Administration, 2015).

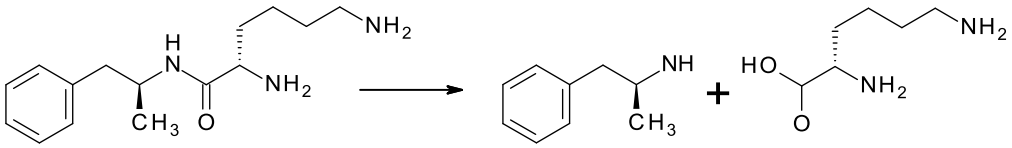
3.3 Lisdexanfetamina (LDX)

Os estimulantes tipo-anfetamínicos são aminas simpatomiméticas com potente atividade estimulante do SNC, apresentando marcada influência sobre as atividades psíquicas e psicomotoras, alto potencial de abuso, propiciando o desenvolvimento de dependência, tolerância e ocorrência de toxicidade que podem se manifestar por alterações cardiovasculares, neurológicas, hepáticas, renais e psiquiátricas (Carvalho *et al.*, 2012; Leyton *et al.*, 2002; Rang *et al.*, 2012).

O dimesilato de LDX é um medicamento estimulante do sistema nervoso central, indicado para o tratamento dos sintomas do TDAH e, recentemente aprovado pelo FDA para o tratamento do TCAP (Food and Drug Administration, 2015; Mickle *et al.*, 2006). A LDX é um pró-fármaco que é clivado no organismo à molécula terapeuticamente ativa *d*-ANF e o aminoácido *l*-lisina (Figura 1) (Mickle *et al.*, 2006). As doses de LDX de 30, 50 e 70 mg são convertidas em 8,9, 14,8 e 20,8 mg de *d*-ANF e 9,6, 16,1 e 22,5 mg de *l*-lisina, respectivamente. Por conseguinte, essas dosagens foram desenvolvidas para fornecer ANF aproximadamente equivalente aos sais mistos de ANF de 10, 20 e 30 mg, respectivamente (Biederman, Krishnan, *et al.*, 2007; Boellner *et al.*, 2010).

Não há *d*-ANF livre nas cápsulas de LDX, desta maneira a manipulação mecânica como esmagamento ou simples extração não disponibiliza a *d*-ANF, que só é obtida a partir da LDX por um processo bioquímico enzimático (Jasinski e Krishnan, 2009b).

Figura 1: Hidrólise enzimática da LDX em *d*-ANF e *l*-lisina.



LISDEXANFETAMINA *d*-ANFETAMINA *l*-LISINA

Fonte: Adaptado de Krishnan e Zhang (2008) e Mickle *et al.* (2006).

A Tabela 4 mostra a identificação da molécula, bem como suas propriedades químicas.

Tabela 4: Identificação e propriedades químicas da LDX.

Propriedade	LDX	Referência
Denominação comum internacional (DCI)	Lisdexamfetamine	(World Health Organization, 2014)
Outros nomes	Lisdexanfetamina Lisdexamfetamine Lisdexamphetamine *L*-lysine-*d*-amphetamine NRP104	(World Health Organization, 2014)
Número de registro no *Chemical Abstract Service* (CAS)		(Krishnan e Moncrief, 2007; World Health Organization, 2014)
Base livre	608137-32-2	
Dimesilato	608137-33-3	
Nomes comerciais		(World Health Organization, 2014)
Dinamarca, Reino Unido, Suécia	Elvanse®	
Irlanda	Tyvense®	
Brasil	Venvanse®	
Estados Unidos, Canadá	Vyvanse®	
Designação química		(World Health Organization, 2014)
IUPAC	(2S)-2,6-diamino-N-[(2S)-1-phenylpropan-2-yl]hexanamide (2S)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-methyl-2-phenylethyl]hexanamidedimethanesulfonate	
CA index	(2S)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-phenylpropan-2-yl]hexanamide	

Propriedade	LDX	Referência
Propriedades físicas	Pó branco a esbranquiçado	(World Health Organization, 2014)
Peso molecular		
Base livre	263,3785 g/mol	(National Center for Biotechnology Information, 2014)
Dimesilato	455,59 g/mol	(Krishnan e Moncrief, 2007)
Massa exata		
Base livre	263,199762 g/mol	(National Center for Biotechnology Information, 2014)
Solubilidade	Maior que 0,85 g/mL em água, no intervalo de pH fisiologicamente relevante de 1-8	(Pennick, 2010)
Log P	1,75	(Pennick, 2010)
Molecular Formula		
Base livre	$C_{15}H_{25}N_3O$	(World Health Organization, 2014)
Dimesilato	$C_{15}H_{25}N_3O \bullet (CH_4O_3S)_2$	
Ponto de fusão*	120-122°C	(World Health Organization, 2014)
Ponto de ebulição*	488,015°C a 760 mmHg	(World Health Organization, 2014)
Ponto de ignição*	248,943°C	(World Health Organization, 2014)
Temperatura de armazenamento	25°C (15-30°C)	(World Health Organization, 2014)
Recipiente de armazenamento	Bem fechado e resistente à luz	(World Health Organization, 2014)

*Base livre

3.3.1 Farmacodinâmica

Apesar de ser utilizada há muitos anos na clínica, o mecanismo de ação pelo qual a *d*-ANF age aliviando os sintomas do TDAH não está totalmente elucidado. No entanto, a inibição da recaptação da dopamina e norepinefrina e liberação dessas monoaminas para o espaço extraneuronal parecem estar envolvidas (Heal, Cheetham e Smith, 2009). Estas disfunções da dopamina e norepinefrina também parecem estar presentes na alimentação compulsiva do TCAP (Mcelroy *et al.*, 2015).

Estudos *in vivo* em cérebros de ratos revelam que os psicoestimulantes aumentam o efluxo e a função da norepinefrina e dopamina no sistema nervoso central. O aumento do efluxo de dopamina que eles produzem não se limita às regiões corticais e não há efeito máximo com o aumento das doses. Consequentemente, a soma destas atividades *in vivo* faz com que haja aumento da disponibilidade de catecolaminas no espaço extraneuronal. No entanto, estes efeitos catecolaminérgicos poderosos também fazem os psicoestimulantes responsáveis por abusos e, visto que eficácia e segurança derivam dos mesmos mecanismos farmacológicos, ainda não foi possível separar estas duas componentes. A *d*-ANF tem um mecanismo independente da taxa de disparo neuronal, deslocando reservas intraneuronais de catecolaminas, retardando sua recaptação e inibindo o catabolismo pela monoamina oxidase (Heal, Cheetham e Smith, 2009).

Apesar das diferenças farmacodinâmicas entre os medicamentos utilizados para o TDAH (Tabela 5), o início rápido de efeito juntamente com magnitude e duração do aumento das concentrações extracelulares de noradrenalina e dopamina no córtex pré-frontal e regiões sub-corticais parece se correlacionar bem com a eficácia clínica destes medicamentos (Heal, Cheetham e Smith, 2009; Rowley *et al.*, 2012).

Tabela 5: Comparação de mecanismos farmacológicos de alguns medicamentos para TDAH.

	ANF	**Metilfenidato**	**Atomoxetina**
In vitro			
Substrato NET	sim	não	não
Substrato DAT	sim	não	não
Sítio de ação neuronal	intraneuronal	extraneuronal	extraneuronal
Inibição da MAO	sim	?	não
In vivo			
Neurotransmissor alvo	noradrenalina dopamina serotonina	noradrenalina dopamina histamina*	noradrenalina dopamina* histamina*
Sítio de ação	intraneuronal extraneuronal	extraneuronal	extraneuronal
Mecanismo farmacológico	Liberação Atraso na depuração da recaptação das monoaminas devido à competição de substrato Inibição da MAO	Inibição da recaptação	Inibição da recaptação

	ANF	Metilfenidato	Atomoxetina
Dependência da taxa de disparo neuronal	não	sim	sim
Efeito máximo			
Início	rápido	rápido	moderado
Intensidade**	500-1000% >1000% (doses supraterapêuticas)	500-1000%	<500%
Sustentação	não	sim	sim
Existência de efeito máximo com o aumento de dose	não	não	sim
Eficácia clínica	≈70%	≈70%	51-60%

FONTE: Adaptado de Heal, Cheetham e Smith (2009).
MAO = monoamino oxidase; NET = transportador da recaptação de noradrenalina; DAT = transportador da recaptação de dopamina.
* Efeitos indiretos
** Intensidade de efeito nas concentrações extracelulares de dopamina e noradrenalina em experimentos de microdiálise.

Diferentemente do seu produto, o pró-fármaco LDX não se liga aos sítios responsáveis pela recaptação de noradrenalina e dopamina *in vitro* (Shire, 2015a). A LDX é inativa *in vitro*, isto é, possui inibição menor que 50% a uma concentração de 10 μM, em um grande número de receptores, transportadores, proteínas-G, canais iônicos, enzimas, esteroides, prostaglandinas, fatores de crescimento/hormônios e peptídeos cerebrais e intestinais testados (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

O pró-fármaco não atravessa a barreira hematoencefálica devido as suas características e não possui outros produtos de biotransformação próprios. Assim, assume-se que a farmacodinâmica *in vivo* da LDX coincida a de seu produto ativo *d*-ANF com algumas diferenças qualitativas e quantitativas devidas a etapa de conversão enzimática (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

Em ratos, experimentos de farmacocinética/farmacodinâmica utilizando microdiálise intracerebral tentaram elucidar alguns mecanismos através da coleta do dialisado simultaneamente ao monitoramento da atividade locomotora. Foi demonstrado que no tempo para atingir a concentração máxima (t_{max}) plasmática da LDX não houve aumento no efluxo de dopamina no estriado ou de atividade locomotora confirmando a sua inatividade farmacológica. Todavia, o aumento da dopamina no estriado e da atividade locomotora correlacionam com a concentração plasmática do seu produto de biotransformação *d*-ANF demonstrando, como

esperado, que as ações do pró-fármaco são mediadas exclusivamente através do seu produto farmacologicamente ativo (Rowley *et al.*, 2012). Estes experimentos de microdiálise revelaram ainda que a LDX aumenta as concentrações de dopamina no corpo estriado, de forma dose-dependente, e de dopamina e noradrenalina no córtex pré-frontal, de forma mais eficaz, comparada a ANF, metilfenidato e modafinil (Rowley *et al.*, 2012, 2014). Embora esse perfil seja consistente com a LDX produzir os seus efeitos farmacológicos através da *d*-ANF, foram observadas diferenças claras entre a LDX e as formulações de liberação imediata de *d*-ANF e metilfenidato, como a sua capacidade para produzir aumento considerável e sustentado da neurotransmissão catecolaminérgica ao mesmo tempo em que produz baixa ativação comportamental (Heal *et al.*, 2013; Rowley *et al.*, 2012, 2014). Foram observadas correlações lineares entre o efluxo de dopamina no estriado e a atividade locomotora para a LDX e metilfenidato. Apenas a LDX aumentou a 5-hidroxitriptamina no córtex pré-frontal e no estriado, e visto que esse neurotransmissor possui ação inibitória sobre comportamentos dopaminérgicos, esse efeito também pode ter contribuído para o nível relativamente baixo de ativação locomotora que resultou do aumento do efluxo de dopamina no estriado. O perfil monoaminérgico da LDX foi o único a não variar com a dose e produziu aumentos muito maiores na neurotransmissão dopaminérgica do estriado comparada ao metilfenidato e modafinil, mas, paradoxalmente, foi menos estimulante do que ambos. Deste modo, a menor dose de LDX, não-estimulante, produziu um aumento nos níveis de dopamina no estriado equivalente à produzida pela dose mais elevada de metilfenidato que é extremamente estimulante. As concentrações extracelulares dos ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, homovanílico e 5-hidroxindolacético também foram avaliadas. Não houve alteração das concentrações destes ácidos no córtex pré-frontal, no entanto no estriado as reduções dos ácidos 3,4-dihidroxifenilacético e homovanílico sugerem reduções simultâneas na renovação da dopamina e/ou na atividade neuronal dopaminérgica (Rowley *et al.*, 2014).

Outra diferença da LDX observada nestes experimentos pré-clínicos em ratos em relação a outros fármacos a base de *d*-ANF convencionais é a manutenção da eficácia terapêutica quando a concentração plasmática de *d*-ANF está diminuindo enquanto os outros exigem o aumento dos níveis plasmáticos para manter a eficácia. Essa histerese de sentido anti-horário, tanto da liberação de

neurotransmissor *versus* concentração plasmática quanto do resultado funcional *versus* concentração plasmática, é consistente com a *d*-ANF necessitar atravessar a barreira hematoencefálica e entrar nos terminais nervosos do estriado, antes que possa liberar a dopamina para produzir o efeito (Rowley *et al.*, 2012). A histerese de sentido anti-horário do resultado funcional *versus* concentração plasmática foi corroborado por um estudo pré-clínico em macacos *Rhesus* (Banks *et al.*, 2015). Já a histerese considerando o mediador neuroquímico *versus* resultado funcional, foi sentido anti-horário para a LDX, mas sentido horário para *d*-ANF de liberação imediata. Isso mostra que a LDX produz uma ativação comportamental menos pronunciada conforme a concentração de dopamina aumenta, mas a atividade é mantida por mais tempo quando ela diminui. Os resultados destes estudos em ratos sugerem que a LDX possa ter uma janela terapêutica maior entre a eficácia e os efeitos adversos psicoestimulantes do que os fármacos estimulantes de liberação imediata utilizados no TDAH (Rowley *et al.*, 2012).

3.3.2 Características e outros estudos sobre a LDX

Dentre as características que podem ser vinculadas a utilização deste medicamento estão a dose única diária melhorando a adesão ao tratamento, baixa variabilidade farmacocinética intra e interpaciente, baixo risco de interações com fármacos e alimentos mediados por pH, reduzido risco de diminuição da biodisponibilidade da molécula ativa por mudanças no transito gastrointestinal e menor possibilidade de potencial de abuso e uso recreativo (Goodman, 2010). Ainda, para as crianças que não conseguem engolir comprimidos, a cápsula de LDX pode ser aberta e o conteúdo dissolvido em um copo de água para a administração (Krishnan e Zhang, 2008). Estas características são devidas ao mecanismo de liberação através de hidrólise enzimática constituindo vantagem frente as outras formulações disponíveis para o tratamento do TDAH que utilizam o mecanismo mecânico de liberação do fármaco (Goodman, 2010).

Estudos pré-clínicos de impulsividade mostram que tanto a *d*-ANF (3 mg/kg via oral) quanto a LDX (4 - 16 mg/kg via oral) diminuem a impulsividade, analisada através do aumento do número de escolhas para uma recompensa não imediata e

maior, evidenciando que a LDX melhora o domínio cognitivo no TDAH (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

O tratamento com LDX também está associado à melhora do comportamento e diminuição de riscos relacionados ao trânsito em jovens adultos com TDAH (Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey e Reimer, 2012; Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey, Baer, *et al.*, 2012).

O TDAH esta relacionado a déficits executivos que incluem a memória, a auto-regulação emocional, mudança de atenção ou foco e planejamento e solução de problemas, entre outros. Estes déficits impactam na qualidade de vida, uma percepção subjetiva de bem-estar em vários domínios funcionais da vida, incluindo físico, psicológico, cognitivo e social. Um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, multicêntrico, controlado com placebo, de grupos paralelos avaliou a qualidade de vida autorrelatada em adultos com TDAH e comprometimento clinicamente significativo da função executiva. O grupo tratado com LDX apresentou melhora autorrelatada da qualidade de vida, de funções executivas e sintomas do TDAH comparados ao placebo (Adler, L. a *et al.*, 2013). Outros estudos também constataram uma melhora da qualidade de vida relacionada à saúde em crianças, adolescentes e adultos com TDAH tratados com LDX quando comparada ao placebo (Banaschewski *et al.*, 2013, 2014; Giblin *et al.*, 2010).

O tratamento com LDX pode resultar em melhoria de alguns aspectos de desempenho em leitura, especificamente a taxa de leitura, ao controlar os sintomas de desatenção do TDAH e quando não houver outros atrasos de neurodesenvolvimento. Contudo, não há evidência direta de melhorias na precisão ou compreensão de leitura (Wigal, Maltas, *et al.*, 2012).

Diversos estudos citam outras vantagens relacionadas ao tratamento com LDX, porém, a interpretação deve ser cautelosa considerando que tem a participação e/ou foram financiados pela indústria detentora da patente da LDX. Uma avaliação dos dados de um plano de saúde comercial dos Estados Unidos comparou os medicamentos de longa duração atomoxetina, metilfenidato, dexmetilfenidato, sais mistos de ANF e LDX quanto aos custos e seguimento terapêutico em adultos. Os usuários de LDX obtiveram a maior proporção de

pacientes com o menor consumo médio diário (pílulas por dia) que foi associado aos menores custos e a utilização terapêutica mais longa no período de acompanhamento, sugerindo tanto efetividade quanto uma melhor adesão ao tratamento pelo paciente (Christensen *et al.*, 2009). Um estudo semelhante em adultos e crianças corroborou que os pacientes tratados com LDX são mais propensos a aderir ao regime de dosagem recomendada nas bulas e menos propensos a ter um consumo médio diário maior que uma unidade em comparação com outros medicamentos estimulantes de dose única diária (Setyawan, Hodgkins, Guerin, Gauthier, Cloutier, Wu, E. Q., *et al.*, 2012). Outra avaliação de medicamentos utilizados no TDAH considerando utilização e despesas foi realizada no Texas, Estados Unidos, e concluiu que embora utilizado em pacientes mais complexos, a LDX demonstrou vantagens sobre metilfenidato de liberação imediata em persistência do tratamento, ANF de liberação imediata em mudanças de tratamento, e metilfenidato e ANF de liberação prolongada em despesas de medicação (Lawson *et al.*, 2010). Ao ser comparado com atomoxetina, metilfenidato OROS®, metilfenidato/ dexmetilfenidato genérico de curta e longa duração e ANF de curta e longa duração, o tratamento com LDX foi associado com risco semelhante ou inferior de descontinuação do tratamento na maioria das comparações (Setyawan, Hodgkins, Guerin, Gauthier, Cloutier, Wu, E., *et al.*, 2012).

3.3.3 Eficácia, segurança e tolerabilidade

Diversos estudos mostram a eficácia, segurança e tolerabilidade da LDX em crianças a partir dos 6 anos, adolescentes, adultos e idosos para o tratamento dos sintomas do TDAH (Adler, L. a. *et al.*, 2013; Adler *et al.*, 2008; Adler, L. a *et al.*, 2009; Antonucci, Kunins, *et al.*, 2010; Antonucci, Manos, *et al.*, 2010; Babcock *et al.*, 2012; Biederman, Boellner, *et al.*, 2007; Biederman, Krishnan, *et al.*, 2007; Boellner *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2010; Childress *et al.*, 2014; Coghill *et al.*, 2013, 2014; Dupaul *et al.*, 2012; Ermer, Haffey, Mary B, *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2011; Krishnan e Zhang, 2008; Soutullo *et al.*, 2012; Weisler *et al.*, 2009; Wigal, S. B. *et al.*, 2010; Wigal *et al.*, 2011; Zuddas, Banaschewski, *et al.*, 2012) e em adultos para o tratamento dos sintomas do transtorno da compulsão alimentar periódica (Citrome, 2015; Mcelroy *et al.*, 2015).

O efeito da LDX geralmente persiste por 12 a 16 horas após a ingestão do medicamento, facilitando o controle dos sintomas com apenas uma administração diária, tanto em crianças quanto em adultos (Biederman, Boellner, *et al.*, 2007; Biederman, Krishnan, *et al.*, 2007; Martin, P. T. *et al.*, 2014; Wigal, S. B. *et al.*, 2010; Wigal, T. *et al.*, 2010; Zuddas, Banaschewski, *et al.*, 2012). Análises *post-hoc* sugerem que a resposta à LDX em crianças de 6 a 12 anos com TDAH é semelhante em ambos os sexos (McGough *et al.*, 2012). Em adultos, estudos clínicos mostram que a maioria dos pacientes que receberam LDX atingiram resposta clínica (redução de pontuação total da *ADHD Rating Scale IV* [ADHD-RS-IV] ≥30% e uma avaliação do *Clinical Global Impressions-Improvement* [CGI-I] de 1 ou 2) no prazo de 15 dias do início da terapia durante ensaio clínico de curto prazo. No ensaio clínico de longo prazo em adultos, o tratamento com LDX foi eficaz ao longo dos 12 meses de estudo, sendo que quase dois terços obtiveram remissão sintomática (pontuação total no ADHD-RS-IV ≤18) no período (Mattingly *et al.*, 2013; Weisler *et al.*, 2009). Ainda, a resposta parece ser numericamente maior para pacientes com maior grau de severidade inicial (Ginsberg *et al.*, 2011).

A aderência ao tratamento é muito importante, visto que os sintomas podem voltar rapidamente após a cessação do uso (Coghill *et al.*, 2014).

Em pacientes previamente tratados com metilfenidato e com resposta insatisfatória, a LDX foi comparada à atomoxetina quanto à eficácia e mostrou diferença clínica relevante, com resposta mais rápida e robusta (Dittmann *et al.*, 2013).

Os efeitos adversos (EA) resultantes da utilização da LDX são semelhantes aos da utilização de outros estimulantes comercializados e geralmente são leves ou moderados (Biederman, Boellner, *et al.*, 2007; Biederman, Krishnan, *et al.*, 2007; Boellner *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2010; Childress *et al.*, 2014; Dupaul *et al.*, 2012; Ermer *et al.*, 2010; Ermer, Haffey, Mary B, *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2011; Katic *et al.*, 2012; Krishnan, Pennick e Stark, 2008; Krishnan e Stark, 2008; Wigal, S. B. *et al.*, 2010; Wigal *et al.*, 2011; Wigal, T. *et al.*, 2010). Os EA mais relatados são anorexia, ansiedade, diminuição do apetite, diminuição de peso, diarréia, tontura, boca seca, irritabilidade, insônia, náusea, dor abdominal, vômito, aumento da frequência cardíaca, constipação e nervosismo (Shire, 2015a). A administração intranasal de LDX parece resultar em mais EA do que a administração oral, contudo deve-se

considerar que o número de indivíduos estudados nesta comparação foi baixo e alguns EA podem estar relacionados diretamente a via de administração e não ao fármaco (Ermer *et al.*, 2011). Ainda, indivíduos previamente expostos a estimulantes parecem ter eventos adversos mais brandos do que indivíduos que não possuem exposição prévia (Wigal, Wong, *et al.*, 2012). Os efeitos da LDX combinada a outros medicamentos também foi avaliada, como o omeprazol, a guanfacina, a venlafaxina e antipsicóticos (Ermer, Haffey, Mary B., *et al.*, 2013; Haffey *et al.*, 2009; Martin, P. *et al.*, 2014; Roesch *et al.*, 2013). O omeprazol, um inibidor da bomba de prótons, é comumente utilizado para desordens do trato grastrointestinal e seu uso crônico leva a diminuição da secreção ácida gástrica podendo interferir na absorção de alguns medicamentos e, por isso, foi estudado juntamente com a LDX. Não houve diferenças aparentes no perfil de segurança de LDX como monoterapia ou em combinação com omeprazol, excetuando-se o vasoespasmo que ocorreu em alguns indivíduos quando a combinação foi administrada (Haffey *et al.*, 2009). A guanfacina, um agonista α_2, foi estudado devido a sua utilização conjunta com os psicoestimulantes para o tratamento dos sintomas do TDAH. Não houve diferença nos sinais vitais e EA da combinação com relação ao uso da LDX (Roesch *et al.*, 2013). A venlafaxina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina-norepinefrina, foi avaliada devido a possível utilização da LDX para o transtorno depressivo maior. Essa combinação não modifica os EA obtidos com a administração da LDX sozinha, porém aumenta a pressão sanguínea e frequência cardíaca, sendo assim, recomendado o monitoramento (Ermer, Haffey, Mary B., *et al.*, 2013). A LDX pode ser utilizada para os sintomas negativos da esquizofrenia juntamente com os antipsicóticos segundo alguns estudos, sendo que está combinação tem EA semelhantes ao tratamento com a LDX isolada (Martin, P. *et al.*, 2014).

Uma grande preocupação relacionada aos efeitos adversos dos medicamentos estimulantes são as complicações cardiovasculares devido ao aumento da pressão sanguínea e frequência cardíaca. Sendo assim, estes medicamentos não são aconselhados para pacientes que possuem anormalidades cardíacas graves. Devido a esse fato, a LDX também foi avaliada quanto aos efeitos cardiovasculares em adultos saudáveis em curto prazo. Foram encontradas alterações no pulso e frequência cardíaca, mas não em outros parâmetros do eletrocardiograma e, diferentemente de outros estudos, na pressão sanguínea. Não

houve eventos adversos graves ou mortes. Porém, algumas medidas atípicas de efeitos cardiovasculares podem ser encontradas na clínica, assim como neste estudo, mostrando a importância do monitoramento (Adler, L. a. *et al.*, 2009).

Há relatos de que os medicamentos estimulantes possuem um efeito rebote emocional significativo, o que é difícil de avaliar considerando que coincidem no final da tarde o declínio do efeito dos estimulantes e o pico dos sintomas emocionais do TDAH. A relação entre os estimulantes e a instabilidade emocional é imprecisa e embora tenha havido relatos de piora emocional em crianças com TDAH, um ensaio clínico aberto com LDX mostrou piora dos sintomas apenas para um pequeno subgrupo de participantes, mas para a grande maioria os sintomas emocionais não foram alterados. Como as causas de instabilidade emocional são diversas, nem todos os casos de agravamento, apesar de poucos, podem ser atribuíveis ao tratamento medicamentoso do TDAH (Katic *et al.*, 2012). Ainda, um ensaio duplo-cego comparando LDX com placebo mostrou uma diminuição da instabilidade emocional principalmente nos indivíduos tratados com LDX que possuíam sintomas basais de instabilidade emocional proeminente (Childress *et al.*, 2014). Mais estudos e meios de avaliação aprimorados são necessários nessa área para melhores conclusões e comparações (Manos *et al.*, 2011).

Os distúrbios do sono podem ser uma manifestação do TDAH ou resultado de medicamentos utilizados no tratamento do TDAH, entre outros. Esses distúrbios podem contribuir para os problemas relacionados ao trânsito associados com o TDAH. Um estudo sobre o efeito da LDX *versus* placebo no sono de pacientes adultos com TDAH utilizando o questionário validado *Pittsburgh Sleep Quality Index* mostrou que a LDX melhora significativamente o funcionamento diurno. Ainda, o tratamento com LDX não foi associado a uma piora global da qualidade do sono, latência do início do sono, duração do sono, ou distúrbios do sono, apesar de haver alguns relatos de insônia (Adler, L. a *et al.*, 2009). Em crianças, um estudo piloto similar avaliou parâmetros objetivos e subjetivos do sono e sugere que a LDX parece não contribuir para quaisquer distúrbios do sono (Giblin e Strobel, 2011).

Medicamentos estimulantes podem levar a atrasos na altura e peso dos pacientes, no entanto há evidências estatisticamente significativas da atenuação destes déficits ao longo do tempo. O déficit de crescimento pode ser dose-dependente e a interrupção do tratamento pode levar a normalização do

crescimento. Mais pesquisas devem avaliar os efeitos do tratamento contínuo da infância para a idade adulta e a ideia de que o próprio TDAH pode estar associado com o crescimento desregulado (Faraone *et al.*, 2008). Um estudo clínico avaliou 281 crianças de 6 a 13 anos quanto aos efeitos do tratamento com LDX no crescimento e verificou uma redução estatisticamente significativa na altura, peso e índice de massa corporal em relação aos níveis esperados para a idade (Faraone *et al.*, 2010). Outro estudo no qual foram avaliadas 332 crianças e adolescentes também houve uma pequena perda de peso, tanto em pacientes tratados com LDX quanto com metilfenidato OROS®, porém a maioria se manteve dentro da sua categoria inicial de índice de massa corpórea (Zuddas, Coghill, *et al.*, 2012). Ambos resultados são consistentes com o efeito conhecido de estimulantes, assim o crescimento dos pacientes com TDAH tratados com LDX devem ser cuidadosamente monitorados e tomadas ações corretivas se observados atrasos de crescimento (Faraone *et al.*, 2010).

Durante um ensaio clínico de fase 3 na Europa, randomizado, duplo-cego, multicêntrico, de grupos paralelos, controlado com placebo e ativo e com otimização de dose, crianças e adolescentes com TDAH foram avaliados através dos questionários *Responses to the Brief Psychiatric Rating Scale for Children* (BPRS-C) e *Columbia-Suicide Severity Rating Scale* (C-SSRS) quanto a segurança psiquiátrica relacionada à LDX. Dos 196 pacientes avaliados, apenas 1 indivíduo tratado com metilfenidato OROS® relatou ideia suicida no BPRS-C e 2 indivíduos tratados com LDX relataram comportamento ou ideia suicida no C-SSRS, esses resultados são consistentes com os perfis de segurança já documentados desses medicamentos (Lecendreux *et al.*, 2012).

3.3.4 Toxicologia

A toxicologia da LDX foi avaliada em alguns estudos pré-clínicos. No estudo de toxicidade aguda de dose única oral de LDX em ratos foram avaliadas as doses 0,1, 1, 10, 60, 100 e 1000 mg/kg (n=6 por grupo). As doses iguais e superiores a 60 mg/kg causaram aumento da atividade motora e a dose de 1000 mg/kg causou a morte de um rato e outro foi eutanasiado. Apesar de os dados do estudo pré-clínico de doses orais únicas em ratos serem insuficientes para afirmar a correta LD_{50} para

a LDX, os resultados sugerem que ela possui um número provavelmente 5 vezes maior do que a ANF. Sendo assim, enquanto a LDX parece ter uma LD_{50} maior do que 1000 mg/kg, o que correspondente a 548 mg/kg de sulfato de *d*-ANF, a do sulfato de *d*-ANF por sua vez é de 32 mg/kg (Krishnan e Montcrief, 2007). Essa baixa toxicidade oral observada pode ser devido a particular biotransformação/farmacocinética da LDX que difere da ANF administrada diretamente.

No estudo de toxicidade de doses repetidas por 7 dias, foram avaliados 10 ratos (5 de cada sexo) em cada um dos 4 grupos: controle veículo (água deionizada) e 30, 100 e 300 mg/kg de LDX. Todos os ratos que receberam doses de LDX mostraram aumento de atividade. Houve diminuição do peso e do ganho de peso, além da diminuição do consumo de alimento proporcional ao aumento da dose de LDX. Nenhum efeito foi observado nos parâmetros de coagulação. Na dose de 100 mg/kg/dia, 1 rato moribundo foi sacrificado, e na de 300 mg/kg/dia, 8 ratos moribundos foram sacrificados, todos devido à automutilação, que foi considerada relacionada aos efeitos da LDX. Na dose de 100 mg/kg/dia, foram observados poucos sintomas clínicos como feridas e postura arqueada. Houve aumento da glicose e ureia sanguínea, da fosfatase alcalina apenas em machos, e diminuição dos triglicerídeos. Na dose de 300 mg/kg/dia a avaliação foi feitas apenas em machos, devido a morte dos ratos fêmeas. Foram observados mais sintomas e em maior prevalência, além das feridas e postura arqueada, foram observados autolimpeza excessiva, o ato de lamber as patas, o ato de levantar, fezes escassas, manchas amarelas e palidez e em menor prevalência pelos arrepiados, diminuição da atividade e frio ao toque. Com relação à hematologia, houve diminuição significativa nos reticulócitos em machos. Houve aumento da glicose, fosfatase alcalina, ureia sanguínea, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, albumina e diminuição dos triglicerídeos (Krishnan e Montcrief, 2007).

No estudo de toxicidade de doses repetidas por 28 dias, foram avaliados um total de 202 ratos (101 de cada sexo) divididos em 5 grupos: controle veículo (água deionizada) e 20, 40 e 80 mg/kg de LDX e 16 mg/kg de *d*-ANF. Apenas na dose de 80 mg/kg houve sinais de automutilação e de emagrecimento. Em ambos os estudos de 7 e 28 dias, a LDX causou mudanças significativas nos parâmetros sanguíneos uréia, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, e peso do coração,

fígado, cérebro e baço. Não foram observadas alterações histopatológicas aparentes relacionadas com o tratamento. Paralelamente a ambos os estudos de doses repetidas, foi conduzido um estudo de toxicocinética no qual se pode observar que o aumento nas doses de LDX resultou em aumento na exposição à LDX e *d*-ANF resultante. A extensão da exposição à LDX e *d*-ANF aumentou após doses repetidas no estudo de 28 dias (Krishnan e Montcrief, 2007).

Nos estudos de dose repetida, ao interromper o tratamento com LDX, não houve sinais de anormalidade, mostrando recuperação completa dos efeitos relacionados com o tratamento para cada dose oral de LDX avaliada (Krishnan e Montcrief, 2007).

Em um estudo de 28 dias em cães, os efeitos da LDX na maior dose testada de 12 mg/kg/d também foram consistentes com os efeitos conhecidos da *d*-ANF. Na dose de 6 mg/kg/d os efeitos farmacológicos foram semelhantes aos de uma dose equimolar de 2,4 mg/kg/d de sulfato de *d*-ANF base livre. Não foram observados efeitos relacionados com a LDX nas avaliações de patologia clínica, oftalmologia, eletrocardiograma, autópsia e histopatologia. O nível de efeito adverso não observado (NOAEL) determinado foi de 3 mg/kg/d (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

Os perfis de toxicidade e toxicocinética da LDX e *d*-ANF após administração oral de uma vez ao dia foram comparadas num estudo de toxicidade de 6 meses em ratos. Doses de LDX (20 e 40 mg/kg/d) e doses equivalentes de sulfato de *d*-ANF (8 e 16 mg/kg/d) foram associadas com diminuição no peso corporal e no consumo de alimentos proporcional a dose. A diminuição no peso corporal quando comparado ao grupo controle foi menor ou igual a 25% em ambos os sexos após 6 meses de tratamento e no consumo de alimentos foi menor ou igual a 15% somente em machos após 3 meses de tratamento. Os principais sinais clínicos observados em todos os grupos tratados foram hiperatividade crônica e salivação/espuma pela boca. Aumento do volume médio das plaquetas foi observada depois de 3 meses de administração em todos os grupos que receberam *d*-ANF e nas fêmeas que receberam LDX; esse efeito foi ainda evidente aos 6 meses nos grupos tratados com *d*-ANF mas não nos grupos tratados com LDX. Não foram observadas diferenças entre os perfis de toxicidade e toxicocinética da LDX e do sulfato de *d*-ANF (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

Quanto à genotoxicidade da LDX, foram realizados os ensaios de mutação reversa bacteriana (a uma concentração de ≤5000 µg por placa), de linfoma de rato (≤4600 µg/mL) e de micronúcleo de eritrócito de rato (≤400 mg/kg). Os resultados dos testes não mostraram indícios de genotoxicidade. Ainda, foram feitos estudos de desenvolvimento embriofetal em ratos e coelhos, aos quais foram dados LDX nas doses de até 40 e 120 mg/kg/d, respectivamente, durante o período de organogênese. Não foram observadas evidências de teratogenicidade nos ensaios (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

Em ratos jovens de 7 dias de idade, a administração de doses de LDX de 10 e 40 mg/kg/d durante 8 semanas foi associada com a diminuição do peso corporal, do consumo de alimentação e do crescimento. Em machos, a redução do peso corporal e crescimento continuaram após o término do tratamento até o dia 91 pós-parto. Não foram observados efeitos no desenvolvimento do sistema nervoso ou na função reprodutiva e o NOAEL foi considerado de 4 mg/kg/d. Em cães jovens de 10 semanas de idade, administração oral repetida de doses de LDX menores ou iguais a 12 mg/kg/d durante 26 semanas resultou em observações antes da próxima dose diária, incluindo a redução da atividade muscular e tremores. Nas doses iguais ou maiores a 5 mg/kg/d, foi observado a diminuição significativa de peso corporal e do volume urinário para machos e fêmeas. Após cessar o tratamento, a redução do peso corporal foi parcialmente revertida. Não foram observadas diferenças significativas de crescimento e alterações nos parâmetros de oftalmologia, eletrocardiograma, química sérica, testes hormonais (hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante, testosterona, progesterona, estradiol e prolactina), avaliações de reprodução masculina, ou de medula óssea. O NOAEL foi considerado como sendo de 2 mg/kg/d (Hutson, Pennick e Secker, 2014).

Os estudos pré-clínicos relacionados à toxicologia mostram que não houve alterações histopatológicas relacionadas à LDX e quando administrada oralmente ela possui um perfil de toxicidade semelhante à da *d*-ANF administrada oralmente (Hutson, Pennick e Secker, 2014; Krishnan e Montcrief, 2007), que é amplamente estudada, contudo duvidosa (U.S. Department of Health and Human Services, 2005).

3.3.5 Outros usos

Apesar de não ser aprovada para este fim, há relatos do uso de LDX para narcolepsia, um distúrbio do sono da fase de movimento rápido dos olhos (REM) caracterizado por sonolência diurna excessiva associada a paralisia do sono, sonhos vívidos ou alucinações ao adormecer ou ao acordar, e a cataplexia. O objetivo é diminuir a sonolência diurna excessiva, apesar de a utilização para esse fim não estar indicada na bula do medicamento, há relatos deste uso pela associação dos efeitos com a ANF e outros estimulantes que já são utilizados com essa finalidade. Um estudo avaliou doses únicas de LDX para manutenção da vigília durante um período agudo de privação de sono e verificou o aumento do estado de alerta em comparação com o placebo. Ainda, as doses de 50 e 70 mg produziram efeito similar ao armodafinil 250 mg, um medicamento que é aprovado pelo FDA para sonolência diurna excessiva refratária associada a narcolepsia, síndrome da apneia obstrutiva do sono e distúrbio do sono relacionado ao trabalho em turnos em adultos (Gasior *et al.*, 2014; Kotagal, 2012; Peterson e Husain, 2008).

Muito esforço tem sido dedicado à investigação de uma farmacoterapia para dependência de cocaína, porém ainda não existem medicamentos aprovados. Evidências sugerem que a exposição crônica à cocaína torna os transportadores de dopamina (DAT), insensíveis aos seus efeitos, levando a tolerância. As anfetaminas são um possível alvo farmacoterapêutico, pois são substrato para os DAT e mantêm os seus efeitos potentes sobre esse transportador mesmo após a exposição crônica à cocaína. O tratamento crônico com formulações de ANF e medicamentos derivados da ANF utilizados no tratamento dos sintomas do TDAH que fornecem níveis periféricos sustentados e regulados, reduzindo o potencial de abuso, têm mostrado alguns resultados na redução do uso de cocaína em indivíduos dependentes de cocaína. Os dados da literatura sugerem os possíveis mecanismos de atuação: (1) "terapia de reposição" semelhante ao modelo de metadona para a dependência de opiáceos; (2) diminuição dos efeitos de reforço da cocaína, produzindo tolerância e não substituindo a cocaína e; (3) aumento da neurotransmissão de dopamina que é baixa em indivíduos dependentes de cocaína (Haile *et al.*, 2012). Estudos pré-clínicos mostram algumas evidências de que a LDX reduz a preferência pela cocaína (Banks *et al.*, 2015). Porém, resultados preliminares de estudos clínicos em andamento com a LDX, não tem mostrado

resultados positivos quando administrada sozinha ou em combinação com o modafinil, considerando até o momento um pequeno número de indivíduos (Brewer *et al.*, 2015). Estudos clínicos ainda estão em andamento, visto que há evidências de que moléculas que causam a liberação de monoaminas reduzem o uso de cocaína (Banks *et al.*, 2015).

A LDX foi avaliada como adjuvante a monoterapia antidepressiva no transtorno depressivo maior com alguns resultados promissores (Madhoo *et al.*, 2014; Trivedi *et al.*, 2013). Porém, em 2014 a Shire liberou um comunicado declarando que não irá continuar com o programa de desenvolvimento clínico relacionado ao transtorno depressivo maior, pois com base nos resultados dos ensaios clínicos, a LDX não atendeu o objetivo primário de eficácia *versus* placebo em nenhum dos seus estudos (Shire, 2014).

Medicamentos utilizados para o tratamento dos sintomas do TDAH podem mimetizar alguns dos efeitos da nicotina. Assim sendo, um estudo avaliou se esses medicamentos ajudariam na cessação do tabagismo em fumantes com TDAH que não procuravam tratamento para parar de fumar. O estudo incluiu casos de LDX, no entanto os resultados foram avaliados sem diferenciação dos medicamentos. Foi observada uma redução dos níveis de cotinina salivar em comparação com placebo e os resultados sugerem que esses medicamentos podem ser um bom auxílio juntamente com outras estratégias (Gehricke *et al.*, 2011). Kollins e colaboradores (Kollins *et al.*, 2014) avaliaram a LDX como adjuvante aos adesivos de nicotina em fumantes adultos com TDAH interessados em parar de fumar. Não houve diferenças entre os fumantes a quem eram administrados a LDX versus placebo, apenas na redução dos sintomas do TDAH. Assim, a LDX não facilitaria a cessação do tabagismo em adultos com TDAH mais do que o placebo visto que em ambos os grupos houve redução do tabagismo, porém os autores ressaltam as limitações do estudo, uma amostra pequena, tempo de duração curto e falta de acompanhamento após o término. Os estudos são contraditórios e contrastam com a literatura que sugere que fármacos estimulantes podem aumentar o tabagismo em adultos com e sem TDAH (Stoops *et al.*, 2011; Vansickel *et al.*, 2011).

Estudos estão sendo feitos com relação à utilização da LDX como tratamento auxiliar aos antipsicóticos atípicos para os sintomas negativos da esquizofrenia e os

resultados preliminares são promissores sem prejuízo dos sintomas positivos (Lasser *et al.*, 2013; Martin, P. *et al.*, 2014).

Um estudo de fase II sugere que a LDX tem potencial no tratamento de pacientes com esclerose múltipla que tem prejuízo cognitivo, melhorando a memória e velocidade de processamento em relação ao placebo (Morrow *et al.*, 2013).

Ainda, existem alguns ensaios clínicos de avaliação da LDX que estão em fase inicial ou em andamento para novas aplicações: auxílio ao tratamento da dependência de metanfetamina; tratamento de adultos com TDAH e transtornos de ansiedade como comorbidades e combinação com fluoxetina para a farmacoterapia da desregulação grave do humor (U.S. National Institutes of Health, 2015).

3.3.6 Controle no trânsito

Há uma alta prevalência e risco de acidentes associados com o TDAH. Considerando a importância crítica que a condução de veículos automotores tem em nossa sociedade, a alta prevalência de TDAH e risco bem documentado dessa associação, a identificação de tratamentos seguros e eficazes para diminuir os riscos associados à condução de veículos em indivíduos com TDAH tem uma grande relevância clínica e para a saúde pública (Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey, Baer, *et al.*, 2012).

Estudos mostram que o tratamento com LDX melhora significativamente o comportamento de condução em jovens motoristas com TDAH quando comparado ao placebo independentemente da melhora nos sintomas do TDAH (Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey e Reimer, 2012; Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey, Baer, *et al.*, 2012). Os resultados revelam tempos de reação mais rápidos e uma menor taxa de colisões utilizando simulador de condução (Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey e Reimer, 2012) e melhorias significativas nos comportamentos de condução autorrelatados através de questionário validado (Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey, Baer, *et al.*, 2012). Assim, é

recomendado que os indivíduos com TDAH estejam adequadamente medicados ao conduzir veículos (Biederman, Fried, Hammerness, Surman, Mehler, Petty, Faraone, Miller, Bourgeois, Meller, Godfrey, Baer, *et al.*, 2012).

Contraditoriamente, segundo o Código de Trânsito Brasileiro (Brasil, 1997) constitui infração gravíssima e crime dirigir sob a influência de álcool ou de qualquer outra substância psicoativa que determine dependência. Assim, mesmo que o indivíduo condutor de veículo possua provas médicas do diagnóstico e/ou prescrição do medicamento para TDAH ele está cometendo uma infração e crime ao dirigir sob a influência de medicamento para TDAH, visto que estes medicamentos são utilizados para manter-se alerta e diminuir a fadiga no trânsito. Nos Estados Unidos, existem leis diferentes em cada Estado, mas alguns deles permitem uma defesa quando há uma prescrição válida ou quantidades terapeuticamente apropriadas da substância no momento da infração (Walsh, 2009).

Sendo assim, é importante que as análises toxicológicas tenham a capacidade de inferir sobre uso terapêutico ou abuso destas substâncias. Ao conhecermos a farmacocinética da substância sabemos quais concentrações são alcançadas na matriz analisada quando o indivíduo está sob tratamento médico podendo-se atribuir níveis de corte acima do qual o uso seria ilícito e abaixo seria lícito. Com estas informações é possível fazer uma avaliação de concentração da substância inalterada e/ou seus produtos de biotransformação. Além disso, no uso continuado em tratamentos médicos, a substância inalterada deve ser mais facilmente detectada facilitando a interpretação toxicológica e a defesa do paciente, caso seja necessário. Tudo isto não elimina a necessidade de provas de diagnóstico e prescrição.

3.3.7 Ambiental

Recentemente se tem voltado a atenção para medições das concentrações de resíduos de fármacos e drogas de abuso em águas residuais. Em toxicologia, artigos sugerem o balanço de massa para a retroextrapolação da concentração residual de fármacos e drogas de abuso em esgotos para avaliar os níveis de prevalência e de utilização das drogas ilícitas na população (Khan e Nicell, 2011, 2012). Sempre que possível, o uso de um produto de biotransformação gerado *in*

vivo é preferido à droga ilícita de origem para medição nos esgotos, pois sempre há a possibilidade de a droga ilícita de origem ser despejada nos esgotos tanto de modo intencional quanto não intencional (Khan e Nicell, 2012).

Cargas lícitas de S(+) e/ou R(-)ANF podem ser liberadas nos esgotos devido ao consumo clínico de medicamentos precursores pela população. Porém, os resultados sugerem que essa contribuição lícita é relevante apenas em populações nas quais há um baixo consumo de ANF ilícita (Khan e Nicell, 2012). Um estudo feito em uma população universitária utilizou a epidemiologia de esgoto para investigar o uso sem prescrição de estimulantes para TDAH que se biotransformam em ANF. Considerando que a ANF derivava apenas dos medicamentos e não do uso ilícito, os níveis de ANF, normalizados para creatinina, foram maiores durante os períodos de alto estresse acadêmico em que os estudantes utilizam estes medicamentos para estudar (Burgard *et al.*, 2013).

A LDX pode ser uma fonte lícita significativa de S(+)ANF nos esgotos, considerando os níveis atuais de consumo nos Estados Unidos e os níveis previstos na Alemanha e Inglaterra e, principalmente, se o uso aumentar além desses níveis. Além disso, em certos casos as análises enantiomérico-específicas poderiam servir para minimizar a importância relativa de fontes lícitas de ANF, considerando as diferenças de consumo lícito e ilícito de cada país (Khan e Nicell, 2012).

3.3.8 Métodos de detecção

Até o momento não foram encontradas publicações sobre métodos validados para a detecção da LDX em fluido oral. Diversas publicações de farmacocinética e metabolismo (Biederman, Boellner, *et al.*, 2007; Boellner *et al.*, 2010; Ermer *et al.*, 2011, 2012; Ermer, Haffey, Mary B, *et al.*, 2013; Ermer, Haffey, Mary B., *et al.*, 2013; Jasinski e Krishnan, 2009a; Krishnan, Pennick e Stark, 2008; Krishnan e Stark, 2008; Krishnan e Zhang, 2008; Pennick, 2010, 2013; Roesch *et al.*, 2013; Rowley *et al.*, 2012) citam um método de detecção por CL-EM/EM para plasma. No entanto, as informações sobre as condições cromatográficas e de detecção de massas são insuficientes, mesmo nos artigos de Boellner e colaboradores (2010) e Ermer e colaboradores (2015) que são mais detalhados em comparação aos outros. Apenas uma publicação descreve um método validado para urina por CL-EM/EM para

detecção da LDX e do sulfato de 4-hidroxianfetamina, um produto de biotransformação da ANF, para o controle de dopagem esportiva, além de detectar ANF por CG/EM. O método descrito é sensível para LDX com um limite de quantificação de 0,15 ng/mL utilizando cromatografia líquida acoplada a um detector de massas quadrupolo-orbitrap e uma preparação de amostra simples apenas com a adição de padrão interno e agitação em vórtex (Thevis *et al.*, 2014).

A ANF é uma substância amplamente estudada em diversas áreas do conhecimento. Sendo assim, existe uma grande quantidade e variedade de métodos para sua detecção descritos na literatura (Cody, 2008).

3.4 Análise de derivados da ANF

A interpretação dos resultados de testes de drogas muitas vezes é uma tarefa complexa e desafiadora. Uma análise adequada, em toxicologia clínica, conduz a um diagnóstico correto e consequentemente a um tratamento adequado do paciente (Musshoff, 2000), no ambiente de trabalho, no trânsito e no doping, pode ser a diferença entre uma ação punitiva e nenhuma ação, e na área da análise *postmortem*, pode ser importante na avaliação da causa da morte (Cody, 1993). Resultados não confiáveis podem ser contestados em tribunal e levar a consequências legais injustificadas para o réu ou ao tratamento errado do paciente (Peters e Maurer, 2002).

Um dos principais desafios é quando há a necessidade de diferenciar um uso ilegal da possibilidade de um uso terapêutico. Neste caso, os estimulantes tipo-anfetamínicos são uma das classes de medicamentos na qual existe uma maior dificuldade de interpretação em toxicologia clínica e forense, pois estão disponíveis através de prescrição médica, mas também são amplamente abusados (Cody, 2002). Uma análise toxicológica eficiente com um resultado analítico confiável é a base de um julgamento toxicológico competente e visto que alguns testes toxicológicos podem detectar ANF devido à utilização de determinados medicamentos a interpretação deve ser cautelosa (Cody, 2002; Musshoff, 2000; Souza *et al.*, 2012). Cada laboratório de toxicologia deve ter conhecimento sobre as possíveis fontes de resultados positivos de testes de drogas que não são baseadas em um uso ilegal de ANF, sendo capaz de prevenir uma interpretação errônea da

situação e consequentemente protegendo a integridade tanto do indivíduo sob suspeita quanto do profissional toxicologista que conduz as análises e laudos (Musshoff, 2000).

Resultados positivos para ANF obtidos em alguns estudos com amostras de urina (Nascimento, Nascimento e Silva, 2007; Silva *et al.*, 2003; Souza, Paiva e Reimão, 2005; Yonamine, 2004) podem refletir a utilização de outras substâncias, como mostrado no estudo realizado por SILVA e colaboradores (Silva *et al.*, 2003), no qual 52,7% das amostras de urina positivas para ANF evidenciaram também a presença de femproporex, indicando que aquela poderia ser originária da biotransformação deste anorexígeno. Esta situação também pode ocorrer no fluido oral e deve ser avaliada visto, por exemplo, que tanto o femproporex quanto a ANF passam por difusão passiva para a saliva e podem ser encontrados nesta matriz (Comiran *et al.*, 2012). Estes casos evidenciam a importância da avaliação das concentrações dos analitos de interesse na matriz biológica através de estudos de farmacocinética, que mostram as concentrações de ANF que podem ser alcançadas após a administração de um precursor. Se a concentração encontrada for maior do que a descrita é possível que o indivíduo esteja utilizando o medicamento além da posologia receitada ou esteja abusando da ANF e/ou outro precursor.

Em geral, as substâncias precursoras não são úteis para diferenciar um uso abusivo ilegal e um uso medicamentoso legal, pois são detectáveis apenas por um curto período de tempo após a ingestão, principalmente quando sofrem extensa biotransformação. Além disso, na fase final de excreção a ANF é muitas vezes o único produto de biotransformação detectado em amostras de urina, dificultando a interpretação da sua origem (Musshoff, 2000). Nestes casos, a existência de um produto de biotransformação único pode ser utilizado para demonstrar o uso do fármaco precursor (Cody, 2002; Musshoff, 2000), e que também pode ser relacionado à quantidade de ANF presente permitindo uma avaliação adequada da sua origem (Cody, 2002). Para os precursores que sofrem uma reduzida biotransformação, a detecção do composto original pode ser a melhor escolha para ajudar a interpretar adequadamente os resultados analíticos (Cody, 2002).

O conhecimento da configuração do precursor é inestimável, pois até onde se sabe os precursores e metabólitos da classe dos anfetamínicos não sofrem racemização no organismo (Cody, 1993). Para algumas substâncias, o estudo dos

enantiômeros foi descrito e permite caracterizar a procedência diferenciar um uso legal prescrito de um uso ilegal, mesmo quando existe uma prescrição (Cody, 2002; George e Braithwaite, 2000; Musshoff, 2000). Um exemplo é a administração da selegilina, que produz a *l*-metanfetamina e *l*-ANF no organismo, não sendo condizente com a descoberta de *d*-metanfetamina e *d*-ANF ou da mistura *d* e *l* (Cody, 1993). Assim como no caso do sulfato de dextroanfetamina - Dexedrine® (George e Braithwaite, 2000), na LDX o produto de biotransformação formado é a *d*-ANF (Mickle *et al.*, 2006), e se a análise biológica indicar a presença de *l*-ANF é porque o indivíduo não está utilizando apenas o Dexedrine® ou a LDX como fonte de ANF.

Ao detectar a ANF e um precursor de uso terapêutico, deve-se garantir que a utilização é para tratamento médico através de uma prescrição médica válida, exame do paciente ou revisão adequada de registros médicos. Além disso, também se deve garantir que não há o abuso concomitante de uma droga ilícita da mesma classe sendo oculto pela detecção de um produto de biotransformação comum a ambos (Cody, 2002).

3.5 Matrizes Biológicas

A escolha da matriz a ser utilizada para análise vai depender do seu objetivo e das características e comportamento do analito de interesse na matriz (Moreau e Siqueira, 2008). Um dos principais critérios utilizados na escolha da matriz é a janela de detecção, que em geral é mais longa no cabelo, seguido pela urina, suor, fluido oral e sangue. Dados sobre os tempos de detecção são obtidos, principalmente, a partir da administração controlada a voluntários saudáveis e dependem de diversos fatores como dose, tipo de preparação farmacêutica, via de administração, período de utilização do fármaco (dose única ou múltipla), matriz analisada, molécula ou produto de biotransformação procurado, pH e concentração na matriz, variação inter e intra individual e sensibilidade do método utilizado (Verstraete, 2004).

Tradicionalmente, a urina e o sangue são as matrizes mais comumente amostradas para a triagem e confirmação toxicológica, respectivamente (Moeller, Steinmeyer e Kraemer, 1998). A urina possui um menor número de interferentes endógenos e concentrações mais altas de substâncias alvo e/ou seus produtos de

biotransformação em relação ao sangue (Mali, Karpe e Kadam, 2011). Contudo, por possuir uma baixa correlação com os efeitos, essa matriz indica apenas que a substância estava presente no organismo. Já o sangue e seus derivados (plasma e soro) geralmente possuem correlação direta com os efeitos causados pela substância no organismo, revelando se o indivíduo estava sob seu efeito no momento da coleta (Moreau e Siqueira, 2008).

As matrizes convencionais cada vez mais têm sido complementadas pela utilização da matriz biológica alternativa fluido oral. Indivíduos adultos produzem aproximadamente 500-1500 mL de saliva por dia, que é o principal componente do fluido oral e resulta de três pares de glândulas – parótida, sublingual e submaxilar. Ainda, o fluido oral é composto por outros fluidos e substâncias presentes na cavidade oral. O resultado desta composição é a presença da água como principal molécula constituinte. As glândulas salivares são altamente vascularizadas, permitindo uma rápida transferência de substâncias do sangue para a saliva. Assim sendo, diversos fármacos podem aparecer no fluido oral em apenas alguns minutos a partir da sua administração. A concentração de substâncias na saliva, no entanto, depende de vários fatores, como as propriedades químicas das moléculas, o pH salivar e sanguíneo, a ligação a proteínas plasmáticas, a dose, a capacidade de biotransformação e depuração das substâncias, o fluxo salivar, entre outros. O principal mecanismo de transferência é a difusão passiva (para moléculas altamente lipossolúveis), porém podem ocorrer outros mecanismo como o processo ativo contra um gradiente de concentração (por exemplo, para eletrólitos, IgA) e a ultrafiltração através de poros na membrana (apenas para pequenas moléculas polares de peso molecular inferior a 300 Da) (Aps e Martens, 2005; Cone e Huestis, 2007).

A utilização do fluido oral tem sido promissora como substituto do sangue para as drogas psicotrópicas em monitorização terapêutica, estudos farmacocinéticos, bem como na detecção de uso ilícito de substâncias. Considerando que a concentração salivar geralmente reflete a fração livre da molécula no sangue, o fluido oral pode ser correlacionado ao sangue no perfil de concentração *versus* tempo da substância. Assim, o fluido oral é considerado a principal matriz alternativa ao sangue e também pode ser associado aos efeitos da substância no organismo (Aps e Martens, 2005; Moreau e Siqueira, 2008). Dentre as

vantagens dessa matriz destaca-se a coleta fácil e de forma não invasiva, a qual pode ser realizada no próprio local da abordagem, sob vigilância contra adulterações e sem constrangimentos, e o fato de fornecer informação sobre o consumo recente (algumas horas), além de as substâncias em questão não estarem na forma metabolizada, tendo sua análise facilitada. As desvantagens apresentadas pelo fluido oral, como o elevado conteúdo glicoproteico (mucina), reduzido volume de amostra e baixa concentração de fármacos, podem ser superadas pela utilização de métodos adequados de extração e pré-concentração dos analitos, unidos a técnicas sensíveis de detecção, tais como cromatografia à gás e cromatografia líquida acopladas a detector de massas (Bosker e Huestis, 2009; Moreau e Siqueira, 2008).

Há a possibilidade do emprego desta matriz para detecção de substâncias em diversas situações, tais como no uso recreativo ilícito, em intoxicações, em dopagem esportiva, no trânsito, no trabalho e no monitoramento terapêutico especialmente em pacientes pediátricos (Anizan e Huestis, 2014; Bosker e Huestis, 2009). Em algumas destas situações o uso desta matriz já está estabelecido, como é o caso da monitorização do consumo de drogas no trânsito que vem sendo empregada em diversos países do mundo (Bosker e Huestis, 2009), devido ao fluido oral ser superior à urina na correlação com o plasma e efeitos da substância ao dirigir sob a influência de drogas de abuso (Toennes *et al.*, 2005).

3.5.1 Relação fluido oral x plasma

Substâncias com caráter de bases fracas como a ANF são encontrados em concentrações muito maiores no fluido oral do que no plasma. Isto é devido à relativa acidez do fluido oral (pH 6,2-7,4) comparado ao plasma (pH 7,35-7,45), que faz com que a molécula fique na sua forma ionizada no fluido oral e assim permaneça aprisionada neste fluido, aumentando a sua concentração e, consequentemente, a sua detectabilidade. Assim, a relação saliva/plasma (S/P) da ANF é maior que a unidade, podendo chegar até 3 vezes (Cone e Huestis, 2007; Drummer, 2005; United Nations, 2001), constituindo vantagem na utilização desta matriz para análise dos derivados da anfetamina.

A relação teórica S/P para uma substância pode ser estimada pelos seguintes modelos matemáticos:

Ácidos:

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(\mathrm{pH_s} - \mathrm{p}K_\mathrm{a})} \times f_\mathrm{p}}{1 + 10^{(\mathrm{pH_p} - \mathrm{p}K_\mathrm{a})} \times f_\mathrm{s}}$$

Bases:

$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(\mathrm{p}K_\mathrm{a} - \mathrm{pH_s})} \times f_\mathrm{p}}{1 + 10^{(\mathrm{p}K_\mathrm{a} - \mathrm{pH_p})} \times f_\mathrm{s}}$$

Sendo:
S = concentração da substância na saliva
P = concentração da substância no plasma
pK_a = pK_a da substância
pH_s = pH da saliva
pH_p = pH do plasma
f_p = fração livre (não ligada) da substância no plasma
f_s = fração livre (não ligada) da substância no saliva.

Nestas equações, o pH do plasma é assumido como constante a 7,4 e ligação a proteína da substância na saliva é assumida como negligenciável. Portanto, um valor de 1 é utilizada para f_s. A partir das equações, seria de prever que as pequenas alterações no pH da saliva devem resultar em grandes alterações na relação S/P. Assim, os fatores que alteram o pH da saliva podem afetar a relação S/P, tais como alguns estimulantes utilizados para coleta que afetam a composição do fluido oral, resultando em bicarbonato aumentando o pH do fluido oral e reduzindo a concentração de substâncias básicas (Crouch, 2005).

O fluido oral tem potencial para refletir as concentrações de algumas substâncias no sangue. Assim, existem diferentes métodos que podem ser utilizados para prever as concentrações sanguíneas a partir das concentrações em fluido oral (Gjerde e Verstraete, 2010):

- Dividir as concentrações do fluido oral pela média da relação fluido oral/sangue (FO/S)
- Dividir as concentrações do fluido oral pelo coeficiente de regressão (inclinação) entre fluido oral e sangue
- Dividir as concentrações do fluido oral pela mediana da relação FO/S

- Simulação de Monte Carlo utilizando a distribuição de probabilidade Lognormal
- Simulação de Monte Carlo utilizando a distribuição de probabilidade Weibull

Conforme um estudo realizado Gjerde e colaboradores (Gjerde e Verstraete, 2010), a utilização do coeficiente de regressão deu uma estimativa aceitável de altas concentrações da substância no sangue em uma população e pode, portanto, dar valiosas informações adicionais sobre o eventual comprometimento, por exemplo, em pesquisas na estrada sobre drogas e direção. A simulação de Monte Carlo pode dar uma melhor precisão se relações FO/S representativas para a distribuição em uma população maior estiverem disponíveis.

3.6 Preparo de Amostras

Em geral, é necessário um pré-tratamento da amostra para a análise cromatográfica de substâncias presentes em fluidos biológicos. Frequentemente essa é a etapa mais problemática da análise devido à complexidade das matrizes biológicas a serem analisadas, as quais possuem proteínas que interferem na análise, e às pequenas concentrações das substâncias a serem analisadas. As técnicas de extração e/ou pré-concentração possibilitam a análise dos analitos de interesse através da obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Queiroz, Collins e Jardim, 2001).

As características que influenciam na escolha na técnica são a simplicidade, rapidez, baixo custo, fornecimento de extratos relativamente livres de interferentes, recuperações altas, com boa exatidão e precisão, para os analitos de interesse. As técnicas mais comumente utilizadas para a preparação de amostras biológicas são a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida, a extração com fluido supercrítico, a extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas. Ainda, pode ser necessário a utilização de uma combinação de técnicas (Queiroz, Collins e Jardim, 2001).

3.7 Cromatografia líquida acoplada a detector de massas sequencial (CL-EM/EM)

A CL-EM/EM é uma técnica versátil para análise de compostos mais polares e termolábeis e é utilizada em diversos campos do conhecimento com confiabilidade. Possui alta especificidade e sensibilidade e, em geral, necessita de uma preparação de amostra menos complexa. Contudo, cuidados devem ser tomados em relação ao efeito da matriz analisada em relação à supressão ou ao aumento do sinal. Pode ser utilizada também em procedimentos que necessitam analisar simultaneamente diversos compostos em uma única injeção (Maurer, 2005). Apesar de não ser facilmente encontrada e utilizada nos laboratórios brasileiros devido do alto custo atrelado às análises e especialmente ao custo inicial do equipamento, esse tipo de análise vem crescendo e ganhando espaço, pois algumas análises só obtém um resultado satisfatório ao se usufruir das particularidades da CL-EM/EM.

3.8 Validação de métodos analíticos

Validar um sistema é dar ao mesmo validade, credibilidade, confiança. No caso de um sistema analítico, a validação objetiva confirmar por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos (Brasil, 2012).

Os parâmetros precisão, exatidão, linearidade, especificidade, reprodutibilidade, robustez, limites de detecção e/ou quantificação, estabilidade e recuperação devem ser avaliados considerando as recomendações para métodos bioanalíticos de órgãos reguladores nacionais ou internacionais – dependendo do escopo de aplicação – tais como FDA (Food and Drug Administration, 2001), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2012), *European Medicines Agency* (European Medicines Agency, 2011) e *International Conference on Harmonization* (International Conference on Harmonization, 2005).

Os métodos de preparação da amostra (coleta, extração e concentração) devem ser validados juntamente com os métodos de análise para assegurar a qualidade e confiabilidade de todo o processo (Queiroz, Collins e Jardim, 2001).

4 CAPÍTULO 1 – *LISDEXANFETAMINA: REVISÃO FARMACOCINÉTICA*

4.1 Manuscrito I

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado "*Lisdexamfetamine: A Pharmacokinetic Review*" submetido para publicação na revista *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Essa revisão inclui os artigos encontrados na literatura referentes à farmacocinética da LDX, focando na farmacocinética clínica deste medicamento.

LISDEXAMFETAMINE: A PHARMACOKINETIC REVIEW

Running title: Pharmacokinetics of lisdexamfetamine

Eloisa Comiran[*a], Félix Henrique Kessler[b], Pedro Eduardo Fröehlich[a] and Renata Pereira Limberger[a]

[a]Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; [b]Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas of Porto Alegre - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

[*]Address correspondence to this author at the Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel/Fax: +55-51-3308-5762/+55-51-3308-5243; E-mail: eloisacomiran@gmail.com

ABSTRACT

Lisdexamfetamine (LDX) is a pro-drug of *d*-amphetamine (*d*-AMPH) used to treat symptoms of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) and of Binge Eating Disorder (BED). The *in vivo* pharmacodynamics of LDX coincides with that of its active product d-AMPH, although there are a few qualitative and quantitative differences due to pharmacokinetics. In this sense, due to the specific pharmacokinetics of the prolonged release stimulants, this article revises the pharmacokinetic studies on LDX, the newest pro-drug of amphetamine. A search was performed for articles in the Medline/Pubmed, Science Direct and Biblioteca Virtual em Saúde (Lilacs and Ibecs) (2007- 2015) databases as well as in the articles' list of references. As to the studies of basic pharmacokinetics, since LDX is a recent medication, so far there are few results concerning biotransformation, the distribution and use of different biological matrices for analysis. This is the first robust review on this topic, gathering the data from all clinical pharmacokinetics studies available in the literature. The particular pharmacokinetics of LDX plays an important role in studying this pro-drug, since this knowledge was fundamental to understand some reports on clinical effects in literature, such as the small likelihood of reducing the effect by interactions, the effect of long duration and the still debatable reduction of the potential for abuse. In general the already well-known pharmacokinetic properties of amphetamine make LDX relatively predictable, simplifying the use of LDX in clinical practice.

Key-words: lisdexamfetamine; amphetamine; clinical pharmacokinetics.

1 INTRODUCTION

Lisdexamfetamine (LDX) is a pro-drug of *d*-amphetamine (*d*-AMPH) used to treat the symptoms of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD), and Binge Eating Disorder (BED). ADHD is a neuropsychiatric disorder characterized by a pattern of inattention and/or hyperactivity/impulsiveness (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). BED is a neuropsychiatric disorder characterized by episodes of compulsive eating, that occur at least once a week for three months, accompanied by a feeling of lack of control and without any regular compensatory behaviors (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). The two disorders involve a certain degree of impulsivity, but in the second there is a predominance of compulsive behavior. This pro-drug has other potential uses that are still off-label, and its use can be mentioned as an intellectual potentiator, a use of amphetamine (AMPH) that has already been characterized (WOOD et al., 2013).

AMPH appears to act by inhibiting the reuptake of dopamine and norepinephrine and releasing these monoamines into the extraneuronal space relieving the symptoms of ADHD and BED (HEAL; CHEETHAM; SMITH, 2009; MCELROY et al., 2015). Therefore the pharmacological treatment of these neuropsychiatric disorders mimics or increases the effects of catecholamines (ARNSTEN, 2009). The pro-drug does not cross the blood-brain barrier due to its characteristics and to the fact that it does not have other biotransformation products of its own. Hence, it is assumed that the *in vivo* pharmacodynamics of LDX will coincide with that of its active product *d*-AMPH with a few qualitative and quantitative differences due to pharmacokinetics (HUTSON; PENNICK; SECKER, 2014).

The pharmacokinetics of stimulants that contain prolonged release preparations, such as methylphenidate, mixed salts of AMPH and LDX dimesylate, takes longer to gradually reach the maximum concentration in plasma, reducing the levels of reinforcement. Furthermore, prolonged release helps reduce the potential for abuse and diversion of the drug to other purposes, since there is a vast capacity to monitor and supervise the administration performed only once a day (BUKSTEIN; HORNER, 2010).

In this way, considering the specific pharmacokinetics of the prolonged release stimulants, the present article is a review of pharmacokinetic studies on LDX, the

most recent pro-drug of AMPH. The objective was to gather the results found in literature, besides updating knowledge on the subject. A virtual search was performed in the Medline/PubMed, Science Direct and Biblioteca Virtual em Saúde (Lilacs e Ibecs) databases (2007- 2015) of the term "*lisdexamfetamine pharmacokinetics*" for articles in English, Spanish and Portuguese. Additional references were identified through the reference list of those articles. This review included articles with pre-clinical data that help understand the absorption, biotransformation and elimination phases of LDX and all the original articles of clinical pharmacokinetics studies.

2 PHARMACOKINETICS REVIEW

2.1 ABSORPTION

After oral administration, the biotransformation product *d*-AMPH is usually detected in the portal blood for a short period, indicating rapid metabolism of LDX to *d*-AMPH, during or immediately after absorption. Absorption from the lumen of the gastrointestinal tract occurs through carrier-mediated transport present in the small bowel. This is consistent with its physico–chemical properties of high aqueous solubility and low lipophilia, which foresee low passive diffusion through the biological membranes. Since the molecule includes the essential aminoacid lysine in its constitution, it is a substrate for the peptide transporting proteins, mainly PEPT1 which is expressed in the small bowel and is related to rapid, efficient intestinal absorption, even with a damaged mucosa (PENNICK, 2010). The absorption of PEPT1 substrates does not appear to be affected by the intake of foods, corroborating the results that show that the bioavailability of LDX is not impaired in the fed state (KRISHNAN; ZHANG, 2008; PENNICK, 2010).

Ermer and collaborators (ERMER et al., 2012) studied the absorption of LDX regarding the pharmacokinetic parameters of oral single dose administration compared to the release of the medication directly into the proximal small bowel, distal small bowel and ascending colon. The absorption (systemic exposure) of intact LDX was similar after oral administration and release into the small bowel resulting in similar plasma and pharmacokinetic concentration profiles of *d*-AMPH. However, the

intact LDX presented lower absorption after release into the colon compared with the other administrations, resulting in smaller concentrations of intact LDX and *d*-AMPH.

As to the influence of eating and the way the medication is administered – in the form of a capsule or as a solution – it was found that fasting and capsule dissolution do not affect the bioavailability of LDX in terms of the area under the curve from time 0 to the last time of concentration determined (AUC_{0-t}), however, eating diminishes the maximum concentration (C_{max}) and prolongs the time to attain maximum concentration (t_{max}) compared to fasting. For the AMPH that results from LDX administration, the fed/fasted status and dissolution of the capsule do not influence systemic exposure (area under the curve - AUC and C_{max}), however, a fat rich diet delays t_{max} by 1 hour. The fast t_{max} for LDX under all conditions studied shows its quick absorption, and increasing the fed state by 1 hour did not affect the resulting absorption of *d*-AMPH which was bioequivalent under the three conditions. Therefore, changes in normal gastrointestinal transit time do not affect the end result of the medication and it can be ingested both in a fed and fasted state. These results also show that the capsules can be opened and their content dissolved in water without any loss of effect (KRISHNAN; ZHANG, 2008). Further, *in vitro* tests in buffered aqueous solutions demonstrated that the pH of the medium does not affect the solubility profile of LDX within the biological range of pH 1-8, and when administered together with the medication called omeprazole, the pharmacokinetic profile does not undergo any changes, on the contrary of what happens with other medications for ADHD that use systems sensitive to pH. Thus, both results indicate that the gastric pH does not alter LDX absorption and, consequently there is no interaction with medications that reduce gastric pH (HAFFEY et al., 2009; GOODMAN, 2010).

2.2 BIOTRANSFORMATION

LDX is not converted *in vitro* by enzymes that simulate conditions in the gastrointestinal tract, such as gastric and bowel fluids and by trypsin, suggesting that its cleavage in the gastrointestinal tract *in vivo* is probably minimal. Thus, it is absorbed predominantly intact from the small bowel to the portal circulation with posterior enzyme conversion into *d*-AMPH and *l*-lysine in the blood (PENNICK, 2010). Presystemic conversion was demonstrated in rats based on two observations:

(1) LDX levels in portal blood, approximately 10 times greater than in systemic plasma and (2) area under the curve of LDX and *d*-AMPH similarly in portal plasma, but approximately 3.2 times greater for *d*-AMPH in systemic plasma. Liver microsome assays and assays with isolated fresh hepatocytes show that the red blood cells of the portal circulation are responsible for this pre-conversion, not the liver (PENNICK, 2010).

The biotransformation of LDX occurs only in the red blood cells, not in other fractions of human blood such as leukocytes and platelets (PENNICK, 2010). These cells have high hydrolytic activity and, consequently, the capacity to biotransform LDX, even with a low hematocrit. Hence, the *d*-AMPH release rate appears to be controlled by the biotransformation process, and not by the dissolution of intact LDX (PENNICK, 2010). The blood concentrations of LDX in a 4-hour time period in *in vitro* samples from normal donors and donors with sickle cell anemia were higher than the plasma concentrations observed in pharmacokinetic studies of therapeutic doses in healthy volunteers. *In vitro* hydrolysis is robust and is not affected by sickle red blood cells, therefore the depuration would not be compromised. However, *in* vivo the renal system also can be affected in this pathology and modify LDX depuration (PENNICK, 2013).

In this way, the mechanism by which the red cells biotransform LDX is still being studied, but it is probably a high capacity system that is not affected by calcium dependent enzymes and a red blood cell pathology. Several hypotheses were raised in this respect, such as the interaction with glycoproteins in the membranes of these cells with enzymatic activity for peptides due to the structural similarity of LDX with dipeptides. Also, since the structure of AMPH is similar to that of the catecholamines, it could be transported actively into the red blood cells through the choline exchange system (PENNICK, 2013). Recent, more detailed *in vitro* studies suggest that LDX is hydrolyzed in the cytosol of red cells and not in the membrane (HÄGE et al., 2014; SHARMAN; PENNICK, 2014). Although this activity is probably due to an aminopeptidase, the enzyme responsible has not yet been identified (SHARMAN; PENNICK, 2014). Also, the administration of LDX results in a prolonged release of *d*-AMPH through different routes of administration and a broad interval of doses substantially supports the idea that the onset of *d*-AMPH depends on the rate of

conversion that limits the LDX, and thus there is no saturation of the depuration capacity (PENNICK, 2010; ERMER et al., 2011, 2012).

Since ADHD and BED can be accompanied by comorbidities and the individuals being treated may need other medications due to transient conditions, it is very possible that medicines will be co-administered. In such cases, it is important to know the interactions among the medications, especially regarding cytochromes that are responsible for the biotransformation of most drugs. On the contrary of most drugs, LDX is not metabolized by the enzymes of cytochrome P450 (SHIRE, 2015). The inhibition of CYP2D6 by AMPH and the inhibition of CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 by one or more of their metabolites have been observed, but no induction of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4/5 occurred in tests performed with human hepatocytes at concentrations of 1, 10 and 100 µM. The hydrolysis of LDX results in exposure to *d*-AMPH, therefore it could be predicted that LDX has a similar potential for drug interaction. *In vitro* tests using human liver showed that LDX does not inhibit isoenzymes CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 of the P450 cytochrome and at concentrations of 1, 10 and 100 µM does not induce CYP1A2, CYP2B6 or CYP3A4/5, suggesting a low potential for interaction with other drugs. Therefore, any interactions would probably be caused by AMPH and its biotransformation products and not by intact LDX. Hence, neither LDX nor AMPH inhibit glycoprotein-P at concentrations below 300 µM and are not their substrates at concentrations below 100 µM (KRISHNAN; MONCRIEF, 2007; HUTSON; PENNICK; SECKER, 2014).

Although *in vitro* tests have been performed, it is necessary to study some important pharmacokinetic interactions *in vivo*. The drugs that have been studied *in vivo* so far together with LDX are guanfacine because it is biotransformed by CYP3A4 (ROESCH et al., 2013), venlafaxine because it is biotransformed by CYP2D6 (ERMER et al., 2013b), omeprazole because it is a proton-pump inhibitor and affects the gastric pH (HAFFEY et al., 2009) and antipsychotics (MARTIN et al., 2014). In addition, a joint study of the substrates of CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A caffeine, dextromethorfan, omeprazole and midazolam, respectively, was performed, administered alone in the form of a Cooperstown cocktail, or combined with LDX (ERMER; CORCORAN; MARTIN, 2015). The use of LDX together with guanfacine (ROESCH et al., 2013) and antipsychotics (MARTIN et al.,

2014) did not lead to relevant pharmacokinetic changes compared to isolated treatments, and the co-administration with omeprazole (HAFFEY et al., 2009) also did not impair exposure to the drug. The co-administration of LDX with venlafaxine also did not speed up exposure to *d*-AMPH, but it increased exposure to venlafaxine and diminished its biotransformation product, and did not alter the sum total (ERMER et al., 2013b). In the study of interaction with Cooperstown cocktail, LDX did not alter the activity of enzymes CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A in healthy volunteers, suggesting that the co-administration of drugs that are metabolized by these enzymes with LDX would not result in drug interactions. As to CYP2C19, there might be a small reduction of C_{max} (ERMER; CORCORAN; MARTIN, 2015), which must be further evaluated for conclusions, since another study with omeprazole (HAFFEY et al., 2009) did not show a change in exposure to the drug.

2.3 ELIMINATION

Pharmacokinetics and metabolism studies using the drug marked with ^{14}C and liquid scintigraphy found that after oral administration the LDX is eliminated 96.4% through the urine in a 120 hour period. In 48 hours 79.4% of the dose was recovered, 41.5% of *d*-AMPH, 24.8% of hippuric acid, 2.2% of benzoic acid, 2.2% of intact LDX and 8.9% not identified. Fecal excretion of LDX corresponds to less than 0.3% (KRISHNAN; PENNICK; STARK, 2008). Since part of the AMPH is excreted intact in the urine, it is expected that age related diminished renal function will affect pharmacokinetics. When the renal function of adults over 55 years of age to whom LDX was administered was evaluated, it was found that the depuration of creatinine and *d*-AMPH tend to diminish with age. However no clear relationship was detected between these parameters, and it is different from other studies probably due to the different criteria for the selection and exclusion of the individuals in each study (ERMER et al., 2013a).

3 CLINICAL PHARMACOKINETICS

Tables 1 and 2 show a summary of the data from single dose pharmacokinetics studies performed in humans for LDX administered alone (Table 1)

or in combination with other drugs (Table 2). All the studies have in common the use of plasma as a matrix for analysis and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as a technique with the same limits of quantification (LOQ) of 2 ng/mL for AMPH and 1 ng/mL for LDX. In Table 1 we can see that although the pharmacokinetic parameter values were close, they have a variation that is probably due to the different study conditions, such as population, age, dosage and others. As already reported in the literature t_{max} may be influenced by eating (KRISHNAN; ZHANG, 2008) and therefore an interval of 2.5 to 6h can be seen for AMPH and 0.8 to 2 h for LDX, considering the oral administration of LDX in a capsule. However, in a study on the fasted condition, a t_{max} of 6 h was found for AMPH corresponding to supratherapeutic doses of LDX, while the t_{max} of LDX was not altered by the dose increase. For a same dosage, AUC differs among the studies, as for instance the AUC of the AMPH corresponding to 70 mg of LDX in a study (BIEDERMAN et al., 2007) which has values equal to 50 mg of another study (BOELLNER et al., 2010) with very similar characteristics. In the studies that looked at several dosages, systemic exposure increased with the dose. Table 2 shows that when administered with other medications, the pharmacokinetic parameters do not vary much, probably because the conversion does not occur in cytochrome P450.

Table 6: Pharmacokinetic studies of single dose in humans.

	(BIEDERMAN et al., 2007)[b]	(BOELLNER et al., 2010)			(KRISHNAN; ZHANG, 2008)			(KRISHNAN; PENNICK; STARK, 2008)
Population studied	Children (6-12 years)	Children (6-12 years)	Children (6-12 years)	Children (6-12 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)
Gender	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female
Condition/Disease	ADHD	ADHD	ADHD	ADHD	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy
Number of individuals	8	16	17	17	18	18	18	6
Presentation (mg)	70	30	50	70	70	70	70	70 Marked with ^{14}C
Phamaceutical form					Capsule	Capsule	Solution	Solution
Feeding Status		Fasted	Fasted	Fasted	Fed	Fasted	Fasted	Fasted
Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Collection points (h)	Pre-dose, 1, 2, 3, 4.5, 6, 8, 10, 12	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 120
Equipment	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Extraction		AMPH extracted with organic solvent[c]	AMPH extracted with organic solvent [c]	AMPH extracted with organic solvent[c]	Extracted with organic solvent[c]	Extracted with organic solvent[c]	Extracted with organic solvent[c]	
Alíquot of sample extracted								
LOQ AMPH (ng/mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
LOQ LDX (ng/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
t_{max} AMPH (h)	4.5	3.41	3.58	3.46	4.72	3.78	3.33	3.00
t_{max} LDX (h)		0.97	0.98	1.07	2.08	1.15	0.97	1.00
C_{max} AMPH (ng/mL)	155	53.2	93.3	134	65.3	69.3	68.4	80.3
C_{max} LDX (ng/mL)		21.9	46.0	89.5	26.2	48.0	45.6	58.2
AUC_{0-t} AMPH (ng·h/mL)	1326	745.3	1448.0	2088.0	972	1020	1007	1260
AUC_{0-t} LDX (ng·h/mL)		25.54	56.20	107.40	53.68	59.47	53.07	70.21
$AUC_{0-\infty}$ AMPH (ng·h/mL)		844.6	1510.0	2157.0	1038[a]	1110	1074[a]	1342
$AUC_{0-\infty}$ LDX (ng·h/mL)		27.88	57.90	108.90	58.81[a]	66.84[a]	55.10[a]	67.04[a]
$t_{½}$ AMPH (h)		8.90	8.61	8.64	9.59[a]	9.69	9.37[a]	10.39
$t_{½}$ LDX (h)		0.50	0.60	0.51	0.63[a]	0.41[a]	0.44[a]	0.47[a]
CL/F AMPH (L/h/Kg)								
CL/F LDX (L/h/Kg)								

[a] Parameter calculated with a smaller number of individuals compared to the total number of individuals described.
[b] Multiple dose study with pharmacokinetic measurement on the last day of drug intake.
[c] Solvent not specified.
LOQ = limit of quantification; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; C_{max} = maximum (peak) concentration; AUC_{0-t} = area under the curve from time zero to the last time of concentration determined; $AUC_{0-\infty}$ = area under the curve from time zero to infinity; $t_{½}$ = elimination half-life; CL/F = apparent total clearance after oral administration.

Table 1: Pharmacokinetic studies of single dose in humans (cont).

	(JASINSKI; KRISHNAN, 2009)		(ERMER et al., 2010)					(ERMER et al., 2011)	
Population studied	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)
Gender	Male	Male	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male	Male
Condition/Disease	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy
Number of individuals	3	9	20	20	18	12	9	18	18
Presentation (mg)	25	50	50	100	150	200	250	50	50 marked with ^{99m}Tc-diathylenetriamine pentaacetic acid
Pharmaceutical form			Capsule	Capsule	Capsule	Capsule	Capsule	Capsule	Solution
Feeding Status			Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Administration	Intravenous	Intravenous	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Intranasal
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Collection points (h)	Pre-dose, 0.08, 0.16, 0.33, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 16, 24	Pre-dose, 0.08, 0.16, 0.33, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 16, 24	Pre-dose, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72	Pre-dose, 0.08, 0.16, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72
Equipment	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Extraction								Liquid-Liquid[c]	Liquid-Liquid[c]
Alíquot of sample extracted								200 µL	200 µL
LOQ AMPH (ng/mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
LOQ LDX (ng/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
t_{max} AMPH (h)	2.5	2.5	4	4	4	6	6	4.4	4.8
t_{max} LDX (h)	Chart	Chart	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.2	0.5
C_{max} AMPH (ng/mL)	20.7	38.9	44.6	84.6	126.6	168.8	246.3	37.6	35.9
C_{max} LDX (ng/mL)	Chart	chart	25.6	63.8	99.5	127.7	185.6	19.8	50.4
AUC_{0-t} AMPH (ng·h/mL)	319.5	562.7	763.1	1485.1	2429.3	3265.5	5056.8	719.1	690.5
AUC_{0-t} LDX (ng·h/mL)			28.1	96.0	135.1	188.9	307.6	23.4	48.3
$AUC_{0-\infty}$ AMPH (ng·h/mL)			818.1	1548.2	2503.4	3336.2	5132.5	776.9	746.2
$AUC_{0-\infty}$ LDX (ng·h/mL)			62.1	94.0	151.7	214.9	345.8	25.2	49.3
$t_{½}$ AMPH (h)			11.3	11.1	10.9	11.3	12.4		
$t_{½}$ LDX (h)			0.6	0.7	0.7	0.9	0.9		
CL/F AMPH (L/h/Kg)									
CL/F LDX (L/h/Kg)									

[a] Parameter calculated with a smaller number of individuals compared to the total number of individuals described.
[b] Multiple dose study with pharmacokinetic measurement on the last day of drug intake.
[c] Solvent not specified.
LOQ = limit of quantification; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; C_{max} = maximum (peak) concentration; AUC_{0-t} = area under the curve from time zero to the last time of concentration determined; $AUC_{0-\infty}$ = area under the curve from time zero to infinity; $t_{½}$ = elimination half-life; CL/F = apparent total clearance after oral administration.

Table 1: Pharmacokinetic studies of single dose in humans (cont).

	(ERMER et al., 2012)				(ERMER et al., 2013a)					
Population studied	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (55-64 years)	Adults (55-64 years)	Adults (65-74 years)	Adults (65-74 years)	Adults (≥75 years)	Adults (≥75 years)
Gender	Male	Male	Male	Male	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Condition/Disease'	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy
Number of individuals	18	17	17	16	8	9	8	8	8	6
Presentation(mg)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Pharmaceutical form	Capsule	Capsule	Capsule	Capsule						
Feeding Status	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted						
Administration	Oral	Oral with release in the proximal small bowel	Oral with release in the distal small bowel	Oral with release in the ascending large bowel	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Collection points (h)	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72
Equipment	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Extraction	Liquid-Liquid[c]	Liquid-Liquid[c]	Liquid-Liquid[c]	Liquid-Liquid[c]	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Líquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)
Alíquot of sample extracted	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
LOQ AMPH (ng/mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
LOQ LDX (ng/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
t_{max} AMPH (h)	5	4	5	8	4.5	3.5	3.5	4.1	5.5	5.5
t_{max} LDX (h)	1	0.8	0.8	0.8[a]	1.5	1.0	1.0	1.5	1.8	1.8
C_{max} AMPH (ng/mL)	37.6	40.5	38.7	25.7	44.2	51.0	47.7	50.2	53.4	64.3
C_{max} LDX (ng/mL)	19.8	28.2	36.6	2.8	24.7	41.3	33.6	27.5	25.4	43.0
AUC_{0-t} AMPH (ng·h/mL)	719.1	771.2	752.4	574.3						
AUC_{0-t} LDX (ng·h/mL)	23.4	33.4	45.9	3.0						
$AUC_{0-\infty}$ AMPH (ng·h/mL)	776.9	839.8	811.9	635.3	915.0[a]	1034.5	1123.0	988.4	1325.0	1347.8
$AUC_{0-\infty}$ LDX (ng·h/mL)	25.2[a]	35.1	47.1	12.7[a]	35.3[a]	43.8	38.7[a]	28.5[a]	37.6	51.9[a]
$t_{½}$ AMPH (ho)	11.6	11.8	11.2	11.5	12.8[a]	12.2	15.0	12.8	14.3	13.3
$t_{½}$ LDX (h)	0.5[a]	0.5	0.5	0.7[a]	0.6[a]	0.5	0.6[a]	0.9[a]	0.7	0.7[a]
CL/F AMPH (L/h/Kg)					0.8[a]	0.7	0.64	0.7	0.6	0.57
CL/F LDX (L/h/Kg)					19.8	17.1	19.2[a]	25.3[a]	20.0	15.5[a]

[a] Parameter calculated with a smaller number of individuals compared to the total number of individuals described.
[b] Multiple dose study with pharmacokinetic measurement on the last day of drug intake.
[c] Solvent not specified.
LOQ = limit of quantification; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; C_{max} = maximum (peak) concentration; AUC_{0-t} = area under the curve from time zero to the last time of concentration determined; $AUC_{0-\infty}$ = area under the curve from time zero to infinity; $t_{½}$ = elimination half-life; CL/F = apparent total clearance after oral administration.

Table 7: Pharmacokinetic studies on joint administration with other medications in humans.

	(HAFFEY et al., 2009)		(ERMER et al., 2013b)[b]			(ROESCH et al., 2013)	
Combination	LDX 50 mg	LDX 50 mg + omeprazole 40 mg	LDX 70 mg	LDX 70 mg/day + VXR 225 mg/day with initial LDX alone	LDX 70 mg/day + VXR 225 mg/day with initial VXR alone	LDX 50 mg	LDX 50 mg + GXR 4 mg
Population studied	Adult (18-45 years)	Adults (18-45 years)	Adults (18-45 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-55 years)	Adults (18-45 years)	Adults (18-45 years)
Gender	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female
Condition/Disease	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy
Number of individuals	21	21	31	31	33	41	41
Pharmaceutical form	Capsule	Capsule	Capsule	Capsule	Capsule		
Feeding Status	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted		
Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Collecton points (h)	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12, 24	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12, 24	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12, 24	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 48, 72	Pre-dose, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 48, 72
Equipment	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Extraction			Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid (ethyl acetate:toluene)	Liquid-Liquid[c]	Liquid-Liquid[c]
Alíquot of sample extracted	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
LOQ AMPH (ng/mL)	2	2	2	2	2	2	2
LOQ LDX (ng/mL)	1	1	1	1	1	1	1
t_{max} AMPH (h)	3	3	3.5	3.2	3.1	4.2	3.9
t_{max} LDX (h)			1.1	1.1	1.0	1.1	1.1
C_{max} AMPH (ng/mL)	45.0	46.3	88.9	88.9	85.3	36.48	36.50
C_{max} LDX (ng/mL)			49.1	49.8	50.8	26.14	27.13
AUC_{0-t} AMPH (ng·h/mL)							
AUC_{0-t} LDX (ng·h/mL)							
$AUC_{0-\infty}$ AMPH (ng·h/mL)	713.0	761.6				686.9	708.4
$AUC_{0-\infty}$ LDX (ng·h/mL)							
$AUC_{0-\tau}$ AMPH (ng·h/mL)			1143.4	1135.4	1049.2		
$AUC_{0-\tau}$ LDX (ng·h/mL)			65.5	63.9	60.8		
$t_{½}$ AMPH (h)	9.7	10.4	10.4	9.8	9.7	11.2	11.2
$t_{½}$ LDX (h)			0.4	0.4	0.4		
CL/F AMPH (L/h)						0.99[d]	0.95[d]
CL/F LDX (L/h)							
Vd/F AMPH (L/Kg)						15.58[d]	15.11[d]
Vd/F LDX (L/Kg)							

[a] Parameter calculated with a smaller number of individuals compared to the total number of individuals described.
[b] Multiple dose study.
[c] Solvent not specified.
[d] Values normalized by weight (L/h/Kg).
LOQ = limit of quantification; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; C_{max} = maximum (peak) concentration; AUC_{0-t} = area under the curve from time zero to the last time of concentration determined; $AUC_{0-\infty}$ = area under the curve from time zero to infinity; $AUC_{0-\tau}$ = area under the curve during a dosage interval; $t_{½}$ = elimination half-life; CL/F = apparent total clearance after oral administration; V_d/F = apparent volume of distribution after non-intravenous administration; GXR = guanfacine; VXR = venlafaxine.

Table 2: Pharmacokinetic studies on joint administration with other medications (cont.).

	(MARTIN et al., 2014)[b]						(ERMER; CORCORAN; MARTIN, 2015)
Combination	LDX 50 mg + antipsychotic	LDX 70 mg+ antipsychotic	LDX 100 mg + antipsychotic	LDX 150 mg + antipsychotic	LDX 200 mg + antipsychotic	LDX 250 mg + antipsychotic	LDX 70 mg + caffeine 200 mg + dextromethorphan 30 mg + omeprazole 40 mg + midazolam 0.025 mg/Kg
Population studied	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-65 years)	Adults (18-45 years)
Gender	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female	Male and female
Condition/Disease	Schizophrenia	Schizophrenia	Schizophrenia	Schizophrenia	Schizophrenai	Schizophrenia	Healthy
Numero of individuals	24	24	23	22	21	21	29
Pharmaceutical form							
Feeding Status							Fasted
Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Collection points (h)	Pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12	Pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12	Pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12	Pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12	Pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12	Pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72	Pre-dose, 0-72
Equipment	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Extraction							Protein precipitation (acetonitrile:formic acid)
Alíquot of sample extracted							100 µL
LOQ AMPH (ng/mL)	2	2	2	2	2	2	2
LOQ LDX (ng/mL)	1	1	1	1	1	1	1
t_{max} AMPH (h)	3.8	3.8	3.9	4.3	4.8	4.6	4.4
t_{max} LDX (h)	1.3	1.3	1.3	1.2	1.4	1.4	1.5
C_{max} AMPH (ng/mL)	51.7	74.8	109.0	153.6	207.0	266.3	74.60
C_{max} LDX (ng/mL)	21.9	35.0	50.6	90.3	133.3	181.5	43.88
AUC_{0-t} AMPH (ng·h/mL)							
AUC_{0-t} LDX (ng·h/mL)							
$AUC_{0-\infty}$ AMPH (ng·h/mL)							1310.3
$AUC_{0-\infty}$ LDX (ng·h/mL)							62.0[a]
$AUC_{0-\tau}$ AMPH (ng·h/mL)	801.8	1139.8	1712.2	2465.0	3402.5	4397.9	
$AUC_{0-\tau}$ LDX (ng·h/mL)	25.6	43.7	80.5	144.9	230.2	301.5	
$t_{½}$ AMPH (h)							11.09
$t_{½}$ LDX (h)							0.56[a]
CL/F AMPH (L/h)	65.0	64.5[a]	61.2[a]	62.7	60.7[a]	60.5	54.55
CL/F LDX (L/h)							1235.50[a]
Vd/F AMPH (L/Kg)							867.07
Vd/F LDX (L/Kg)							987.49[a]

[a] Parameter calculated with a smaller number of individuals compared to the total number of individuals described.
[b] Multiple dose study.
[c] Solvent not specified.
[d] Values normalized by weight (L/h/Kg).
LOQ = limit of quantification; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; C_{max} = maximum (peak) concentration; AUC_{0-t} = area under the curve from time zero to the last time of concentration determined; $AUC_{0-\infty}$ = area under the curve from time zero to infinity; $AUC_{0-\tau}$ = area under the curve during a dosage interval; $t_{½}$ = elimination half-life; CL/F = apparent total clearance after oral administration; V_d/F = apparent volume of distribution after non-intravenous administration; GXR = guanfacine; VXR = venlafaxine.

Data on multiple dose pharmacokinetics, analyzed more carefully with respect to multiple dose parameters, in humans were found in one article (KRISHNAN; STARK, 2008). Eleven adults (men and women aged 18 to 55 years) took a 70 mg capsule of LDX when fasting. The blood was collected pre-dose on days 1, 5, 6 e 7 and post dose on day 7 at times 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72 h. The matrix used, as well as the equipment and LOQ for AMPH and LDX were the same as the methods mentioned previously. The t_{max}, maximum concentration observed in the stationary state ($C_{max,ss}$), mean concentration in the stationary state (C_{med}) and minimum concentration observed in the stationary state ($C_{min,ss}$) attained for AMPH were 3.0 h, 90.1 ng/mL, 46.4 ng/mL and 18.2 ng/mL, respectively, and for LDX 1.0 h, 47.9 ng/mL, 2.5 ng/mL and 0.0 ng/mL, respectively. On the other hand the area under the time curve 0 to 24 hours (AUC_{0-24}) and the Fluctuation Index (FI) found for AMPH were 1110.0 ng·h/mL and 164 %, respectively, and for LDX they were 60.7 ng·h/mL and 1900 %, respectively. Also, in this study, which is concordant with the reality of ADHD treatment, it was observed that the administration of a single daily dose of 70 mg of LDX orally produces stationary state concentrations of *d*-AMPH on the fifth day after the first administration. There is no accumulation of LDX and AMPH in the stationary state, and the AUC of intact LDX is approximately 5% of the *d*-AMPH. The levels of intact LDX fall below the detectable level in approximately 6 hours after the final dose, and 95% of the AMPH is eliminated in 48 hours after the final dose (KRISHNAN; STARK, 2008).

4 OTHER PHARMACOKINETIC CHARACTERISTICS

The therapeutic oral doses of 30 to 70 mg LDX result in a pharmacokinetics that is proportional to the dose for systemic exposure and peak of exposure to *d*-AMPH, but not to intact LDX. The plasma concentrations of LDX present a more than proportional increase with the increase of oral doses of LDX (BOELLNER et al., 2010). Identical results of proportionality for *d*-AMPH were found up to supratherapeutic doses of LDX of 50 to 250 mg in healthy adults, indicating that there is no enzyme saturation in the conversion of LDX into *d*-AMPH. Consequently, larger doses of LDX result in higher blood levels of *d*-AMPH, demonstrating that there is no

protection against superdosages at least up to 250 mg of LDX (ERMER et al., 2010; MARTIN et al., 2014).

The low intra and interindividual variability of the pharmacokinetic parameters in therapeutic and supratherapeutic doses (BIEDERMAN et al., 2007; KRISHNAN; PENNICK; STARK, 2008; BOELLNER et al., 2010; ERMER et al., 2010, 2011), measured by the coefficient of variation (% CV), may be a result of LDX being a pro-drug and thus not depending on typical release mechanisms connected to the formulation (BIEDERMAN et al., 2007; BOELLNER et al., 2010). Other factors may also be responsible for this low variability and for the consistent delivery of *d*-AMPH among patients, such as the high solubility in water, resistance to changes in the gastric environment and pH on absorption/conversion, the gradual enzymatic conversion of LDX into *d*-AMPH and not saturable in therapeutic doses and high capacity metabolism through the red blood cells (PENNICK, 2010). Pharmacokinetics proportional to the dose of active product with low interindividual variability found in studies with a small number of participants may be useful to optimize the dosage and tolerability in a diverse population (BOELLNER et al., 2010).

Systemic exposure to intact LDX in children appears to be greater in girls than in boys, even when AUC and C_{max} are normalized by dose per weight (BOELLNER et al., 2010). In adults up to the age of 55 years, when the exposure parameters (AUC and C_{max}) were normalized by body weight, the systemic exposure to *d*-AMPH and LDX was not affected by gender (KRISHNAN; ZHANG, 2008). In adults over 55 years of age the results obtained in the pharmacokinetic parameters for both genders were considered similar, both for *d*-AMPH and for LDX, but without normalization according to weight (ERMER et al., 2013a).

The route of administration may affect the pharmacokinetic parameters of a substance and increase its reinforcement properties by beginning action faster focusing on its potential for abuse. This is especially the case of the smoked, injected and inhaled forms of administration, whose action begins much faster than by oral route, which has a lower addictive potential but can also act as reinforcement, especially at a high dose (COMPTON; VOLKOW, 2006). LDX dimesylate is approved for oral administration, but like other stimulant medications it may be misused or abused by intranasal administration. Therefore, the pharmacokinetics of LDX by

intranasal administration was studied and compared with the oral route of administration. In oral administration there was a correlation between the absorption of intact LDX and the appearance of *d*-AMPH, while intranasally, the rapid absorption and redistribution of intact LDX was followed by a second, slower absorption phase, without generating two peaks of *d*-AMPH absorption. Hence, the plasma concentrations and systemic exposure related to *d*-AMPH were similar in both routes studied (ERMER et al., 2011).

4 CONCLUSIONS

Alterations of gastric pH or gastrointestinal transit do not appear to affect LDX solubility. The bioavailability of *d*-AMPH resulting from the administration of the pro-drug is bioequivalent when administered in the form of a capsule or solution, and fasted or fed, although foods diminish C_{max} and prolong t_{max}. This difference in the fed state for the parameters mentioned may be partly the cause of the different values obtained for the studies in the table. LDX is absorbed intact from the small bowel and biotransformed into *d*-AMPH in the red blood cells.

The systemic exposure to *d*-AMPH increases with the dose of LDX. This is an extremely important factor in clinical practice to titer the dosage and patient adaptation. As previously mentioned, when administered in combination with other drugs, the pharmacokinetic parameters do not vary much, probably because the conversion does not occur in cytochrome P450, thus characterizing the suitability of joint use with some drugs in clinical practice when necessary in comorbidities. Elimination is predominantly renal, and almost half this excretion occurs in the form of AMPH.

This review showed that LDX pharmacokinetics was studied under various conditions. However, as yet there are no studies to characterize the enzymes responsible for the biotransformation of LDX within the red blood cells, and also studies about the distribution of this drug in the body. It is further found, by gathering the data presented, that there is a scarcity of studies and research in the literature on other biological matrices for analysis, which would result in a better understanding of the behavior of this drug in the human body. This knowledge is needed to help the toxicological analyses regarding the possibility of detection in other biological

matrices and for the interpretation of results related to time of detection and biotransformation.

Interindividual variability is an important factor in a uniform response to treatments, despite the broad spectrum of psychic disorder presentations. In general, the articles report a small variability of the data obtained. However, when equal dosages are compared in similar studies, systemic exposure to the drug presents a certain difference. This occurs even if the methods of analysis used are very similar or applied at the same site. The articles evaluate variability in their studies and report that it is low, possibly because the conditions are the same among intrastudy volunteers. However, when studies from different articles are compared, it is observed that variability may be greater than reported, and there is a need for a more complex and critical evaluation for a better conclusion. This result would require the process of developing a dosage regime for groups of patients.

The literature review was thorough, gathering data involving the pharmacokinetics of LDX, focusing on the data from original clinical studies. The objective of gathering the results from literature besides updating knowledge regarding the subject was accomplished. This is the first robust review on this topic with data from all clinical pharmacokinetic studies available in the literature. The specific pharmacokinetics of LDX plays a major role in studying this pro-drug, since this knowledge was fundamental to understand some reports of clinical effects from literature, such as the small probability of reducing the effect by interactions, the long duration effect and the still debatable reduction of the potential for abuse. In general, the already well known pharmacokinetic properties of the AMPH make LDX relatively predictable, simplifying the use of LDX in clinical practice.

REFERENCES

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th ed. ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.

ARNSTEN, A. F. T. The Emerging Neurobiology of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The Key Role of the Prefrontal Association Cortex. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. S22–S31, 1 maio 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2894421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 18 jun. 2014.

BIEDERMAN, J.; BOELLNER, S. W.; CHILDRESS, A.; LOPEZ, F. a; KRISHNAN, S.;

ZHANG, Y. Lisdexamfetamine dimesylate and mixed amphetamine salts extended-release in children with ADHD: a double-blind, placebo-controlled, crossover analog classroom study. **Biological psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 970–6, 1 nov. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631866>. Acesso em: 17 fev. 2014.

BOELLNER, S. W.; STARK, J. G.; KRISHNAN, S.; ZHANG, Y. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a single-dose, randomized, open-label, crossover. **Clinical therapeutics**, v. 32, n. 2, p. 252–64, fev. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206783>. Acesso em: 17 fev. 2014.

BUKSTEIN, O. G.; HORNER, M. S. Management of the adolescent with substance use disorders and comorbid psychopathology. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 609–23, jul. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682224>. Acesso em: 17 fev. 2014.

COMPTON, W. M.; VOLKOW, N. D. Abuse of prescription drugs and the risk of addiction. **Drug and alcohol dependence**, v. 83 Suppl 1, p. S4–7, jun. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563663>. Acesso em: 23 jul. 2014.

ERMER, J. C.; DENNIS, K.; HAFFEY, M. B.; DOLL, W. J.; SANDEFER, E. P.; BUCKWALTER, M.; PAGE, R. C.; DIEHL, B.; MARTIN, P. T. Intranasal versus Oral Administration of Lisdexamfetamine Dimesylate: A Randomized, Open-Label, Two-Period, Crossover, Single-Dose, Single-Centre Pharmacokinetic Study in Healthy Adult Men. **Clinical Drug Investigation**, v. 31, n. 6, p. 357–70, jan. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539403>. Acesso em: 14 jun. 2014.

ERMER, J. C.; HAFFEY, M. B.; DOLL, W. J.; MARTIN, P.; SANDEFER, E. P.; DENNIS, K.; CORCORAN, M.; TRESPIDI, L.; PAGE, R. C. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate after targeted gastrointestinal release or oral administration in healthy adults. **Drug metabolism and disposition**, v. 40, n. 2, p. 290–7, fev. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039171>. Acesso em: 14 ago. 2014.

ERMER, J.; CORCORAN, M.; MARTIN, P. Lisdexamfetamine Dimesylate Effects on the Pharmacokinetics of Cytochrome P450 Substrates in Healthy Adults in an Open-Label, Randomized, Crossover Study. **Drugs in R&D**, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40268-015-0090-z>.

ERMER, J.; HAFFEY, M. B.; RICHARDS, C.; LASSETER, K.; ADEYI, B.; CORCORAN, M.; STANTON, B.; MARTIN, P. Double-blind, placebo-controlled, two-period, crossover trial to examine the pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy older adults. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 9,

p. 219–29, jan. 2013a. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3575217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 14 ago. 2014.

ERMER, J.; HAFFEY, M. B.; RICHARDS, C.; LASSETER, K.; ROESCH, B.; PURKAYASTHA, J.; CORCORAN, M.; HARLIN, B.; MARTIN, P. An open-label investigation of the pharmacokinetic profiles of lisdexamfetamine dimesylate and venlafaxine extended-release, administered alone and in combination, in healthy adults. **Clinical Drug Investigation**, v. 33, n. 4, p. 243–254, 2013b.

ERMER, J.; HOMOLKA, R.; MARTIN, P.; BUCKWALTER, M.; PURKAYASTHA, J.; ROESCH, B. Lisdexamfetamine dimesylate: linear dose-proportionality, low intersubject and intrasubject variability, and safety in an open-label single-dose pharmacokinetic study in healthy adult volunteers. **Journal of clinical pharmacology**, v. 50, n. 9, p. 1001–10, set. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173084>. Acesso em: 17 fev. 2014.

GOODMAN, D. W. Lisdexamfetamine dimesylate (Vyvanse), a prodrug stimulant for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 273–87, maio 2010.

HAFFEY, M. B.; BUCKWALTER, M.; ZHANG, P.; HOMOLKA, R.; MARTIN, P.; LASSETER, K. C.; ERMER, J. C. Effects of omeprazole on the pharmacokinetic profiles of lisdexamfetamine dimesylate and extended-release mixed amphetamine salts in adults. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 5, p. 11–19, 2009.

HÄGE, A.; DITTMANN, R. W.; PENNICK, M.; SOROOSHIAN, S.; ERMER, J.; ADEYI, B.; SQUIRES, L.; COGHILL, D. R. P.7.f.009 Lisdexamfetamine dimesylate: hydrolysis, pharmacokinetics and duration of therapeutic action in children and adolescents with ADHD. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. S733–S734, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X14711824>.

HEAL, D. J.; CHEETHAM, S. C.; SMITH, S. L. The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7-8, p. 608–18, dez. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761781>. Acesso em: 30 jan. 2014.

HUTSON, P. H.; PENNICK, M.; SECKER, R. Preclinical pharmacokinetics, pharmacology and toxicology of lisdexamfetamine: A novel d-amphetamine pro-drug. **Neuropharmacology**, v. 87C, p. 41–50, dez. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594478>. Acesso em: 16 dez. 2014.

JASINSKI, D. R.; KRISHNAN, S. Human pharmacology of intravenous lisdexamfetamine dimesylate: abuse liability in adult stimulant abusers. **Journal of psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 410–8, jun. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635707>. Acesso em: 17 fev. 2014.

KRISHNAN, S. M.; PENNICK, M.; STARK, J. G. Metabolism, Distribution and Elimination of Lisdexamfetamine Dimesylate Open-Label, Single-Centre, Phase I Study in Healthy Adult Volunteers. **Clinical Drug Investigation**, v. 28, n. 12, p. 745–755, 2008.

KRISHNAN, S. M.; STARK, J. G. Multiple daily-dose pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy adult volunteers. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 1, p. 33–40, 1 jan. 2008. Disponível em: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0300-7995&volume=24&issue=1&spage=33>. Acesso em: 20 ago. 2014.

KRISHNAN, S.; MONCRIEF, S. An evaluation of the cytochrome p450 inhibition potential of lisdexamfetamine in human liver microsomes. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 35, n. 1, p. 180–4, jan. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035599>. Acesso em: 3 jul. 2014.

KRISHNAN, S.; ZHANG, Y. Relative bioavailability of lisdexamfetamine 70-mg capsules in fasted and fed healthy adult volunteers and in solution: a single-dose, crossover pharmacokinetic study. **Journal of clinical pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 293–302, mar. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285619>. Acesso em: 17 fev. 2014.

MARTIN, P.; DIRKS, B.; GERTSIK, L.; WALLING, D.; STEVENSON, A.; CORCORAN, M.; RAYCHAUDHURI, A.; ERMER, J. Safety and Pharmacokinetics of Lisdexamfetamine Dimesylate in Adults With Clinically Stable Schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 682–689, 2014. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004714-201412000-00006>.

MCELROY, S. L.; HUDSON, J. I.; MITCHELL, J. E.; WILFLEY, D.; FERREIRA-CORNWELL, M. C.; GAO, J.; WANG, J.; WHITAKER, T.; JONAS, J.; GASIOR, M. Efficacy and Safety of Lisdexamfetamine for Treatment of Adults With Moderate to Severe Binge-Eating Disorder. **JAMA Psychiatry**, 2015.

PENNICK, M. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 6, p. 317–27, jan. 2010.

PENNICK, M. Metabolism of the prodrug lisdexamfetamine dimesylate in human red blood cells from normal and sickle cell disease donors. **Journal of Drug Assessment**, v. 2, p. 17–20, 2013.

ROESCH, B.; CORCORAN, M. E.; FETTEROLF, J.; HAFFEY, M.; MARTIN, P.; PRESTON, P.; PURKAYASTHA, J.; WANG, P.; ERMER, J. Pharmacokinetics of coadministered guanfacine extended release and lisdexamfetamine dimesylate.

Drugs in R and D, v. 13, n. 2, p. 119–128, 2013.

SHARMAN, J.; PENNICK, M. Lisdexamfetamine prodrug activation by peptidase-mediated hydrolysis in the cytosol of blood cells. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 2275–2280, nov. 2014. Disponível em: <http://www.dovepress.com/lisdexamfetamine-prodrug-activation-by-peptidase-mediated-hydrolysis-i-peer-reviewed-article-NDT>.

SHIRE. **Highlights and Full Prescribing Information/Medication Guide. Revised 04/2015**. Disponível em: <http://pi.shirecontent.com/PI/PDFs/Vyvanse_USA_ENG.pdf>. Acesso em: 10 set. 2015.

WOOD, S.; SAGE, J. R.; SHUMAN, T.; ANAGNOSTARAS, S. G. Psychostimulants and Cognition: A Continuum of Behavioral and Cognitive Activation. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 193–221, 2013. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.112.007054>.

5 CAPÍTULO 2 – *LISDEXANFETAMINA: REVISÃO DE POTENCIAL PARA ABUSO*

5.1 Manuscrito II

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *“Lisdexanfetamina: revisão de potencial para abuso”* a ser submetido para publicação na revista *Current Clinical Pharmacology.* Essa revisão inclui os artigos encontrados na literatura referentes a estudos sobre potencial para abuso da LDX. Este manuscrito será traduzido e adaptado às normas de formatação da revista.

LISDEXANFETAMINA: REVISÃO DE POTENCIAL PARA ABUSO

Eloisa Comiran[*a], Graciela Carlos[1a], Félix Henrique Kessler[2b], Flavio Pechanksy[3b], Pedro Eduardo Fröehlich[4a] and Renata Pereira Limberger[5a]

[a]Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; [b]Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas of Porto Alegre - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

[*]Address correspondence to this author at the Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel/Fax: +55-51-3308-5762/+55-51-3308-5243; E-mail: eloisacomiran@gmail.com

RESUMO

O abuso de medicamentos de prescrição tem aumentado em todo o mundo, em alguns países superando até a prevalência de drogas ilegais, podendo ser considerado um relevante problema de saúde pública ainda subdiagnosticado. Apesar do potencial para abuso e desvio, os estimulantes são necessários para a melhora da qualidade de vida dos indivíduos com transtornos neuropsiquiátricos que são tratados com essas substâncias, como o TDAH e TCAP. Visto a importância destes medicamentos na saúde pública e o grande potencial para abuso e desvio, esta revisão aborda os artigos sobre potencial para abuso da LDX, o mais novo pró-fármaco da ANF, atualizando o conhecimento sobre o assunto. Foi realizada uma busca de artigos nas bases de dados MEDLINE e Science Direct (2007- 2015). Dados de apreensões forenses de LDX têm aumentado muito desde o início de sua comercialização. A LDX possui potencial para abuso e não deve ser negligenciado. Para deter o aumento significativo do abuso e dependência de medicamentos de prescrição é necessário desenvolver abordagens preventivas, corretivas e preditivas eficazes, garantindo a disponibilidade e uso racional para fins terapêuticos regulamentados e científicos baseados em evidência.

Palavras-chave: lisdexanfetamina, anfetamina, potencial para abuso, medicamentos de prescrição.

1 INTRODUÇÃO

O abuso de drogas e o uso não terapêutico de medicamentos são um grande problema em nível mundial, que atinge tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento, nas mais diversas classes sociais. Abuso é um termo frequentemente utilizado para descrever o uso intencional de substâncias ilícitas em qualquer quantidade e de grandes doses de substâncias lícitas para conseguir um efeito desejado, como euforia, sedação, alucinações. Por outro lado, o uso inadequado descreve o uso de uma substância para fins diferentes do aprovado pela agência regulatória do país, independente de prescrição médica, ou o uso para qual a substância foi aprovada, porém sem uma prescrição médica (COWLES, 2009).

O abuso de medicamentos prescritos aumentou em todas as regiões do globo, em alguns países superando até a prevalência de drogas ilegais, sendo considerado uma ameaça crescente à saúde pública (INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD, 2014). Nos Estados Unidos, o abuso e uso inadequado de medicamentos prescritos contendo substâncias controladas perdem apenas para a canábis, ficando acima da cocaína, heroína e metanfetamina (INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD, 2009). As consequências desse abuso têm sido cada vez mais graves, refletidas no aumento das admissões em tratamentos, atendimentos de emergência e mortes por overdose (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2011).

Segundo o relatório anual do United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), os estimulantes tipo-anfetamínicos correspondem ao segundo grupo de substâncias ilícitas mais comumente utilizado no mundo com uma média de 34,40 milhões de usuários (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014). A prevalência anual do uso indevido de estimulantes prescritos é de 0,7% no Brasil, empatado com o Canadá e perdendo apenas para El Salvador, Estados Unidos e Costa Rica. Entre os jovens, de 15 e 16 anos, este número é mais alto, contabilizando 1,7% no Brasil, atrás do Canadá e Costa Rica (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014). As causas atribuídas a este problema são a ampla disponibilidade desses medicamentos, bem como as percepções errôneas que medicamentos são mais seguros e menos suscetíveis ao abuso do que drogas ilícitas (INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD, 2014). O uso indevido de estimulantes incluem o uso destas substâncias com as finalidades de perda de peso, melhora do desempenho acadêmico e/ou trabalho, e uso recreacional, devido

aos efeitos de supressão do apetite, aumento do estado de alerta, foco e atenção, e euforia, respectivamente (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2014).

Os medicamentos estimulantes empregados para o tratamento dos sintomas do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) e narcolepsia têm sido tradicionalmente utilizados muito mais extensivamente nas Américas, apesar de a utilização ter aumentado também no resto do mundo (INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD, 2009). Estes estimulantes, da mesma forma que outras substâncias que afetam o sistema nervoso central, têm potencial para serem utilizados de forma inadequada, abusados e desviados para fins não terapêuticos (SWEENEY et al., 2013). Apesar dos problemas relacionados ao abuso de estimulantes, aproximadamente 70% das crianças e adultos com TDAH que são tratados com estes medicamentos respondem bem ao tratamento (PLISZKA, 2007) e, em geral, medicamentos estimulantes são superiores aos medicamentos não estimulantes para o tratamento de pacientes com TDAH (FARAONE et al., 2006). Assim, a lisdexanfetamina (LDX), um pró-fármaco da anfetamina (ANF), surge como uma tentativa da indústria farmacêutica de reduzir o potencial de abuso e manter a eficácia dos estimulantes para o tratamento dos sintomas do TDAH e do transtorno da compulsão alimentar periódica (TCAP) (MICKLE et al., 2006; KRISHNAN; ZHANG, 2008).

Apesar do potencial para abuso e desvio, os estimulantes são necessários para a melhora da qualidade de vida dos indivíduos com estes transtornos neuropsiquiátricos. Visto a importância destes medicamentos na saúde pública e o grande potencial para abuso e desvio, esta revisão aborda os artigos sobre potencial para abuso da LDX, o mais novo pró-fármaco da ANF, atualizando o conhecimento sobre o assunto. Foi realizada uma busca de artigos nas bases de dados MEDLINE e Science Direct (2007- 2015) com a expressão “lisdexamfetamine abuse”. Foram incluídos na revisão todos os artigos que estudaram o especificamente o potencial para abuso e alguns relacionados para auxiliar no entendimento.

2 ESTUDOS DE POTENCIAL DE ABUSO

As inovações da indústria farmacêutica na área de síntese e farmacotécnica podem auxiliar a contornar os aumentos significativos do abuso e dependência de

medicamentos de prescrição médica. Os estimulantes que possuem preparações de liberação prolongada, tais como o metilfenidato, sais mistos de ANF e dimesilato de LDX podem oferecer um menor potencial de abuso ou desvio devido a suas formas de administração, nível reduzido de reforço devido ao tempo mais gradual e longo para a concentração plasmática máxima e a capacidade de monitorar e supervisionar mais facilmente a administração feita apenas uma vez por dia (BUKSTEIN; HORNER, 2010).

A via de administração pela qual uma substância é utilizada possui um impacto importante sobre as propriedades farmacocinéticas relacionadas ao aumento do potencial de abuso, como a capacidade de ser absorvido mais rapidamente, de ter sua concentração aumentada no sistema nervoso central e de ter uma depuração mais rápida. Para muitas drogas, a mudança da via de administração oral normalmente utilizada para a forma fumada, injetada ou inalada pode diminuir o tempo para início do efeito e, assim, aumentar as propriedades de reforço (COMPTON; VOLKOW, 2006; ERMER et al., 2011). Para a LDX, com base nos resultados de comparação farmacocinética das vias de administração intranasal e oral, os autores sugerem que é pouco provável que o potencial de abuso difira entre as vias estudadas (ERMER et al., 2011).

Ao comparar a LDX com a ANF de libertação imediata equivalentes em *d*-ANF, a LDX possui liberação retardada e concentrações plasmáticas mais baixas o que provavelmente atrasa e atenua as variáveis farmacodinâmicas relacionadas ao potencial de abuso (JASINSKI; KRISHNAN, 2009a). Jasinski e Krishnan (JASINSKI; KRISHNAN, 2009a, 2009b) estudaram o potencial de abuso da LDX administrada via oral e via intravenosa em adultos com histórico de abuso de estimulantes utilizando diversas abordagens. No estudo da administração via oral, as dosagens de 50, 100 e 150 mg de LDX foram comparadas com 40 mg de sulfato de *d*-ANF e placebo. Considerando o peso em mol, o conteúdo de ANF base livre em 100 mg de LDX é equivalente ao conteúdo de ANF base livre em 40 mg sulfato de *d*-ANF. Os resultados para 150 mg de LDX e 40 mg de *d*-ANF foram semelhantes, mesmo o pró-fármaco possuindo um conteúdo muito maior de ANF base, porém mostrando a possibilidade de efeitos farmacológicos estimulantes quando a LDX é administrada em altas doses (JASINSKI; KRISHNAN, 2009b).

Quanto à administração via intravenosa, o estudo do potencial de abuso foi avaliado juntamente com a farmacocinética. O sulfato de *d*-ANF intravenosa produziu efeitos de apreciação e euforia significativos, enquanto doses equivalentes de *d*-ANF de LDX não se diferenciou significativamente do placebo. Além disso, o perfil farmacocinético de *d*-ANF após administração intravenosa de LDX mostrou uma concentração máxima menor e um maior t_{max}, além de uma menor variação de ambos, em contraste com a administração intravenosa de sulfato de *d*-ANF. Houve uma relação entre os níveis de *d*-ANF no plasma e os efeitos farmacodinâmicos, como os efeitos eufóricos e cardiovasculares. Os resultados mostraram que, quando administrada por via intravenosa, doses de até 50 mg de LDX não tem os efeitos de reforço e euforia observados com o equivalente de sulfato de *d*-ANF (JASINSKI; KRISHNAN, 2009a). Portanto, os estudos mostram que a potência deste fármaco se mantém relativamente constante independentemente da via de administração utilizada (HEAL et al., 2013). Cabe ressaltar que o estudo avaliou doses terapêuticas e que o efeito de doses maiores é ainda desconhecido.

Em ratos, ao comparar a administração de LDX com a administração de *d*-ANF foi observado que doses orais de LDX equivalentes a 1,5 mg/kg de *d*-ANF base não foram reconhecidos como *d*-ANF 15 minutos após a administração via oral, somente em 60 minutos houve esse reconhecimento que foi perdido aos 120 minutos. Estes resultados indicam que quando a LDX é administrada via oral há um atraso no início da discriminação dos efeitos semelhantes à *d*-ANF e duram pouco tempo. A mudança da via de administração da LDX de oral para intraperitoneal reduziu o tempo para que os efeitos discriminativos semelhantes à *d*-ANF fossem detectados pelos ratos, mas não melhorou a potência do pró-fármaco. Sendo assim, a via de administração carece de efeito sobre a potência da LDX também em ratos. Ainda, a LDX não mantém a autoadministração intravenosa em níveis maiores que salina quando testado através de uma gama de doses, indicando que este pró-fármaco não serve como um reforço positivo em ratos treinados em cocaína (HEAL et al., 2013).

Em experimentos farmacocinéticos/farmacodinâmicos utilizando microdiálise intracerebral em ratos foi observado que uma dose 3.3 vezes maior causa um aumento na ASC e C_{max} para *d*-ANF de 3.13 e 3,14 vezes, respectivamente. No entanto, o t_{max} permaneceu constante e o tempo de meia vida ($t_{½}$) não foi

significativamente alterado (ROWLEY et al., 2012). Corroborando com estudos anteriores de abuso em humanos (JASINSKI; KRISHNAN, 2009b) em que o perfil da LDX mudou levemente quando a dose foi aumentada. Farmacologicamente, houve um aumento muito maior de efluxo de dopamina no estriado o qual foi acompanhado por um aumento intenso e prolongado da atividade locomotora (ROWLEY et al., 2012).

O maior tempo para atingir o efeito máximo e a atenuação dos efeitos de apreciação máximos sobre as medidas do potencial de abuso (corroborado pelo atraso no tempo para o pico das medidas cardiovasculares), juntamente com a incapacidade de extrair facilmente *d*-ANF, sugerem que a LDX tem baixo risco de adulteração e pode ter um menor potencial para abuso por via oral comparado com a *d*-ANF. Além disso, a menor variação dos parâmetros farmacocinéticos promove uma liberação mais consistente de d-ANF em relação à administração da própria *d*-ANF (JASINSKI; KRISHNAN, 2009a, 2009b).

No uso crônico da LDX pode ocorrer tolerância (SHIRE, 2015), que é caracterizada pela necessidade de tomar doses mais elevadas de um medicamento para conseguir o mesmo efeito. Pode ser difícil para o médico determinar se um paciente está desenvolvendo dependência, ou tem uma necessidade médica verdadeira de doses mais elevadas para controlar os seus sintomas. Por esta razão, os médicos precisam estar vigilantes e atentos para os sintomas do paciente e nível de funcionamento para tratá-los de forma adequada (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2011). Ainda, na utilização de LDX pode ocorrer dependência (SHIRE, 2015), que ocorre devido a adaptações normais à exposição crônica e resulta em sintomas de abstinência, como fadiga extrema e depressão, quando o uso do medicamento é abruptamente reduzido ou interrompido (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta de ANF, suas propriedades e seu uso em nossa sociedade data de muito tempo. Portanto, os benefícios de seu uso terapêutico e os danos do seu abuso e uso inadequado já estão bem estabelecidos. Uso terapêutico da ANF e

seus precursores é controlado e deve ser acompanhado por uma prescrição médica, o que não elimina o uso inadequado e o potencial para o abuso.

Prever se uma substância corre o risco de ser desviada e abusada, fundamentando-se nos resultados de experimentos pré-clínicos ou ensaios clínicos em voluntários humanos com histórico de abuso, é incerto porque muitos outros fatores entram em jogo no mundo real. Dentre estes fatores, podem ser citados o quão bem o perfil euforizante e estimulante da substância se encaixa na cultura e contexto de abuso recreativo em determinada sociedade, que varia muito entre os países, a disponibilidade e custo das alternativas, o perfil farmacocinético, e a capacidade de aumentar a experiência psicoestimulante através do emprego de vias de administração não clínicas (HEAL et al., 2013). Ainda, fatores não relacionados às características específicas da droga, tais como disponibilidade, custo, atenção da mídia e influências de amigos também podem ser determinantes (HUTSON; PENNICK; SECKER, 2014).

Para deter o aumento significativo do abuso e dependência de medicamentos de prescrição é necessário desenvolver abordagens preventivas, corretivas e preditivas eficazes. O Conselho Internacional de Controle de Narcóticos da Organização das Nações Unidas prevê um aumento da vigilância relacionada ao desvio, tráfico e abuso de estimulantes da Lista II da Convenção de 1971 em alguns países, em particular naqueles com altos níveis de prescrição para essas substâncias (INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD, 2009). Intensificar o controle sobre estimulantes farmacêuticos deve ser considerado para reduzir a sua utilização indevida e abusiva. No entanto, é importante garantir a disponibilidade e promover o uso racional dessas substâncias para fins terapêuticos regulamentados e científicos baseados em evidência. Ainda, para auxiliar em abordagens de diferenciação entre o uso legal e ilegal em toxicologia clínica e forense é necessário investimento em novas metodologias analíticas e aprimoramento das já existentes para melhor execução dessa difícil tarefa.

A indústria farmacêutica pode auxiliar preventivamente investindo em pesquisas para novos medicamentos e novas formulações com possibilidade de reduzido potencial para o abuso e manutenção de eficácia, bem como provendo os laboratórios de toxicologia com padrões analíticos e informações que não estão disponíveis em publicações acerca dos seus medicamentos. No entanto, o caminho da ciência nesse sentido é longo, uma vez que os efeitos farmacológicos

responsáveis pela eficácia em alguns distúrbios são os mesmos responsáveis pelo potencial de abuso, e que ainda não tem sido possível separar estes dois componentes. Este é o caso dos derivados da ANF para o tratamento dos sintomas do TDAH.

Dados de um sistema nacional americano que recolhe sistematicamente resultados de identificação de substâncias analisadas por laboratórios forenses de casos de apreensões revelam que houve um aumento de 4 casos de identificação forense de LDX em 2007 para 1097 em 2011, demonstrando que, embora a LDX possa ter um menor potencial para abuso, sua utilização indevida tem crescido juntamente com a sua distribuição legalizada que aumentou mais de 700% entre 2007 e 2011 (U.S. DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION; OFFICE OF DIVERSION CONTROL, 2012).

A LDX é um exemplo da tentativa da indústria farmacêutica para diminuir o potencial de abuso da ANF para o tratamento de sintomas do TDAH e do TCAP. No entanto, deve-se considerar que, embora o potencial de abuso possa ser reduzido, ele ainda existe e não deve ser negligenciado visto que os efeitos estimulantes aumentam com o aumento da dose e que não há proteção contra superdosagem.

REFERÊNCIAS

BUKSTEIN, O. G.; HORNER, M. S. Management of the adolescent with substance use disorders and comorbid psychopathology. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 609–23, jul. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682224>. Acesso em: 17 fev. 2014.

COMPTON, W. M.; VOLKOW, N. D. Abuse of prescription drugs and the risk of addiction. **Drug and alcohol dependence**, v. 83 Suppl 1, p. S4–7, jun. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563663>. Acesso em: 23 jul. 2014.

COWLES, B. J. Update on the management of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adults: patient considerations and the role of lisdexamfetamine. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 5, p. 943–8, jan. 2009.

ERMER, J. C.; DENNIS, K.; HAFFEY, M. B.; DOLL, W. J.; SANDEFER, E. P.; BUCKWALTER, M.; PAGE, R. C.; DIEHL, B.; MARTIN, P. T. Intranasal versus Oral Administration of Lisdexamfetamine Dimesylate: A Randomized, Open-Label, Two-Period, Crossover, Single-Dose, Single-Centre Pharmacokinetic Study in Healthy

Adult Men. **Clinical Drug Investigation**, v. 31, n. 6, p. 357–70, jan. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539403>. Acesso em: 14 jun. 2014.

FARAONE, S. V.; BIEDERMAN, J.; SPENCER, T. J.; ALEARDI, M. Comparing the efficacy of medications for ADHD using meta-analysis. **Medscape General Medicine**, v. 8, n. 4, p. 4, 2006.

HEAL, D. J.; BUCKLEY, N. W.; GOSDEN, J.; SLATER, N.; FRANCE, C. P.; HACKETT, D. A preclinical evaluation of the discriminative and reinforcing properties of lisdexamfetamine in comparison to D-amfetamine, methylphenidate and modafinil. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 348–58, out. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748096>. Acesso em: 21 ago. 2014.

HUTSON, P. H.; PENNICK, M.; SECKER, R. Preclinical pharmacokinetics, pharmacology and toxicology of lisdexamfetamine: A novel d-amphetamine pro-drug. **Neuropharmacology**, v. 87C, p. 41–50, dez. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594478>. Acesso em: 16 dez. 2014.

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD. **Report of the International Narcotics Control Board for 2008**. New York: United Nations, 2009. .

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD. **Report of the International Narcotics Control Board for 2013**. New York: United Nations, 2014. .

JASINSKI, D. R.; KRISHNAN, S. Human pharmacology of intravenous lisdexamfetamine dimesylate: abuse liability in adult stimulant abusers. **Journal of psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 410–8, jun. 2009a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635707>. Acesso em: 17 fev. 2014.

JASINSKI, D. R.; KRISHNAN, S. Abuse liability and safety of oral lisdexamfetamine dimesylate in individuals with a history of stimulant abuse. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 23, n. 4, p. 419–27, jun. 2009b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329547>. Acesso em: 17 fev. 2014.

KRISHNAN, S.; ZHANG, Y. Relative bioavailability of lisdexamfetamine 70-mg capsules in fasted and fed healthy adult volunteers and in solution: a single-dose, crossover pharmacokinetic study. **Journal of clinical pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 293–302, mar. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285619>. Acesso em: 17 fev. 2014.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Research Report Series: Prescription Drug Abuse (NIH Publication Number 11-4881)**. [s.l: s.n.].

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Drug Facts: Stimulant ADHD Medications**. [s.l.] National Institutes of Health, 2014. . Disponível em:

<http://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/prescription-drugs/>.

PLISZKA, S. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 46, n. 7, p. 894–921, jul. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581453>. Acesso em: 15 jul. 2014.

ROWLEY, H. L.; KULKARNI, R.; GOSDEN, J.; BRAMMER, R.; HACKETT, D.; HEAL, D. J. Lisdexamfetamine and immediate release d-amfetamine - differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activit. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1064–74, nov. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796358>. Acesso em: 28 ago. 2014.

SHIRE. **Highlights and Full Prescribing Information/Medication Guide. Revised 04/2015**. Disponível em: <http://pi.shirecontent.com/PI/PDFs/Vyvanse_USA_ENG.pdf>. Acesso em: 10 set. 2015.

SWEENEY, C. T.; SEMBOWER, M. a; ERTISCHEK, M. D.; SHIFFMAN, S.; SCHNOLL, S. H. Nonmedical use of prescription ADHD stimulants and preexisting patterns of drug abuse. **Journal of addictive diseases**, v. 32, n. 1, p. 1–10, jan. 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3630453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 8 set. 2014.

U.S. DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION; OFFICE OF DIVERSION CONTROL. **National Forensic Laboratory Information System Special Report: ADD/ADHD Stimulants in NFLIS, 2007-2011.** Springfield, VA: U.S. Drug Enforcement Administration, 2012. .

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World drug report 2014.Trends in Organized Crime**. New York: United Nations, 2014. .

6 CAPÍTULO 3 – *INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO DETECTOR DE MASSAS NA ANÁLISE DA LISDEXANFETAMINA E DA ANFETAMINA*

6.1 Manuscrito III

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *“Influence of mass detector parameters on the analysis of lisdexamfetamine and amphetamine”* submetido para publicação no periódico *Spectroscopy Letters*. Este artigo traz uma avaliação da fragmentação e da variação de condições de massas para análise da LDX e da ANF em um sistema de cromatografia líquida acoplada a um detector de massas de quadrupolo simples.

INFLUENCE OF MASS DETECTOR PARAMETERS ON THE ANALYSIS OF LISDEXAMFETAMINE AND AMPHETAMINE

Running head: Lisdexamfetamine and amphetamine mass parameters

Eloisa Comiran[a*], Fabiano Barreto[b], Graciela Carlos[a], Pedro E. Froëhlich[a], Renata Pereira Limberger[a]

[a]Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
[b]Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, National Agricultural Laboratory - LANAGRO/RS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Address correspondence to this author at the Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel/Fax: +55-51-3308-5762/+55-51-3308-5243; E-mail: eloisacomiran@gmail.com

ABSTRACT

Lisdexamfetamine (LDX) is a *d*-amphetamine prodrug indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder and binge eating disorder. The aim of this study is to discuss the optimization and fragmentation of LDX and amphetamine (AMPH) under electrospray ionization-mass spectrometry detector conditions. Fragmentor voltage was the only parameter to influence the fragmentation pattern. The best fragmentor was 80 V for AMPH and 140 V for LDX, which showed good mass spectrometric signal of the fragments *m/z* 136, 119, 91 and *m/z* 264, 247, 84, respectively. The other assessed parameters did not influence the fragmentation pattern and the optimized condition for both analytes would be capillary voltage at 1500V, drying gas flow at 13 L/min, nebulizer pressure at 60 psi and drying gas temperature at 350 °C. Flow injection analysis allows a rapid evaluation of mass detector parameters. A higher fragmentor voltage was synonymous of more fragments for LDX and AMPH in the assessed conditions. It was possible to identify the main fragments of LDX and AMPH in both single mass spectrometry detector – after fragmentor optimization – and tandem mass spectrometry detector experiments. The knowledge of LDX fragments generated in this study would be helpful for MS methods development and adjustments in different equipments and to guide analysis of unknown samples in toxicology.

Keywords: lisdexamfetamine, amphetamine, mass fragmentation, liquid chromatography-mass spectrometry.

INTRODUCTION

Lisdexamfetamine (LDX) is a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder and binge eating disorder.[1,2] The hydrolysis of LDX amide bond occurs in vivo releasing the therapeutically active molecule *d*-amphetamine and the amino acid *l*-lysine.[1]

Liquid chromatography (LC) coupled to mass detector (MS) is a widely used technique in toxicology and allows the optimization of a wide range of parameters to improve the analysis of molecules. Single quadrupole equipments are not as sensitive and specific as triple quadrupole equipments when coupled to LC, so a good optimization must be made to the parameters to obtain the best detection. Electrospray ionization interface makes possible the transfer of ions from a solution environment to a gas phase and the generation of fragment ions by collision-induced dissociation. Once electrospray ionization is a soft ionization technique, fragment ions are rarely present or have low mass spectrometric signal and, in most cases, the fragmentation at source is not desired. In order to enable compounds of interest confirmation, identify fragmentation patterns are indispensable. Thereby, although fragmentation mechanism is the same - collision-induced dissociation - in MS and MS/MS systems, equipment settings in each system ultimately generate quite different results, including sensitivity levels. A programmable collision-induced dissociation routine delivers electrospray ionization mass spectra with a variable degree of fragmentation from a single run [3] allowing a fragmentation study of the target molecule.

There is one article proposing some mass fragments for LDX studied by means of high-resolution/high-accuracy tandem mass spectrometry.[4] The aim of this study is to discuss the optimization and fragmentation of LDX and amphetamine (AMPH) under electrospray ionization-mass spectrometry detector conditions. This is helpful in screening methods in which this analytes are not target but can appear with different fragmentations due the differences between each method and equipment, especially in forensic toxicology.

EXPERIMENTAL

Materials and reagents

LDX standard was produced in our laboratory (99.56% of purity) from its dosage form (Venvanse®, Shire Farmacêutica Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil). AMPH (1 mg/mL in methanol) was from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). The reagents utilized were acetonitrile HPLC grade (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ammonium acetate (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brazil), acetic acid glacial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and water obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

MS methods

An Agilent 1260 Infinity Series coupled to an Agilent 6120 Single Quadrupole LC/MS system with electrospray ionization interface was used in this study in positive mode. Analysis was carried out in the full scan mode, for an appropriate fragmentation assay, through flow injection analysis (FIA) series. In this equipment, FIA series inject the solution multiple times within the same run without a column, but can also be done with a column. LDX and AMPH solutions at 10 µg/mL were injected separately.

Mobile phase A was 20 mM ammonium acetate pH 4 and mobile phase B was acetonitrile. Chromatography was set at 60% A and 40% B for LDX and 40% A and 60% B for AMPH. Flow rate was set at 1 mL/min.

When a column was used, it was a Phenomenex Kinetex HILIC (150 mm x 4.6 mm i.d., 2.6 µm) set at 25°C. Injection volume was 5 µL with column and 2 µL without.

Base conditions for all runs were set at 350 °C for drying gas temperature, 60 psi for nebulizer pressure, 13 L/min for drying gas flow and 4000 V for capillary voltage. Mass range was chosen based on molecular ion and preliminary fragmentor evaluation allowed choosing the best base condition. Therefore, mass range for LDX was 50-300 with 140V fragmentor and for AMPH was 50-200 with 80V fragmentor.

For the influence in the fragmentation pattern of LDX and AMPH, mass parameters drying gas flow and temperature, nebulizer pressure, gain and capillary voltage were assessed (Table 1). Peak height/ion signal was considered to evaluate

the effect on fragments detection and relative ion signal to access the effect on fragmentation pattern.

Table 1. Evaluated parameters on mass detector

Parameter	Range	Interval
Fragmentor (V)	60-200	20
Capillary voltage (V)	1000-4000	500
Drying gas flow (L/min)	7-13	2
Nebulizer pressure (psi)	40-60	10
Drying gas temperature (°C)	200-350	50

Experiments comparing fragmentation with and without column combined with mobile phase A at pH 4 and with lack of adjustment at base conditions were also performed.

MS/MS methods

Direct infusion of AMPH and LDX solution at 32 ng/mL was performed in an AB Sciex QTrap 5500 mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) at a flow rate of 10 µl/min for analysis of fragments from parent ion.

RESULTS AND DISCUSSION

MS evaluation

High concentration solutions were needed due to the reduced sensitivity in scan mode. Also, in this case to study fragmentation, low concentrations in scan mode could give fragments from some interference or noise, making it difficult to differentiate which ones could be assigned to the target molecule. This was supported by the experiments comparing the injection of a reference solution with and without column at base conditions. They showed that, when compared to an injection with column, injection of low concentration solution without a column gives a poor information spectra with high levels of fragments from interfering, resulting factor of low specificity of single quadrupole systems. This makes it difficult to study fragmentation. Thereupon, the study was conducted with a column and high

concentration solutions to enable greater assurance of ions being from the substance under study.

In addition, an evaluation of mobile phase A pH control was made comparing pH 4 with the lack of adjustment. With a HILIC column, LDX could not be analyzed without pH adjustment of the mobile phase A. At pH 4, this molecule has only one ionic form and a good chromatographic performance was achieved. Fragmentation pattern could not be assessed, but this results show the importance to control the pH for this molecule analysis in a HILIC column. For AMPH with a HILIC column and for both LDX and AMPH without column, fragmentation pattern did not differ between the two pH conditions. Thus, the study was performed with mobile phase A pH adjustment to allow LDX identification.

The parameters can be optimized using single injection, sequence with different methods loaded for each injection and FIA series (with or without FIA sequences). In single injection the operator changes the parameter after each run. If sequence is used, the operator has to save several methods with the change in the target parameter and submit each run with each respective different method. For FIA series the configuration is automatic in the software, but some cautions are necessary like to care for the time required to the analyte peak to end its detection before the next automatic injection. At the end, FIA series, single injection and sequence make the same evaluation, however FIA series is more practical since it has a faster programming than sequence, do not need the analyst until it ends unlike single injections and it can be made in form of a sequence of FIA series. So, the optimization was made through FIA series. The use of a column also collaborate here, since the analyte suffer retention making time to some parameters that need longer to stabilize before the analyte reaches the detector giving a more reproducible analysis.

Fragmentor voltage depends on the molecule structure and its evaluation allows a deeper study of the molecule structure and fragmentation under different voltages. In general, at higher fragmentor values, fragmentation increases.[5] This voltage can fragment stable ions colliding them with a specific gas.[3] Baseline signal tends to decrease as the fragmentor increase (Figure 1). Electrospray ionization of small molecules rarely generate multiply charged ions.[3] Molecular ion is more intense at lower voltages for AMPH, since it's a small molecule. At lower voltages, it is possible to identify *m/z* 59 $[C_3H_9N]^+$. From 60 to 120 V, *m/z* 119 $[C_9H_{11}]^+$ an

important ion for AMPH fragmentation is evident. At higher voltages more stable ions are *m/z* 91 $[C_7H_7]^+$ and *m/z* 65 $[C_5H_5]^+$ (Figure 2). Fragments *m/z* 119, 91 and 65 are well established in the literature.[6]

Whereas for LDX, molecular ion is also more intense at lower voltages (60 to 140V). From 60 to 80 V, the fragment *m/z* 59 $[C_3H_9N]^+$ appears with low mass spectrometric signal. An important fragment ion is the elimination of ammonia to form *m/z* 247 that begins to appear in fragmentor 120 V forward. In higher voltages, *m/z* 84 $[C_5H_{10}N]^+$ is the base peak and its cyclic form is the more stable one.[4] Some AMPH fragment ions can be seen from 160 to 200 V, especially at 160 V. From 160 to 200 V, *m/z* 56 $[C_4H_8]^+$ can be identified, as *m/z* 65 $[C_5H_5]^+$ from 180 to 200 V, increasing their intensities with the voltage increase (Figure 3).

Best fragmentor is selected considering the spectrum that associates higher mass spectrometric signal of molecular ion with fragments that described all parts of molecule in good mass spectrometric signal. Since different fragmentors can be set up for different analytes the choice was 80 V for AMPH. With this voltage it is possible to have the molecular ion, *m/z* 136 in a good mass spectrometric signal together to the two most important fragment ions usually used for this molecule, *m/z* 119 and 91 (Figure 1). As AMPH is a small molecule there is not much choice due to the few fragments that are generated. Whilst for LDX, the best one was 120 to 140 V, in which the molecular ion *m/z* 264 has good mass spectrometric signal and it possible to have qualifiers ions, *m/z* 247 and 84, with also good signal to characterize the molecule (Figure 1).

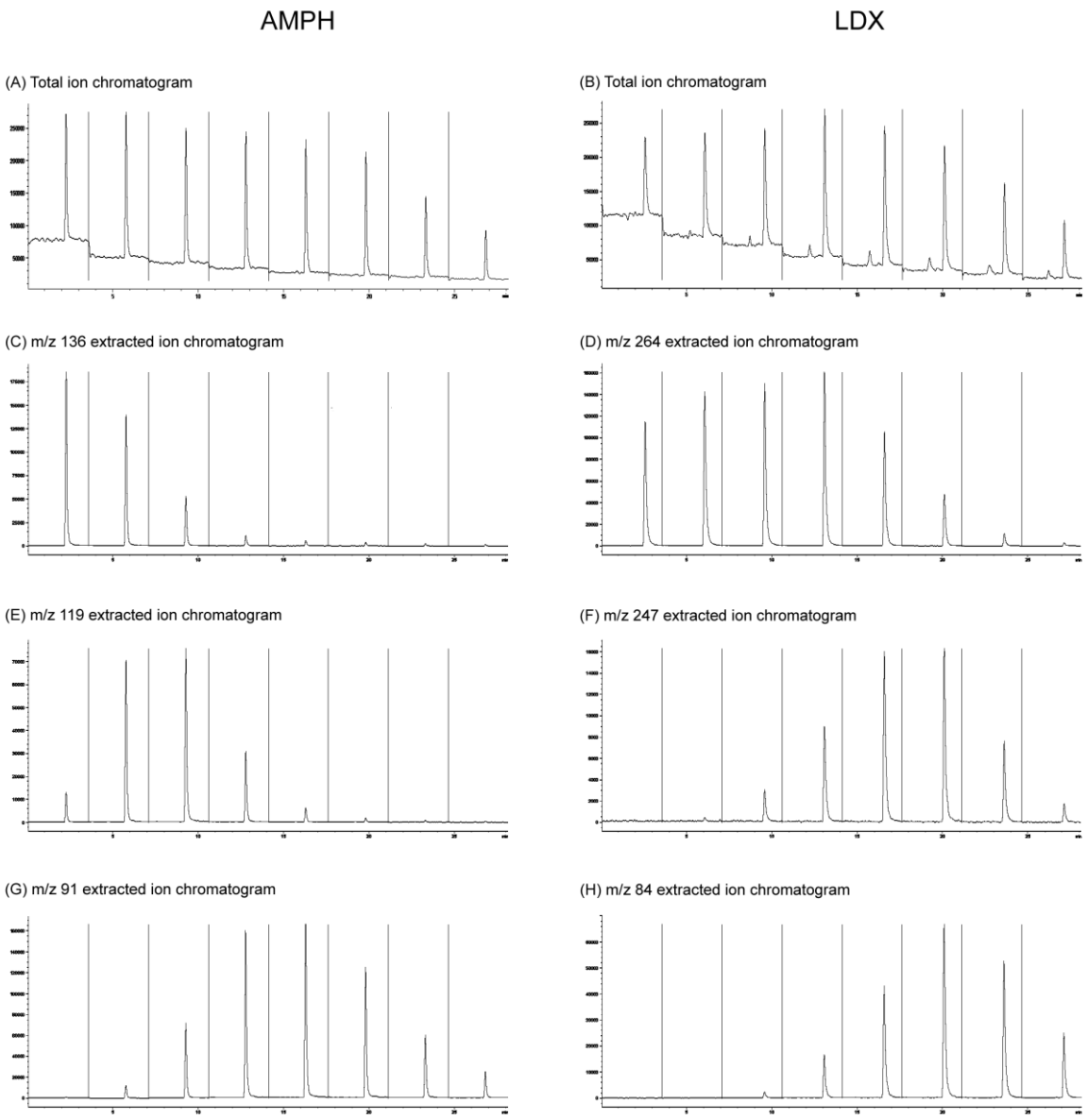


Figure 1: AMPH and LDX total ion chromatograms (A and B) and extracted ions chromatograms (C-H) obtained in the different fragmentors evaluated from 60 to 200 V.

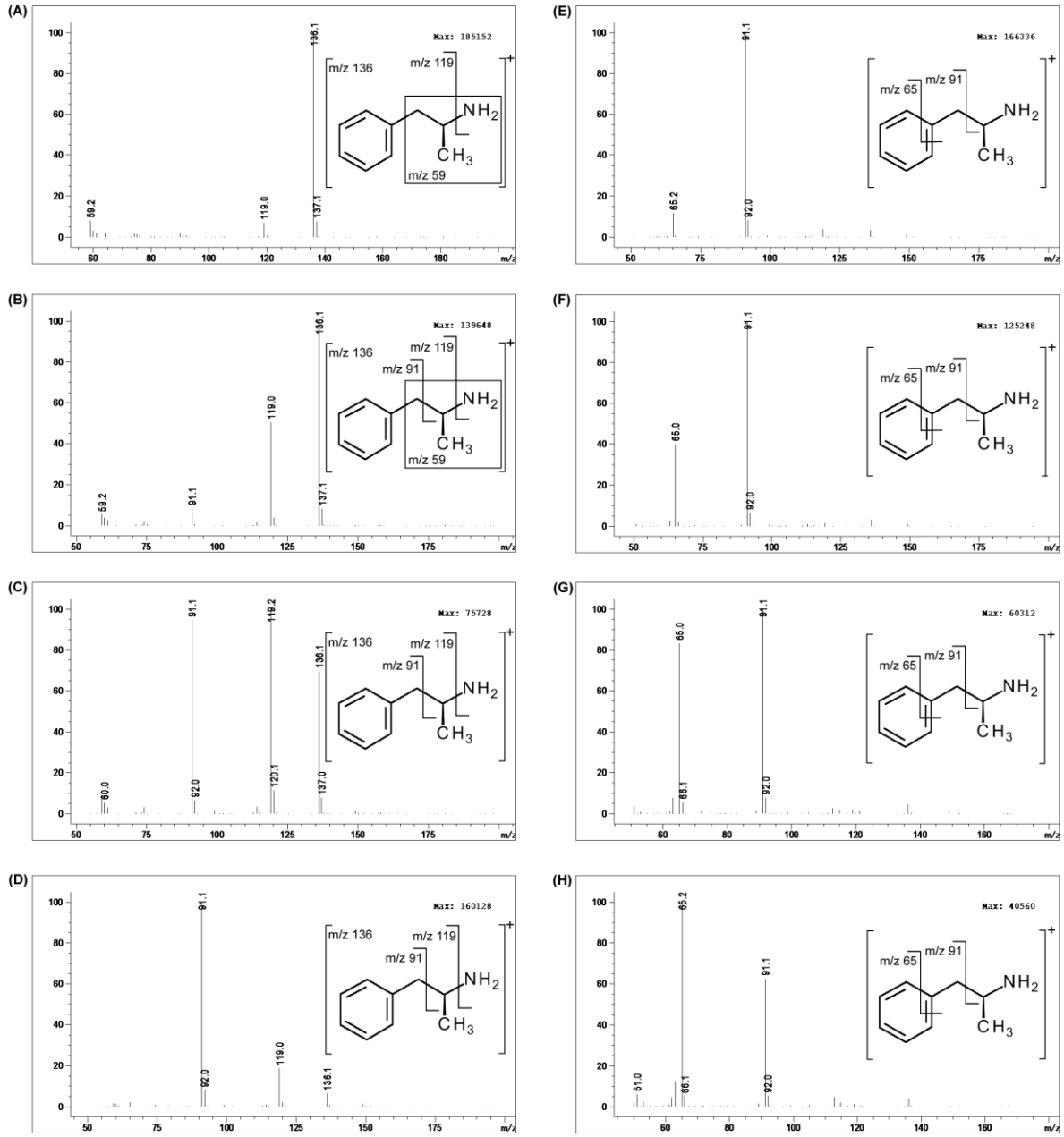


Figure 2: AMPH mass spectrums obtained in the different fragmentors evaluated and its proposed fragmentations. (A) 60V (B) 80V (C) 100V (D) 120V (E) 140V (F) 160V (G) 180V (H) 200V.

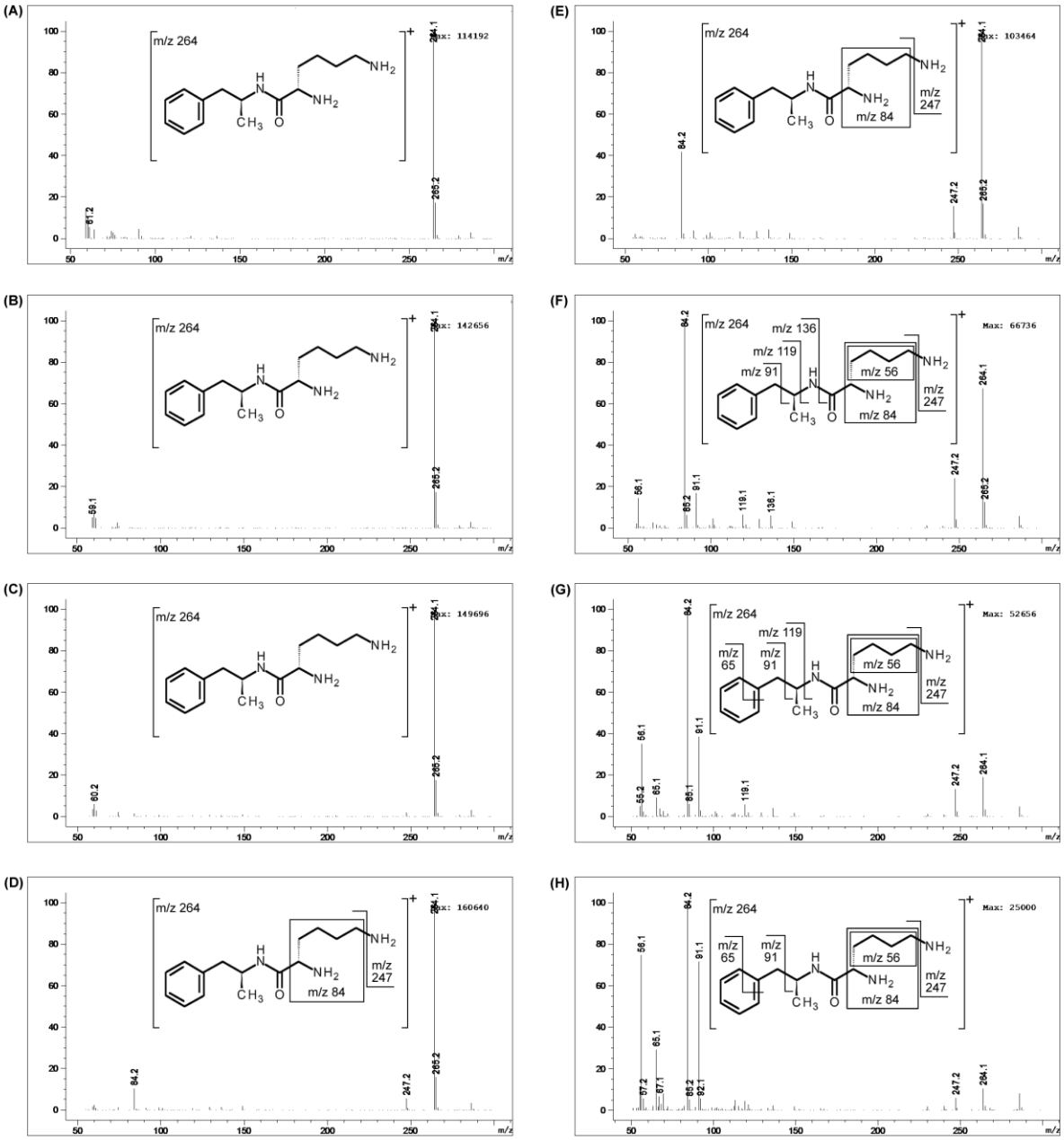


Figure 3: LDX mass spectrums obtained in the different fragmentors evaluated and its proposed fragmentations. (A) 60V (B) 80V (C) 100V (D) 120V (E) 140V (F) 160V (G) 180V (H) 200V.

For capillary voltage, ion signal decreased with the increase of the voltage for AMPH, being 1500 V the best one (Figure 4A). For LDX, ion signal was higher at 1500 and 2000 V, but the overall difference among the voltages was small, excepting 1000 V that was the worst (Figure 4B). Combining the two analytes, the best set up for this parameter would be 1500 V, which covers good performance for both analytes.

Ion signal increased with the increase of gain for AMPH and LDX, but so did the baseline noise (Figure 4C and 4D). This was to be expected since the relationship between electron multiplier voltage and gain is log linear. The higher is the electron multiplier voltage higher is the gain and the signal, through current amplification.[7]

Drying gas flow and temperature and nebulizer pressure depends on the mobile phase, flow rate and ionization mode [7] since they are all involved in the mobile phase evaporation and, consequently, in forcing surface-charges closer from each other.

In the assessed conditions, drying gas temperature almost did not influence ion signal for AMPH. Although for LDX, ion signal initiated low and increased until the maximum at 350°C (Figure 4E and 4F).

Nebulizer pressure and drying gas flow were the less influential parameters in this case (Figure 4G, 4H, 4I and 4J). Ion signal increased slightly with the increase of the parameter value. They did not alter mass spectrometric signal for both analytes.

Three ions were chosen to evaluate if some of these parameters could affect the fragmentation pattern, other than fragmentor. It was observed by the relative mass spectrometric signal that at a given fragmentor the other parameters maintain the proportionality among ions (Table 2). Among the studied parameter, drying gas temperature seems to be the most critical, since it has the largest variations and may affect the robustness. Therefore, the fragmentor voltage was the only parameter to influence the mass spectrum significantly, abruptly changing the intensities and types of *m/z* fragments.

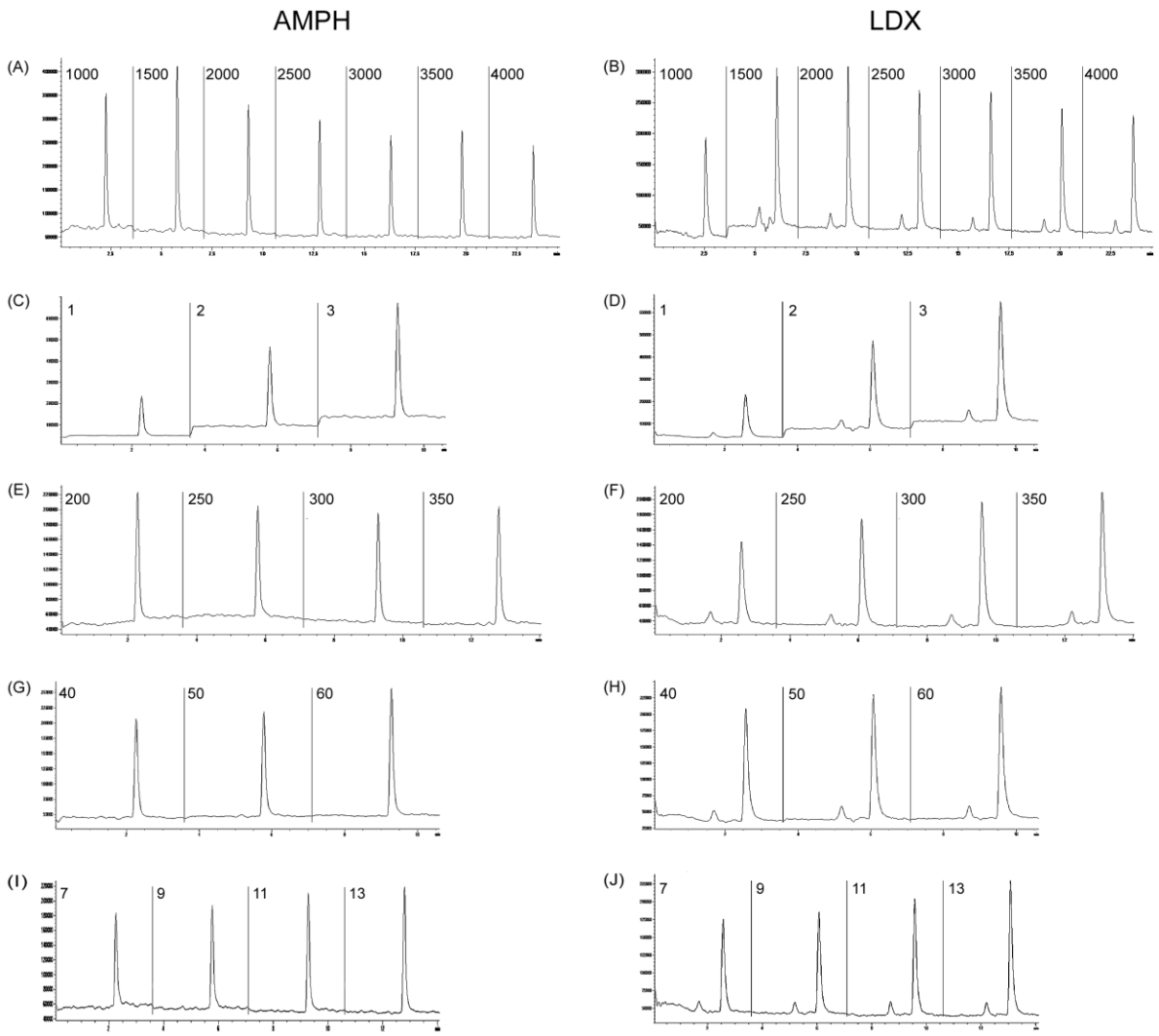


Figure 4: Chromatograms obtained with the variations in the capillary voltage (A and B), gain (C and D), drying gas temperature (E and F), nebulizer pressure (G and H) and drying gas flow (I and J) for AMPH and LDX.

Table 2. Mean relative intensities of the three main ions of AMPH using fragmentor 80 V and LDX using fragmentor 140 V

	AMPH			LDX		
	91	119	136	84	247	264
Drying gas flow						
Mean	7.0	39.1	100.0	30.6	13.5	100.0
SD	1.3	4.0	0.0	2.8	1.0	0.0
CV	18.8	10.2	0.0	9.1	7.6	0.0
Drying gas temperature						
Mean	4.8	31.6	100.0	19.7	9.0	100.0
SD	1.2	5.9	0.0	7.3	2.7	0.0
CV	26.1	18.6	0.0	37.0	29.7	0.0
Gain						
Mean	9.6	50.0	100.0	41.9	15.6	100.0
SD	0.3	0.8	0.0	1.2	1.0	0.0
CV	2.6	1.5	0.0	2.8	6.3	0.0
Nebulizer pressure						
Mean	9.9	48.8	100.0	36.8	14.8	100.0
SD	0.4	2.0	0.0	0.1	0.6	0.0
CV	4.4	4.1	0.0	0.3	3.7	0.0
Capillary voltage						
Mean	9.0	47.5	100.0	37.8	15.5	100.0
SD	0.7	2.4	0.0	2.9	1.3	0.0
CV	7.8	5.0	0.0	7.6	8.6	0.0

CV = coefficient of variation; SD = standard deviation.

The parameters drying gas flow and temperature, nebulizer pressure and capillary voltage have to be set up at the same value in the equipment for both analytes. So, it has to be an accordance to perform the best for all analytes. Therefore, considering the obtained results for the parameters that were discussed, the optimized values are shown in Table 3.

Table 3. Optimized parameters results on mass detector

Parameter	Optimized
Fragmentor (V)	80 (AMPH) 140 (LDX)
Capillary voltage (V)	1500V
Drying gas flow (L/min)	13 L/min
Nebulizer pressure (psi)	60 psi
Drying gas temperature (°C)	350 °C

Liquid chromatography coupled to single quadrupole mass detector is not so common at laboratories, which makes method development or adjustment necessary for transposition. First step is to be sure that you are monitoring the best fragments of the target analyte and this kind of evaluation is one easy way to do so.

Also, there are some toxicological situations in which an unknown sample is analyzed using an MS screening method. These methods could be different in each laboratory, due to different equipments and so can be the generated fragments as commented before. Therefore, this study could be useful to compare fragments when LDX is suspected and, when necessary, make a more focused confirmation step.

MS/MS evaluation

Product ion experiment in MS/MS showed almost the same main fragments of AMPH and LDX molecules as MS, but some different as well (Figure 5). For AMPH, different fragments that could be cited are *m/z* 77 $[C_6H_5]^+$ and *m/z* 109 $[C_8H_{13}]^+$. For LDX, some examples are *m/z* 229 $[C_{15}H_{19}NO]^+$ that corresponds to the loss of two ammonia and *m/z* 129 $[C_9H_7N]^+$.[4] The latter one is frequently observed as a characteristic fragment ion in the collision-induced dissociation mass spectra of peptides containing lysine is *m/z* 129 $[H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)CO]^+$. This fragment is not very stable in is acyclic form and liberate CO generating an immonium ion of *m/z* 101. An alternative to *m/z* 129, is its cyclic form involving the ε-amino group attack to the carbonyl grup to form a protonated α-amino-e-caprolactam.[8]

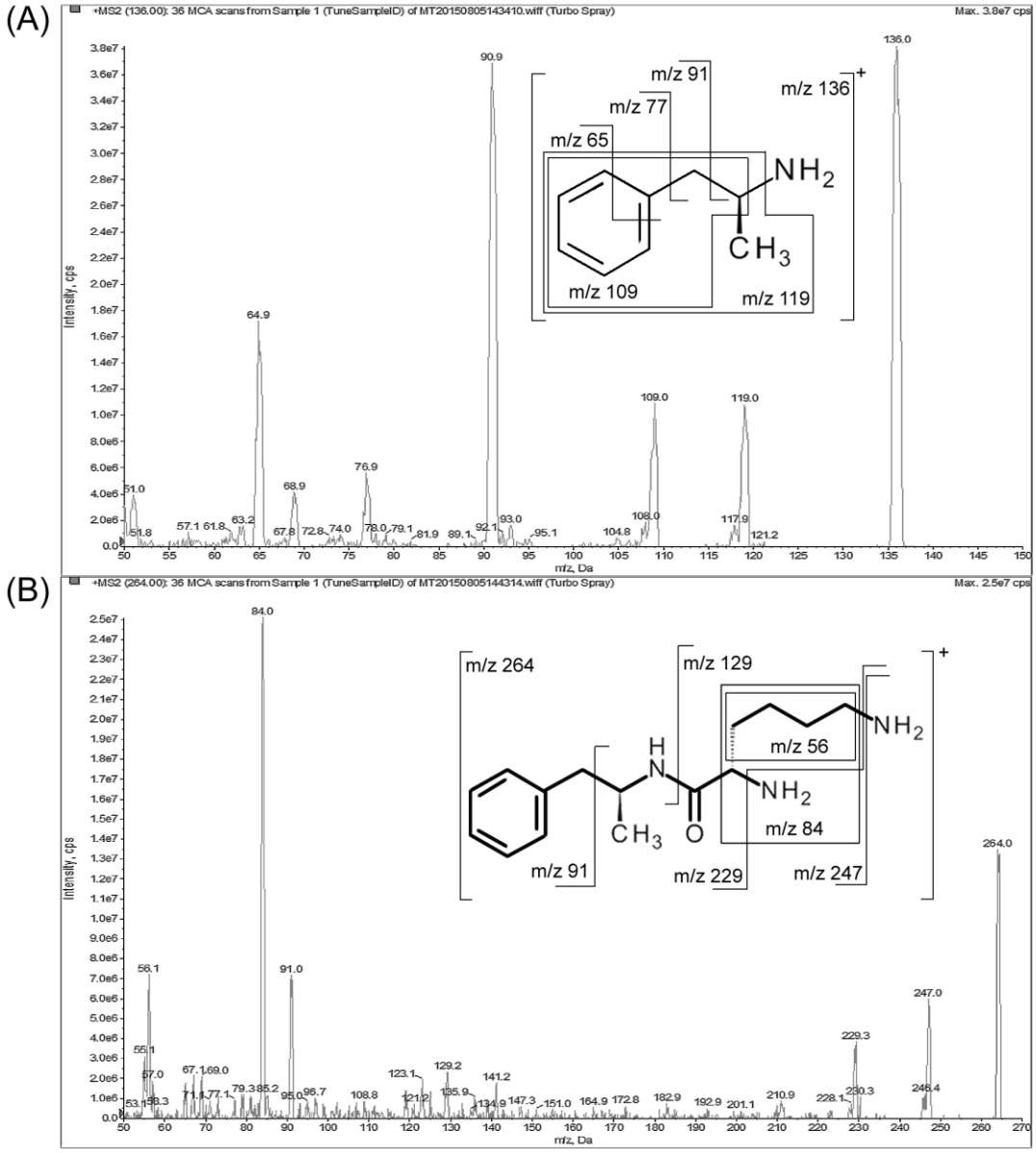


Figure 5: AMPH (A) and LDX (B) fragmentation in tandem mass spectrometry detector (MS/MS) through direct infusion.

This assay shows the difference between single and triple quadrupole. Even when same instrument model is used, LC-MS instruments results cannot necessarily be replicated in other laboratories if they are not from the same manufacturer as already has been demonstrated for other molecules.[9] Wherefore, LC-MS mass spectrum libraries, same as existing for gas chromatography-mass spectrometry, are difficult to achieve not only for the possibility of variation on energy for fragmentation but also for the different ionization mechanisms inside of equipment.

CONCLUSION

FIA analysis allows a rapid evaluation of mass detector parameters for optimization in method development and for the study of the behavior of a molecule under certain conditions. A higher fragmentor voltage in MS was synonymous of more fragments for LDX in the assessed conditions. It was possible to identify the main fragments of LDX and AMPH in both MS – after MS fragmentor optimization – and MS/MS experiments. MS^3 assessment is required to confirm proposed LDX fragmentations with more accuracy. The knowledge of LDX fragments generated in this study would be helpful for MS methods development and adjustments in different equipments and to guide analysis of unknown samples in toxicology.

This manuscript showed in a simplified manner how to start and develop an assessment of mass detector parameters. It is an important content to start any kind of method using this type of detector and it is not found in the literature in this educational and practical format. The way it is described, the content facilitates understanding, especially for beginners.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for the financial support and scholarships.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

[1] Mickle, T.; Krishnan, S.; Bishop, B.; Lauderback, C.; Moncrief, J.S.; Oberlender, R.; et al. Abuse-resistant amphetamine compounds (US 7,105,486 B2). US patent 7,105,486 B2 United States, Issued 2006.

[2] Food and Drug Administration FDA News Release: FDA expands uses of Vyvanse to treat binge-eating disorder. 2015, http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm432543.

htm [Mar 3 2015].

[3] Gross, J.H. Mass Spectrometry. A Textbook.; Springer: Heidelberg, 2004.

[4] Thevis, M.; Sigmund, G.; Thomas, A.; Vogel, M.; Walpurgis, K.; Kwiatkowska, D.; et al. Isotope-dilution mass spectrometric quantification of the prodrug lisdexamfetamine in human urine in doping control analysis. Rapid communications in mass spectrometry **2014**, 28(7), 781–786.

[5] Choi, S.S.; Min, J.S. Influence of fragmentor voltage and solvent on negative ionization behaviors of Uvinul 3039 using LC/APCI-MS. Bulletin of the Korean Chemical Society **2008**, 29(9), 1847–1849.

[6] Bijlsma, L.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; Niessen, W.M. a Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MS E accurate-mass spectra. Journal of Mass Spectrometry **2011**, 46(9), 865–875.

[7] Agilent Technologies Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS Systems - Concepts Guide. 2011, 1–130.

[8] Yalcin, T.; Harrison, A.G. Ion Chemistry of Protonated Lysine Derivatives. Journal of Mass Spectrometry **1996**, 31, 1237–1243.

[9] Jiang, H.; Somogyi, Á.; Timmermann, B.N.; Gang, D.R. Instrument dependence of electrospray ionization and tandem mass spectrometric fragmentation of the gingerols. Rapid Communications in Mass Spectrometry **2006**, 20(20), 3089–3100.

7 CAPÍTULO 4 – *VALIDAÇÃO DE MÉTODO E DETERMINAÇÃO DE LISDEXANFETAMINA E DE ANFETAMINA EM FLUIDO ORAL, PLASMA E URINA POR CL-EM/EM*

7.1 Manuscrito IV

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *“Method validation and determination of lisdexamfetamine and amphetamine in oral fluid, plasma and urine by LC-MS/MS”* submetido no periódico *Biomedical Chromatography*. Este artigo apresenta o desenvolvimento e a validação de métodos bioanalíticos para análise simultânea de LDX e ANF em fluido oral, plasma e urina através da técnica de CL-EM/EM.

METHOD VALIDATION AND DETERMINATION OF LISDEXAMFETAMINE AND AMPHETAMINE IN ORAL FLUID, PLASMA AND URINE BY LC-MS/MS

Running head: Lisdexamfetamine and amphetamine determination

Eloisa Comiran[a*], Fabiano Barreto[b], Leonardo Z. Meneghini[a], Graciela Carlos[a], Pedro E. Fröehlich[a], Renata Pereira Limberger[a]

[a]Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
[b]Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, National Agricultural Laboratory - LANAGRO/RS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Address correspondence to this author at the Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel/Fax: +55-51-3308-5762/+55-51-3308-5243; E-mail: eloisacomiran@gmail.com

ABSTRACT

Lisdexamfetamine (LDX) is a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder and binge-eating disorder symptoms. *In vivo* hydrolysis of LDX amide bond releases the therapeutically active *d*-amphetamine (*d*-AMPH). Since toxicological tests in biological samples can detect AMPH due to the use of some medications, efficient methods are needed in order to correctly interpret the results. The aim of this study was to develop and validate a LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of LDX and its main biotransformation product AMPH in human oral fluid, plasma and urine. Calibration curve range for both analytes was 1 to 128 ng/mL in oral fluid and plasma and 4 to 256 ng/mL in urine, being the lowest concentration the limit of quantification. Accuracy of the determined values of the target analytes for the five control levels ranged from 94.8-111.7% for oral fluid, 91.3-100.2% for plasma and 94.8-109.8% for urine. Imprecision for the five control levels did not exceeded 12.8% for oral fluid, 16.2% for plasma and 17.1% for urine. The method developed for the three matrices was validated and was also successfully applied to assess real samples, showing for the first time the detection of lisdexamfetamine in oral fluid.

Keywords: lisdexamfetamine, amphetamine, liquid chromatography-mass spectrometry, bioanalysis, toxicology.

1 INTRODUCTION

Lisdexamfetamine (LDX) is a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and binge-eating disorder (BED) symptoms (Shire 2015a). *In vivo* hydrolysis of LDX amide bond releases the therapeutically active *d*-amphetamine (*d*-AMPH) (Mickle et al. 2006). Amphetamine (AMPH) and, more recently, LDX are substances controlled by law, because although they have accepted medical use with restrictions, they have potential for abuse and may lead to dependence (United States 2007; Brasil 2011). LDX is current licensed in United States (Vyvanse®), Canada (Vyvanse®), Australia (Vyvanse®), several European countries (Elvanse®/Tyvense®) and Brazil (Venvanse®) (Shire 2015b).

Due to its particularly characteristics in the toxicological context, AMPH plays an important role of restriction and control in different fields, such as clinical drug monitoring, doping, forensic sciences applications and traffic, providing importance to its correct analysis and interpretation. However, this task is not easy since some toxicological tests can detect AMPH due to the use of some legal medications. Laboratories must be aware of the possible sources of positive drug tests that are not based on an illegal use, being able to prevent misinterpretation of the situation and consequently protecting the integrity both of the individual under suspicion and the toxicologist who conducts the analysis and report (Musshoff 2000; Maurer 2005). In this respect, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) use is applicable because of the sensitivity, versatility and reliability that can be achieved, being currently the method of choice for quantitative drug analysis in biological matrices (Maurer 2005).

To the best of our knowledge there are no articles related to detection of LDX in oral fluid and the existing articles related to plasma and urine methods for LDX lack some information (Biederman et al. 2007; Krishnan et al. 2008; Krishnan and Stark 2008; Krishnan and Zhang 2008; Jasinski and Krishnan 2009; Boellner et al. 2010; Pennick 2010, 2013; Ermer et al. 2011, 2012, 2013a, 2013b, 2015; Rowley et al. 2012; Roesch et al. 2013). Therefore, the aim of this study is to describe the development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of LDX and its main biotransformation product AMPH in human oral fluid, plasma and urine.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and reagents

The reference standard of LDX (99.56 %) was purified in our laboratory from its dosage form (Venvanse®, Shire Farmacêutica Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil). AMPH (1 mg/mL in methanol) and the internal standard (IS) AMPH-D5 (100 µg/mL in methanol) were from Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). Acetonitrile and methanol were from Tedia (Fairfield, OH, USA), ammonium formate analytical-reagent grade were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and formic acid ACS grade ≥88% were from J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water was purified using a Milli-Q water purifying system from Millipore (Bedford, MA, USA). Nylon syringe filters VertiPure™ 0.45 µm 13 mm were from Vertical Cromatography (Jatujak, Bangkok, Thailand).

2.2 Solutions, calibrators and quality controls (QC)

Ammonium formate mobile phase buffer (5 mM, 0.1% formic acid) was prepared from a 100 mM ammonium formate stock solution in water (mobile phase A) and methanol (mobile phase B).

Stock solutions of the reference standards were prepared at 100 µg/mL in methanol. Working solutions of standards were prepared as mixtures of LDX and AMPH at 5120 ng/mL in methanol:mobile phase A (50:50) and subsequent dilutions were made in mobile phase A. The IS was prepared at 640 ng/mL in methanol:mobile phase A (50:50). Stock and working solutions were stored at -20 °C.

Reference standards were prepared daily in drug-free human matrices in order to obtain a final concentration of 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 ng/mL for oral fluid and plasma and 4, 8, 16, 32, 64, 128 and 256 ng/mL for urine. QC samples were prepared in drug-free human matrices of oral fluid, plasma and urine by the addition of the reference standard to final concentrations of 1, 1 and 4 ng/mL (lower limit of quantification – LLOQ), 3, 3 and 12 ng/mL (low quality control – LQC), 50, 50 and 100 ng/mL (medium quality control – MQC), 100, 100 and 200 ng/mL (high quality control – HQC) and 250, 250 and 500 ng/mL (dilution quality control – DQC), respectively.

2.3 Samples extraction procedure

Nonstimulated expectorated oral fluid samples were prepared by using a 2-fold dilution. To an aliquot of 200 µL of the matrix, 200 µL of the mobile phase A was added, followed by 10 s of vortex-mixing. Samples were centrifuged at 12.000 rpm for 15 min at -5 °C and 200 µL the supernatant transferred to a vial for analysis.

Plasma samples were prepared by protein precipitation. To an aliquot of 100 µL of the matrix, 100 µL of acetonitrile was added followed by 10 s of vortex-mixing. Samples were centrifuged at 12.000 rpm for 10 min at -5 °C, kept at -20 °C for 1 h and then centrifuged 12.000 rpm for 30 min at 10 °C. After centrifugation, 100 µL of the supernatant plus 100 µL of mobile phase A were transferred to a vial, followed by vortex-mixing and analysis.

Urine samples were prepared by centrifuging an aliquot of 400 µL at 12.000 rpm for 15 min at -5 °C, followed by a 0.45 µm filtration directly into a vial.

2.4 Chromatographic and detection system conditions

Analysis were carried out on an Agilent 1260 series HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a AB Sciex QTrap 5500 mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Separation was performed on an Agela Durashell RP column (100 mm x 2.1 mm, 3 µm) combined with C18 precolumn cartridge (4 mm x 3 mm). Mobile phase gradient consisted of (A) 5 mM ammonium formate buffer with 0.1% formic acid and (B) methanol with 5 mM ammonium formate buffer and 0.1% formic acid. Gradient was started with 95% of eluent A until 3 min decreasing to 10% until 5 minutes and maintained for 2 minutes, then increased to 95% until 8 minutes and maintained for 2 minutes. Re-equilibration time was 2 minutes and flow rate was 300 µL/min. The injection volume was 10 µL for oral fluid and urine and 5 µL for plasma. A diverter valve was used to direct the eluent flow to waste for the first 3 min in order to reduce the introduction of matrix components into the spectrometer. Mass detection analyses were carried out through an electrospray ionization source (ESI) operating in the positive mode. The ions were monitored using the multiple reaction-monitoring (MRM) mode for the two most intense transitions from the precursor ions to the product ions with a dwell time of 50 ms and collision energies were set at maximum response for each transition. Nitrogen was applied as nebulizer, curtain, dryer and collision gas. Collision gas (CAD), nebulizer gas (GS1), drying gas (GS2) and curtain gas (CUR) were set at 4, 55, 55 and 30 psi,

respectively. ESI capillary voltage was set at 5500 V and temperature at 700 °C. Mass detection conditions were defined through direct infusion of each analyte solution separately and optimized through flow injection analysis with a Harvard Apparatus 11 Plus syringe pump (Hollston, MA, USA) at a flow rate of 10 µl/min. The optimized mass detection conditions are reported in Table I. Transitions monitored in MRM mode from each precursor protonated molecular ions in positive ESI were 136→119 and 136→91 for AMPH and 264→84 and 264→119 for LDX (Figure 1), the first ones were used for quantification. Due to matrix interferences, in urine the only transition monitored and used for quantification of AMPH was 136→119. Retention times for LDX and AMPH were 6.9 and 7.2 minutes, respectively.

Table I: Tandem MS conditions for each analyte and IS.

Analyte	Ion	Q1	Q3	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CxP (V)
AMPH	$[M+H]^+$	136	91	61	10	29	20
		136	119	61	10	13	18
AMPH-D5	$[M+H]^+$	141	96	61	10	21	12
		141	124	61	10	11	10
LDX	$[M+H]^+$	264	84	111	10	31	24
		264	119	111	10	33	14

DP = declustering potential; EP = entrance potential; CE = collision energy; CxP = collision cell exit potential.

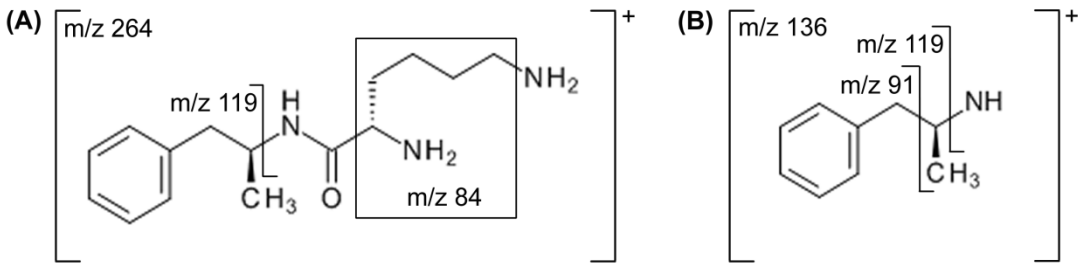


Figure 1. LDX (A) and AMPH (B) *m/z* ions monitored in positive mode.

2.5 Data analysis

Data acquisition peak integration and calculation were interfaced to a computer workstation running Analyst 1.6.2 software.

2.6 Method validation

The analytical method validation was performed observing the recommendations of Food and Drug Administration (Food and Drug Administration 2001).

Selectivity was assessed through six blank samples of each matrix obtained from different healthy non-drug-consuming subjects. For plasma, one of the blank samples was lipemic and one was hemolizated. Each blank sample was tested for interference and to ensure selectivity at the LLOQ for both analytes and IS retention times. Some potential exogenous xenobiotics that can be easily found in oral fluid, such as nicotine and caffeine, were also investigated in this matrix for interference.

A calibration curve in biological matrix was prepared daily by spiking the matrix with known concentrations of the analyte in order to evaluate the relationship between instrument response and known concentrations of the analyte. The calibration curve were prepared and analyzed in three different days and consisted of a blank sample made from a pool, a zero sample (matrix sample with IS), and seven to eight samples in the concentrations of 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 ng/mL for oral fluid and plasma and 4, 8, 16, 32, 64, 128 and 256 ng/mL for urine. Since the data at the high end of the calibration was dominating the calculation of the linear regression resulting in excessive error at the bottom of the curve, least squares regression with a weighting factor of 1/x was applied for both analytes using the ratio of the peak area of analyte to the peak area of the IS. The acceptance criteria for standards and LLOQ were a deviation lower than 15% and 20% of nominal concentrations, respectively. The acceptance criterion for the standard curve is that at least 75% of non-zero standards should meet the above criteria, including the LLOQ.

For accuracy, each QC sample – LLOQ, LQC, MQC, HQC and DQC – was prepared and analyzed for eight replicates and the deviation of the mean from the true value (bias) was found as accuracy. For precision, each QC sample – LLOQ, LQC, MQC, HQC and DQC – was prepared and analyzed for eight replicates on the same day (precision within-run) and on three different days (precision between-run) and the coefficient of variation (CV) of the measured values was found as precision. LQC, MQC, HQC and DQC must be within 15% and LLOQ within 20% for both accuracy and precision.

Carryover was evaluated by analyzing one sample of blank matrix before and two subsequently to the highest analytical level. Recovery of the extraction step was

analyzed by comparing eight samples that were fortified and extracted of LQC and HQC to eight samples that were extracted and then fortified.

2.6.1 Matrix effect

Matrix effects on the ESI signal during chromatography were investigated in two different forms: (1) qualitative evaluation through post-column infusion of the analytes as describe by Hoff *et al.* (2015) and (2) quantitative evaluation through post extraction addition. In the last one, six drug-free samples of each matrix from different sources were extracted and then fortified with the analytes at LQC and HQC concentrations and IS. Four reference standard solutions were also prepared with the analytes at LQC and HQC concentrations and IS in mobile phase A. The normalized matrix factor (NMF) was calculated for each sample as shown below. The CV of the NMF samples mean was compared to non normalized samples mean.

$$NMF = \frac{\text{analyte peak area of post extraction addition sample/ IS peak area of post extraction addition sample}}{\text{analyte peak area in solution/ IS peak area in solution}}$$

2.6.2 Stability

Stability of the analytes in oral fluid, plasma and urine was evaluated in three LQC and three HQC samples for each matrix. For processed sample stability, the samples were injected just after being processed and after being maintained on the equipment injector (10°C) for 12 hours. Long-term frozen storage stability was evaluated at one and two months of storage for plasma and urine and at six months for oral fluid. This stability was performed by comparing the samples that were freshly prepared and processed to the ones that were stored and then processed to analysis. Stability of both analytes in the same solution was also assessed in two concentrations, being one low and one high, at three months of frozen storage by comparison with samples freshly prepared.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Method validation

Figure 2 shows an example of the chromatograms obtained in the three matrices. The methods were selective for both analytes. Potential exogenous

xenobiotics investigated in oral fluid – nicotine, and caffeine – do not interfere in the analysis. Thereby, the method is able to differentiate and quantify the analytes under the used chromatographic conditions.

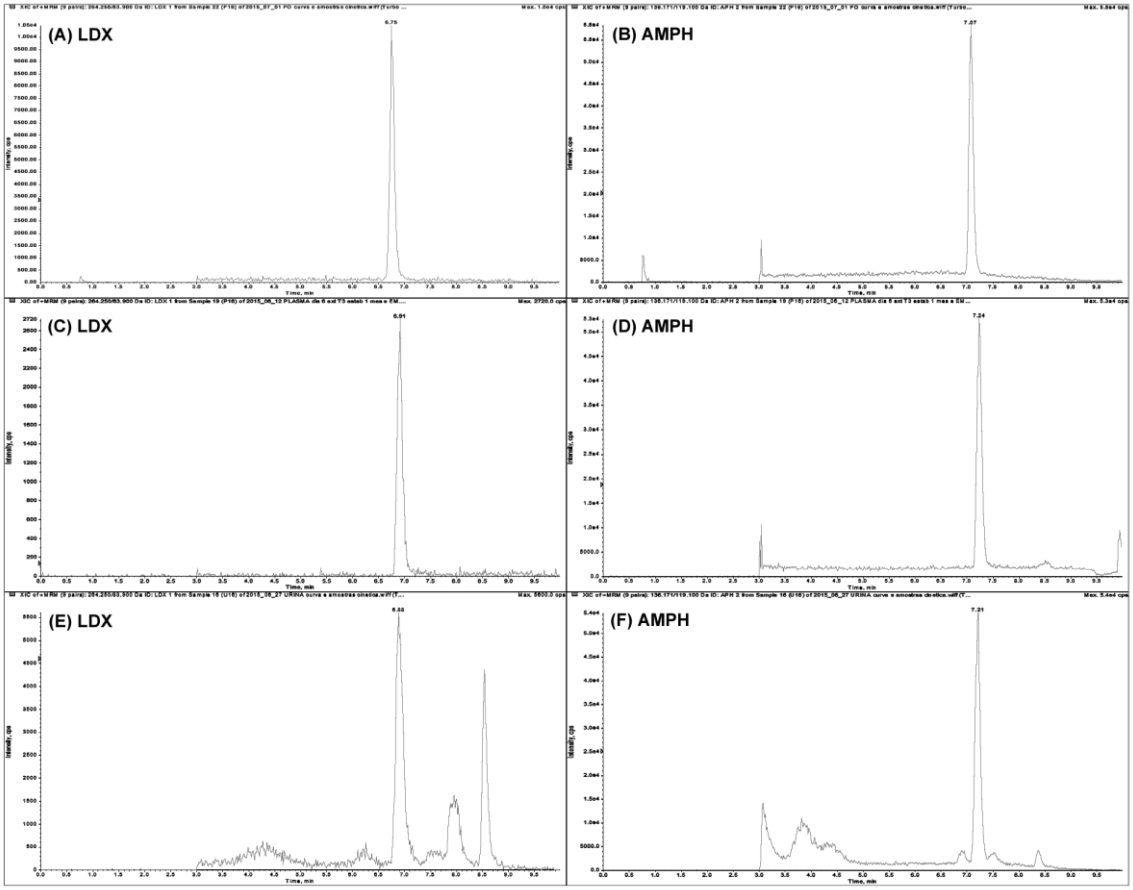


Figure 2: Quantifier transition chromatograms of LDX and AMPH in oral fluid (A and B), in plasma (C and D) and in urine (E and F) samples spiked at 16 ng/mL.

Linearity was obtained with a coefficient of correlation (r) > 0.99 over the range analyzed. Mean regression equations for ANF and LDX were, respectively, y=0.0563x+0.0052 and y=0.0249x-0.0001 for oral fluid, y=0.0491x+0.0244 and y=0.0048x-0.0003 for plasma and y=0.0446x+0.2207 and y=0.0141x+0.0071 for urine. The linear approach adequately defined the relationship between concentration and response. The LLOQ was 1 ng/mL for both analytes in oral fluid and plasma and 4 ng/mL for urine. Accuracy and precision were satisfactory for all the tested concentrations (Table II) and the extent of recovery of the analytes were consistent, precise, and reproducible. There was no carryover in the methods.

Table II: Recovery and inter-day accuracy and precision.

	Accuracy (bias%)					Precision (CV%)					Recovery (%)	
	LLOQ	LQC	MQC	HQC	DQC	LLOQ	LQC	MQC	HQC	DQC	LQC	HQC
Oral fluid												
AMPH	-2.2	-3.5	-3.0	-5.2	-0.5	12.2	8.9	6.8	7.0	5.1	150.8	121.4
LDX	5.7	6.9	-3.3	-3.7	11.7	12.8	11.6	12.5	11.4	9.4	106.8	121.0
Plasma												
AMPH	-8.7	-7.4	-2.4	-4.1	-3.9	14.7	8.9	6.4	8.6	10.1	51.6	49.3
LDX	-0.3	-0.8	-0.6	-0.8	0.2	16.2	10.3	11.8	12.1	10.4	56.4	44.7
Urine												
AMPH	-4.7	6.8	6.7	4.0	-0.7	17.1	9.5	4.6	5.8	7.7	94.6	90.5
LDX	-4.9	3.6	9.3	9.7	-5.2	10.5	5.8	5.5	4.4	9.0	67.2	59.4

3.1.1 Matrix effect

Matrix compounds often co-elute with the target analyte causing ion suppression or enhancement in LC-MS/MS. And, even though blank chromatograms do not show any peaks at analytes retention time, matrix effect can be present (Van Eeckhaut et al. 2009). Post-column infusion shows only qualitative evaluation. For oral fluid, suppression effect occurred in the region of analytes signal (6.3-7.5 min) forward for AMPH. For urine, signal suppression was observed throughout the chromatogram. Whereas for plasma, the signal did not show suppression or enhancement in the analytes signal region (Figure 3). Considering the quantitative QC method, matrix effect was detected for both analytes shown by the variation among individuals (CV) (Table III). One of the approaches to compensate for the alteration in signal caused by co-eluting matrix compounds is the use of a IS (Van Eeckhaut et al. 2009). For urine samples, QC method showed that the use of IS compensated part of the matrix effect for both analytes. Although, it still remained relatively high, probably due to the variability of urine samples from different subjects since it accounts for the elimination of the different substances according to each individual's diet. IS also compensated the matrix effect for AMPH in oral fluid samples and which did not happen for LDX. Considering plasma analysis, IS did not make considerable difference for both analytes. Among the three matrices, plasma was the

one which showed the lowest matrix effect, which can be associated with the more complex extraction step.

Sample preparation was performed by protein precipitation for plasma, with a small amount of organic solvent, dilution for oral fluid and filtration for urine, both with no amount of organic solvent. Thus, pre-treatment is simple, since it uses a small variety of reagents and solvents readily available in laboratories, requiring little or none quantity of organic solvent. Considering oral fluid and urine, pre-treatment step can be considered very fast and of low complexity and probably because of it, the developed methods for these matrices have shown a slight matrix effect. However, for matrices used in screening tests, speed and simplicity on sample preparation are very important. To achieve this result, sometimes it is necessary to accept the presence of a slight effect which accompanies a lower pre-treatment of biological samples. Nevertheless, it is necessary to observe that despite the presence of the suppression effect, the methods are precise and accurate within the guide limits and reached the expected sensitivity. Thus, it is possible to accept the obtained result in this case. This may be assigned to the absence of peak signal suppression and/or enhancement and to the presence of entire run signal suppression or continuous suppression zones, making a baseline that do not impair the quantification of the analyte in its signal zone.

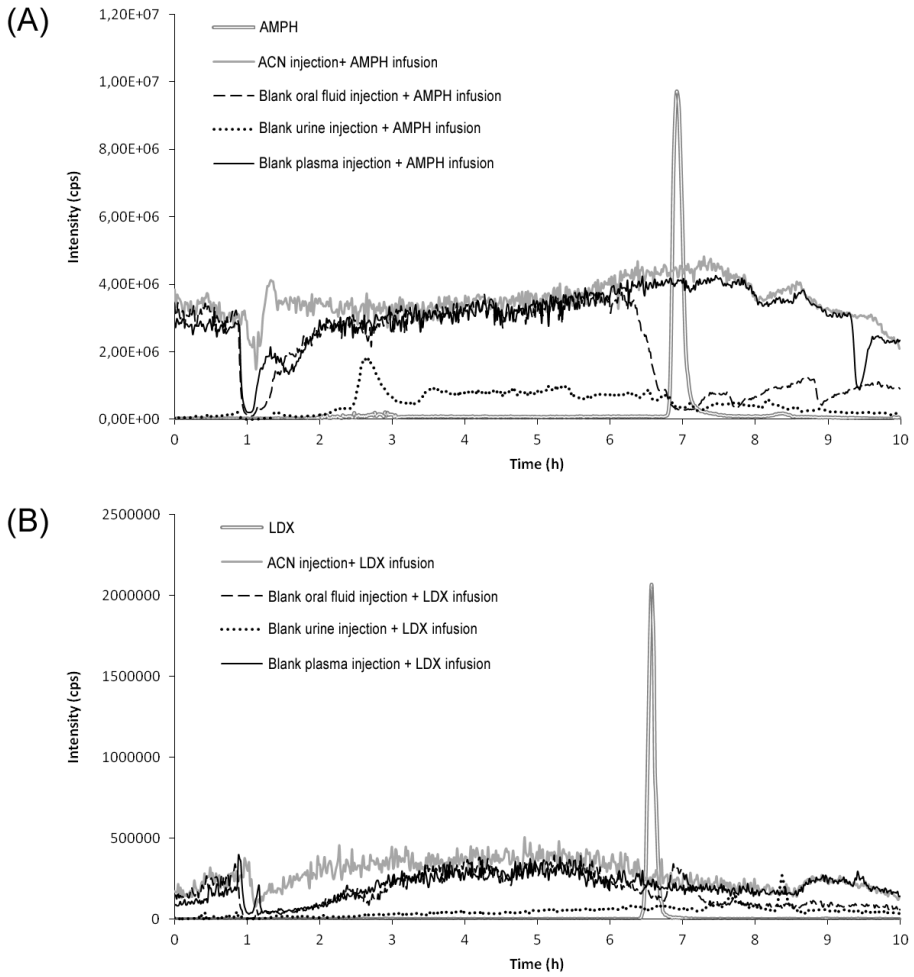


Figure 3: Matrix effect evaluation through post-column infusion for the quantification transitions of AMPH (A) and LDX (B) in oral fluid, plasma and urine.

Table III: Matrix effect evaluation.

	QC method (CV%)			
	Without IS		With IS	
	LQC	HQC	LQC	HQC
Oral fluid				
AMPH	24.8	20.2	4.7	3.0
LDX	8.4	8.2	24.3	30.7
Plasma				
AMPH	6.4	5.6	8.3	5.8
LDX	2.4	9.0	7.5	8.1
Urine				
AMPH	32.9	39.6	22.8	24.5
LDX	52.6	53.5	23.9	31.7

3.1.2 Stability

Sample stability assays of AMPH and LDX were made in the three matrices. Literature have already shown LDX and AMPH stability in plasma for 24 hours at room temperature and 4 cycles of freezing and thawing (Boellner et al. 2010). Processed samples of three matrices were stable at 10°C for 12h. At the end of the first month, LDX and AMPH were stable (within ±15%) in plasma and urine. At the end of the second month, they were stable (within ±15%) in plasma and only LDX in urine. Both analytes were stable (within ±15%) in oral fluid for 6 months. The analytes showed stability in aqueous solution during the assessed period of three months.

4 ANALYSIS OF REAL SAMPLES

To prove the validated method, it was applied in real samples of oral fluid, plasma and urine. The study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and all volunteers provided written informed consent. The three matrices were collected from six male volunteers at 2 hour time point after they orally ingested 70 mg of LDX (Venvanse®, Shire Farmacêutica Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil). LDX and AMPH mean concentrations were, respectively, 16,3 and 136,1 ng/mL for oral fluid, 30,6 and 39,0 ng/mL for plasma and 2492,7 and 1513,4 ng/mL in urine.

This analytical method was used to determine LDX and its main metabolite AMPH in conventional and alternative matrices. Plasma and urine are already established as matrices to detect substances in the organism in several situations that each one allows. The use of oral fluid as a matrix for biological analysis has grown, both in toxicological analysis and in drug monitoring, due to its advantages over more conventional matrices.

The already existing method for plasma used in most articles of pharmacokinetics employs liquid-liquid extraction and the procedure is not fully described. Even more, the extraction utilizes organic solvents such as toluene that is in disuse due to its toxicity (Boellner et al. 2010; Ermer et al. 2013a). Liquid-liquid extraction often requires pH adjustments to transfer the analyte to organic layer and the uses small quantities of biological samples hindering the separation of the target phase due to emulsification. Recently, another method was published using protein precipitation (Ermer et al. 2015). Initial plasma aliquot used is the same but the

method in this paper has lower solvent consumption in the sample preparation step with the same LLOQ for LDX and more sensitive for AMPH.

A method for urine analysis of LDX was explored in the field of doping in the literature (Thevis et al. 2014). It did not include AMPH, but for LDX it has a very low LLOQ since the equipment used is different and allows better sensitivity. The method developed and validated in this paper for urine has a very similar sample preparation using an equipment much more easily found in the laboratories and it includes both LDX and AMPH when compared to the doping method.

To the best of our knowledge this is the first method addressing LDX detection in oral fluid. It detects LDX and AMPH with the same sensitivity as plasma using just a dilution as sample preparation.

5 CONCLUSION

The method is sensitive and specific and allows simultaneous quantification of LDX and its biotransformation product AMPH in human oral fluid, plasma and urine. For oral fluid and urine, sample preparation is fast and simple, making them very suitable for screening. Plasma sample preparation provides an adequate sample for confirmation step, in which this matrix is generally employed. The method developed for the three matrices was validated and was also successfully applied to assess real samples, showing for the first time the detection of lisdexamfetamine in oral fluid. They fitted for the intended purpose and can be useful in the different fields of application.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for the financial support and scholarships and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) for the financial support.

References

Biederman J, Boellner SW, Childress A, Lopez F a, Krishnan S, Zhang Y. Lisdexamfetamine dimesylate and mixed amphetamine salts extended-release in children with ADHD: a double-blind, placebo-controlled, crossover analog classroom study. Biol Psychiatry. 2007 Nov 1;62(9):970–6.

Boellner SW, Stark JG, Krishnan S, Zhang Y. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a single-dose, randomized, open-label, crossover. Clin Ther. Excerpta Medica Inc.; 2010 Feb;32(2):252–64.

Brasil. RDC nº 36, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União; 2011 p. 113–7.

Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009 Aug 1;877(23):2198–207.

Ermer J, Corcoran M, Martin P. Lisdexamfetamine Dimesylate Effects on the Pharmacokinetics of Cytochrome P450 Substrates in Healthy Adults in an Open-Label, Randomized, Crossover Study. Drugs R D. Springer International Publishing; 2015;

Ermer J, Haffey MB, Richards C, Lasseter K, Adeyi B, Corcoran M, et al. Double-blind, placebo-controlled, two-period, crossover trial to examine the pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy older adults. Neuropsychiatr Dis Treat. 2013a Jan;9:219–29.

Ermer J, Haffey MB, Richards C, Lasseter K, Roesch B, Purkayastha J, et al. An open-label investigation of the pharmacokinetic profiles of lisdexamfetamine dimesylate and venlafaxine extended-release, administered alone and in combination, in healthy adults. Clin Drug Investig. 2013b;33(4):243–54.

Ermer JC, Dennis K, Haffey MB, Doll WJ, Sandefer EP, Buckwalter M, et al. Intranasal versus Oral Administration of Lisdexamfetamine Dimesylate: A Randomized, Open-Label, Two-Period, Crossover, Single-Dose, Single-Centre Pharmacokinetic Study in Healthy Adult Men. Clin Drug Investig. 2011 Jan;31(6):357–70.

Ermer JC, Haffey MB, Doll WJ, Martin P, Sandefer EP, Dennis K, et al. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate after targeted gastrointestinal release or oral administration in healthy adults. Drug Metab Dispos. 2012 Feb;40(2):290–7.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001.

Hoff RB, Rübensam G, Jank L, Barreto F, Ruaro Peralba MDC, Pizzolato TM, et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. Talanta. Elsevier; 2015 Jan;132:443–50.

Jasinski DR, Krishnan S. Human pharmacology of intravenous lisdexamfetamine dimesylate: abuse liability in adult stimulant abusers. J Psychopharmacol. 2009 Jun;23(4):410–8.

Krishnan S, Zhang Y. Relative bioavailability of lisdexamfetamine 70-mg capsules in fasted and fed healthy adult volunteers and in solution: a single-dose, crossover pharmacokinetic study. J Clin Pharmacol. 2008 Mar;48(3):293–302.

Krishnan SM, Pennick M, Stark JG. Metabolism, Distribution and Elimination of Lisdexamfetamine Dimesylate Open-Label, Single-Centre, Phase I Study in Healthy Adult Volunteers. Clin Drug Investig. 2008;28(12):745–55.

Krishnan SM, Stark JG. Multiple daily-dose pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy adult volunteers. Curr Med Res Opin. 2008 Jan 1;24(1):33–40.

Maurer HH. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. Clin Biochem. 2005 Apr;38(4):310–8.

Mickle T, Krishnan S, Bishop B, Lauderback C, Moncrief JS, Oberlender R, et al. Abuse-resistant amphetamine compounds (US 7,105,486 B2). United States; 2006.

Musshoff F. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. Drug Metab Rev. 2000 Feb;32(1):15–44.

Pennick M. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. Neuropsychiatr Dis Treat. 2010 Jan;6:317–27.

Pennick M. Metabolism of the prodrug lisdexamfetamine dimesylate in human red blood cells from normal and sickle cell disease donors. J Drug Assess. 2013;2:17–20.

Roesch B, Corcoran ME, Fetterolf J, Haffey M, Martin P, Preston P, et al. Pharmacokinetics of coadministered guanfacine extended release and lisdexamfetamine dimesylate. Drugs R D. 2013;13(2):119–28.

Rowley HL, Kulkarni R, Gosden J, Brammer R, Hackett D, Heal DJ. Lisdexamfetamine and immediate release d-amfetamine - differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activit. Neuropharmacology. Elsevier Ltd; 2012 Nov;63(6):1064–74.

Shire. Highlights and Full Prescribing Information/Medication Guide. Revised 04/2015 [Internet]. 2015a [cited 2015 Sep 10]. p. 1–31. Available from: http://pi.shirecontent.com/PI/PDFs/Vyvanse_USA_ENG.pdf

Shire. Shire Estados Unidos [Internet]. 2015b [cited 2015 Mar 2]. Available from: www.shire.com

Thevis M, Sigmund G, Thomas A, Vogel M, Walpurgis K, Kwiatkowska D, et al. Isotope-dilution mass spectrometric quantification of the prodrug lisdexamfetamine in human urine in doping control analysis. Rapid Commun mass Spectrom. 2014 Apr 15;28(7):781–6.

United States. Schedules of Controlled Substances: Placement of Lisdexamfetamine Into Schedule II. Final Rule. 21 CFR Part 1308. Fed Regist. 2007;72(85):24532–4.

8 CAPÍTULO 5 – *FARMACOCINÉTICA DA LISDEXANFETAMINA E ANFETAMINA EM FLUIDO ORAL, PLASMA E URINA APÓS ADMINISTRAÇÃO CONTROLADA DE LISDEXANFETAMINA*

8.1 Manuscrito V

A seguir encontra-se disposto o artigo intitulado *"Lisdexamfetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid, plasma and urine after controlled oral administration of lisdexamfetamine"* submetido para publicação no periódico *Toxicology and Applied Pharmacology*. Este artigo descreve a farmacocinética da LDX e de seu produto de biotransformação *d*-ANF após a administração controlada de LDX a voluntários saudáveis utilizando a técnica de detecção descrita no Capítulo 4.

LISDEXAMFETAMINE AND AMPHETAMINE PHARMACOKINETICS IN ORAL FLUID, PLASMA AND URINE AFTER CONTROLLED ORAL ADMINISTRATION OF LISDEXAMFETAMINE

Eloisa Comiran[a*], Graciela Carlos[a], Fabiano Barreto[b], Flavio Pechanksy[c]; Pedro E. Fröehlich[a], Renata Pereira Limberger[a]

[a]Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
[b]Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, National Agricultural Laboratory - LANAGRO/RS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
[c]Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas of Porto Alegre - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Address correspondence to this author at the Graduate Studies Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga Avenue, Santana, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel/Fax: +55-51-3308-5762/+55-51-3308-5243; E-mail: eloisacomiran@gmail.com

Running head: LDX and AMPH pharmacokinetics after administration of LDX

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the volunteers who participated in this study providing the samples. The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for support and scholarships and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) for financial support.

ABSTRACT

BACKGROUND: Lisdexamfetamine (LDX) is a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and binge-eating disorder (BED) symptoms. *In vivo* hydrolysis of the LDX amide bond releases the therapeutically active *d*-amphetamine (*d*-AMPH).

OBJETIVE: This study aims to describe the pharmacokinetics of LDX and its major metabolite *d*-AMPH in human oral fluid, urine and plasma after a single 70 mg oral dose of LDX.

METHODS: Six volunteers participated in the study. Oral fluid and blood samples were collected for up to 72 hours and urine for up to 120 hours post drug administration for the pharmacokinetic evaluation of intact LDX and *d*-AMPH. Samples were analyzed by LC-MS/MS.

RESULTS: Regarding noncompartmental analysis, *d*-AMPH reached the maximum concentration at 3.8 and 4 hours post administration in plasma and oral fluid, respectively, with a mean peak concentration value almost 6-fold higher in oral fluid. LDX reached maximum concentration at 1.2 and 1.8 hours post administration in plasma and oral fluid, respectively, with a mean peak concentration value almost 2-fold higher in plasma.

CONCLUSION: Intact LDX and *d*-AMPH were detected in the three matrices. The best fit of compartmental analysis was found in the 1-compartment model for both analytes in plasma and oral fluid. There was a correlation between oral fluid and plasma *d*-AMPH concentrations and between parent to metabolite ratios over time in plasma as well as in oral fluid.

Keywords: lisdexamfetamine, amphetamine, pharmacokinetics, toxicology, biological matrices.

INTRODUCTION

Lisdexamfetamine (LDX) is a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and, more recently, for binge-eating disorder (BED) symptoms.[1] ADHD is characterized by a persistent pattern of inattention and/or hyperactivity-impulsivity that interferes with functioning or development and it can affect children, adolescents and adults.[2] LDX is the first FDA-approved medication for BED which is characterized by binge-eating episodes occurring at least once a week during 3 months accompanied by a feeling of lack of control and without regular compensatory behaviors. Binge-eating is defined as eating a definitely larger amount food than most people would consume in a similar period and circumstances.[2] Both neuropsychiatric conditions are estimated to affect a significant portion of the population[3–5] and must not be neglected.

The hydrolysis of the LDX amide bond occurs *in vivo* releasing the therapeutically active molecule *d*-amphetamine (*d*-AMPH) and the amino acid *l*-lysine.[6] LDX dosages of 20, 30, 40, 50, 60 and 70 mg are converted to 5.9, 8.9, 11.9, 14.8, 17.8 and 20.8 mg of *d*-AMPH, respectively, allowing better adjustment of optimal dosing.[7] Studies show that orally and intravenously administered LDX does not result in the same concentration profile as an equivalent dose of *d*-AMPH and nor the same liking scores of abuse liability. When the LDX dose is about 50% higher than the equivalent in *d*-AMPH, it starts to show a similar potential for abuse.[8,9] It should be considered that the population studied had a history of stimulant abuse[8] and probably some tolerance, therefore the outcome could be very different in a population without this background. However, both LDX and AMPH are controlled substances because of the known potential for abuse and dependence.

In toxicology, analysis is often linked to legal consequences and the knowledge of pharmacokinetics of substances which give rise to AMPH is extremely important since it shows how long a substance can be detected in a particular matrix and the levels that can be achieved. This knowledge makes it easier to interpret positive results for this analyte and may guide the next analysis steps.

The detection of LDX and AMPH in biological fluids such as blood and urine has already been reported, and the pharmacokinetics of these analytes in plasma has been extensively described.[9–23] To the best of the authors' knowledge, the pharmacokinetic profile of LDX and its main metabolite, *d*-AMPH, in oral fluid and

urine has not been described so far. Therefore, this study aims to describe the pharmacokinetics of LDX and its major metabolite *d*-AMPH in human oral fluid, urine and plasma after a single 70 mg oral dose of LDX dimesylate, to determine the average concentrations of both analytes and to estimate their detection window, helping interpret the toxicological tests. Even more, this study was undertaken to evaluate if LDX identification and quantification is possible in oral fluid providing unique information for the interpretation of oral fluid drug test results.

MATERIALS AND METHODS

Participants and study design

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and all volunteers gave their written informed consent prior to study initiation.

Initial exclusion criteria included nicotine use, chronic medication use and history of significant cardiovascular abnormalities. Before admission, each participant underwent laboratory tests and electrocardiogram evaluations. Abnormalities in the screening tests were also considered exclusion criteria. At study completion, laboratory tests and electrocardiogram were repeated.

On day 1, a single oral dose of a 70 mg Venvanse® capsule (Shire Farmacêutica Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) was administered with 200 mL of water after an overnight fast of ≥8 hours. The volunteers remained in the hospital's clinical research center for 10 hours post administration where they were given standardized meals at 3, 6 and 9 hours after administration. After that period they returned for punctual collections of oral fluid and blood at 24, 48 and 72 hours post administration.

Volunteers were asked to refrain from alcohol intake during the study.

Sample collection

Oral fluid samples were collected by spitting into 1.5 mL polypropylene tubes. Blood was collected using a polyethylene catheter or a scalp vein needle with an attached catheter to minimize pain from multiple hand vein sticks and placed in 5 mL EDTA-containing vacuum tubes. Collection of oral fluid and blood occurred simultaneously at pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48 and 72

hours after administration. Oral fluid samples were centrifuged to reduce mucus and blood tubes were centrifuged to obtain plasma.

Urine was collected in 2 liter plastic bottles at 0-2, 2-4, 4-8, 8-12, 12-18, 18-24, 24-36, 36-48, 48-72, 72h-96 and 96-120 hours intervals.

All samples were fractionated and stored frozen at -80 °C prior to analysis.

Sample analysis

Samples of oral fluid, plasma and urine were analyzed for LDX and AMPH using the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method previously validated by our research group. As the administration was controlled in individuals without history of substance abuse, all the AMPH detected was assumed to be the *d*-AMPH enantiomer from LDX.

Pharmacokinetic and statistical analysis

Noncompartmental and compartmental analyses of concentration–time data were evaluated using Microsoft Excel 2007 (Microsoft, United States) and Scientist v.3.0 (Micromath, United States), respectively. In the compartmental analysis, model selection criteria were used to evaluate the best fitting model.

Noncompartmental analysis included the following parameters: area under the concentration–time curve from time zero to 72 hours (AUC_{72}), area under the concentration–time curve from time zero to infinity (AUC_{∞}), apparent total clearance of the drug after oral administration (CL/F), renal clearance of the drug from plasma (CL_R), maximum (peak) drug concentration (C_{max}), absorption rate constant (k_a), elimination rate constant from the central compartment (k_e), time to reach maximum (peak) concentration following drug administration (t_{max}), elimination half-life ($t_{½}$), apparent volume of distribution after nonintravenous administration (Vd/F).

Compartmental analysis included AUC_{∞}, C_{max}, k_a, k_e, model selection criteria (MSC), lag time (t_0), t_{max}, $t_{½}$, absorption half-life ($t_{½abs}$), Vd/F. MSC was used to evaluate the best fitting model.

RESULTS AND DISCUSSION

Volunteer data

Six males participated in the study. Their mean age was 29 ± 5 years (range, 20–34 years); their mean height was 1.75 ± 7 m (range, 1.64–1.83 m), and their mean weight was 76.8 ± 14.1 kg (range, 59.0–95.0 kg).

Noncompartmental analysis

LDX pharmacokinetics in oral fluid and plasma

LDX detection is very short in plasma and oral fluid, as expected for rapidly metabolized drugs.[19] Detection in plasma was initiated at 0.5 hour for most volunteers (range 0.25 - 0.75 hours) and in oral fluid at 1 hour for most volunteers (range 0.5 - 1 hours). The detection in oral fluid began at the same time as plasma for 1 volunteer, and for all the others occurred approximately 0.25 hours later, demonstrating the passage from plasma to saliva.

Due to its physicochemical properties of high aqueous solubility (greater than 0.85 g/mL in the pH range of 1 to 8) and low lipophilicity (logP −1.75), LDX absorption in the small intestine occurs via carrier-mediated transport.[19] Also, these properties can predict poor passive diffusion across biological membranes,[19] which is the main pathway for most drugs to enter the oral fluid. LDX concentrations in oral fluid are very low, corroborating the hypothesis of poor passive diffusion across biological membranes. Nevertheless, this molecule could also enter the saliva via some kind of carrier-mediated transport as it does in the small intestine or use ultrafiltration through pores in the membrane since its molecular weight is less than 300 Daltons.[24] Hence, the latter two hypotheses are also possible, even the LDX concentrations are low, seeing that LDX biotransformation to *d*-AMPH is fast, with only a small quantity of LDX remaining to enter the saliva.

LDX reached the maximum plasma concentration of 45.8 µg/L at 1.2 hours and the maximum oral fluid concentration of 15.4 µg/L at 1.8 hours. There was a reduced exposure to LDX in oral fluid compared to plasma, contrary to what happened to *d*-AMPH.

Elimination parameters also differed from plasma to oral fluid. Although LDX concentrations are lower in oral fluid, the elimination was slower and detection

occurred up to 3 hours in plasma and 5 hours in oral fluid. This is probably due to the aforementioned physicochemical properties of the molecule that may hinder the transport through membranes. Repeated dose studies showed that there is no accumulation of intact LDX in plasma steady-state.[16]

The pharmacokinetic parameters for noncompartmental analysis of LDX are summarized in Table I and mean concentration-time curves in plasma and in oral fluid are shown in Figure 1.

Table I: Noncompartmental analysis of LDX in plasma, oral fluid and urine after a 70 mg single dose administration of Venvanse® (n=6).

	PLASMA		ORAL FLUID		URINE			
					Sigma-Minus method		Rate method	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
t_{max} (h)	1.2 ± 0.3	0.8-1.5	1.8 ± 0.3	1.5-2.0				
C_{max} (µg/L)	45.8 ± 19.3	23.5-73.0	15.4 ± 15.3	6.7-46.3				
k_e (h^{-1})	1.6 ± 0.2	1.3-1.8	0.65 ± 0.46	0.16-1.38	0.21 ± 0.03	0.17-0.26	0.49 ± 0.23	0.32-0.90
k_a (h^{-1})[a]	2.46 ± 0.52	1.90-3.33						
$t_{½}$ (h)	0.4 ± 0.1	0.4-0.6	1.8 ± 1.4	0.5-4.4	3.39 ± 0.57	2.64-4.04	1.63 ± 0.55	0.77-2.16
AUC_{72} (h·µg/L)	52.4 ± 18.3	29.2-73.3	23.3 ± 16.1	13.5-55.6				
AUC_{∞} (h· µg/L)	54.6 ± 18.2	31.0-75.4	28.6 ± 15.9	14.3-57.7				
Vd/F (L)	529 ± 195	308-831						
CL/F (L/h)	824 ± 303	537-1304						
CL_R (L/h)	287 ± 243	110-747						

AUC_{72} = area under the concentration–time curve from time zero to time 72 hours; AUC_{∞} = area under the concentration–time curve from time zero to infinity; CL/F = apparent total clearance of the drug after oral administration; CL_R = renal clearance of the drug from plasma; C_{max} = maximum (peak) drug concentration; k_a = absorption rate constant; k_e = elimination rate constant from the central compartment; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; $t_{½}$ = elimination half-life; Vd/F = apparent volume of distribution after nonintravenous administration.
[a]k_a calculated using Wagner-Nelson method.

d-AMPH pharmacokinetics in oral fluid and plasma

d-AMPH from LDX began to appear in plasma at between 0.25 and 1 hour (0.5 hours for most volunteers) and reached the maximum concentration of 62.2 µg/L at 3.8 hours post administration, while in oral fluid, due to the time to pass from plasma to saliva, detection began between 0.25 and 1 hour and reached the maximum concentration of 363.0 µg/L at 4.0 hours post administration. As expected for drugs with weak base characteristics, the metabolite *d*-AMPH accumulates in saliva by trapping due to the plasma-saliva pH difference, enhancing its concentration in oral fluid. Thus, there was an enhancement in the exposure to *d*-AMPH in oral fluid compared to plasma.

Elimination parameters for both plasma and oral fluid were similar, with a half-life of approximately 11 hours. This value was very close to the study of Krishnan *et al.*[17] that verified this parameter similarity to studies of direct ingestion of *d*-AMPH tablets, and suggested that the prodrug metabolism does not alter the volume of distribution and the clearance rate of *d*-AMPH.

In plasma, d-AMPH was detected until 48 hours for most volunteers but in one subject, the same who began detection later than the others, at 1 hour, it was until 72 hours. Whereas in oral fluid, just two subjects were detected until 48 hours, the majority, 4 out of 6, were deteced until 72 hours. Literature has already reported that the detection time was longer than 24 hours in plasma, and even so a 7 day repeated dose study showed that there is no accumulation.[16]

The pharmacokinetic parameters for noncompartmental analysis of *d*-AMPH are summarized in Table II and the mean concentration-time curves in plasma and in oral fluid are shown in Figure 1.

Table II: Noncompartmental analysis of *d*-AMPH in plasma, oral fluid and urine after a 70 mg single dose administration of Venvanse® (n=6).

	PLASMA		ORAL FLUID		URINE			
					Sigma-Minus method		Rate method	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
t_{max} (h)	3.8 ± 0.8	3.0-5.0	4.0 ± 1.1	3.0-5.0				
C_{max} (µg/L)	62.2 ± 4.0	57.8-68.1	363.0 ± 245.0	100.0-809.0				
k_e (h^{-1})	0.07 ± 0.01	0.05-0.09	0.07 ± 0.02	0.05-0.10	0.013 ± 0.004	0.008-0.020	0.03 ± 0.01	0.01-0.04
k_a (h^{-1})[a]	0.74 ± 0.25	0.31-1.07						
$t_{½}$ (h)	10.7 ± 2.1	7.8-14.0	10.5 ± 2.3	6.7-12.8	56.7 ±16.8	34.5-84.0	29.9 ± 12.2	15.8-51.1
AUC_{72} (h·µg/L)	1091.6 ± 90.0	978.6-1205.3	4506.7 ± 2430.7	1448.4-8619.5				
AUC_{∞} (h· µg/L)	1134.0 ± 93.7	1021.6-1240.7	4560.7 ± 2437.4	1511.9-8689.5				
Vd/F (L)	549 ± 87	444-658						
CL/F (L/h)	36 ± 3	33-40						
CL_R (L/h)	14 ± 5	9-23						

AUC_{72} = area under the concentration–time curve from time zero to time 72 hours; AUC_{∞} = area under the concentration–time curve from time zero to infinity; CL/F = apparent total clearance of the drug after oral administration; CL_R = renal clearance of the drug from plasma; C_{max} = maximum (peak) drug concentration; k_a = absorption rate constant; k_e = elimination rate constant from the central compartment; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; $t_{½}$ = elimination half-life; Vd/F = apparent volume of distribution after nonintravenous administration.

[a]k_a calculated using Wagner-Nelson method.

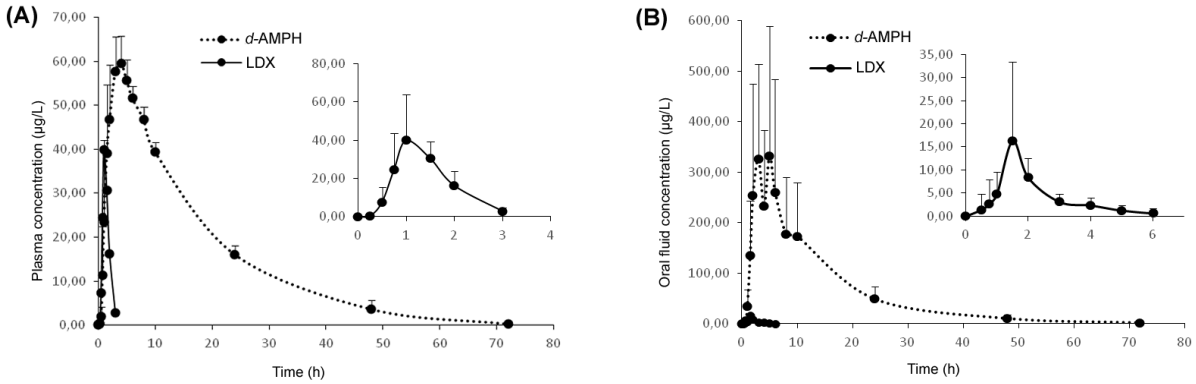


Figure 1: Mean concentration-time curve of *d*-AMPH and LDX in plasma (A) and oral fluid (B) after a 70 mg single dose administration of Venvanse®. Error bars represent SD.

d-AMPH and LDX urine pharmacokinetics

Data on urine pharmacokinetics can give a notion of how the drug metabolization occurs in the body. Urine is the main elimination route of LDX with 96.4% of the dose being recovered in a 120 hour period.[17]

The elimination rate constant for *d*-AMPH and LDX was calculated using the Sigma-Minus and Rate method and the results were close (Tables I and II). Figure 2 shows the graphics obtained from mean urine data of the 6 volunteers. AMPH was detected until the 96-120 hour interval at which urine was collected and LDX until 8-12 to 12-18 hour intervals. High variability was seen in the first urine excretion time from 0 to 2 hours with CV reaching 66% for *d*-AMPH and 44% for LDX decreasing with time until 13% for *d*-AMPH and 40% for LDX in the last interval at which detection occurred in all volunteers. This could be due to urine pH differences that affect the rate of excretion of these molecules, in subjects with alkaline urine there is a longer half-life. The lack of pH control can reflect the variability that may be found in real samples.[25]

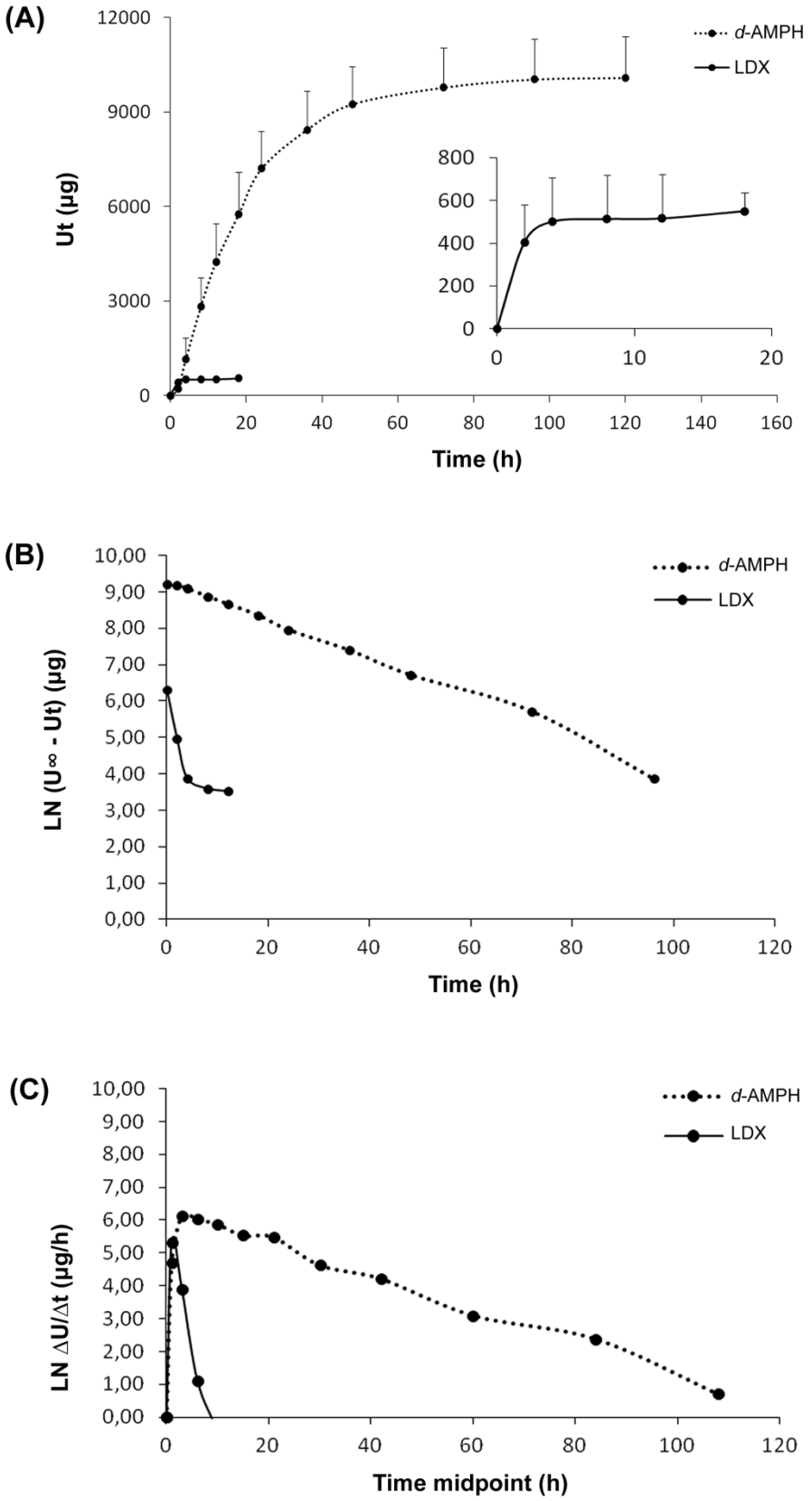


Figure 2: Mean accumulated quantity by time (A), Sigma-Minus method (B) and Rate method (C) for *d*-AMPH and LDX in urine after a 70 mg single dose administration of Venvanse®.

Compartmental analysis

The best compartmental model fitted for *d*-AMPH and LDX in plasma as well as in oral fluid was the 1-compartment model (Table III and Figure 3). Parameters values obtained after the compartmental analysis were very close to those from noncompartmental analysis both in plasma and in oral fluid.

Table III: Compartmental analysis *d*-AMPH and LDX mean concentrations (n = 6) fitted to 1-compartment model.

	PLASMA		**ORAL FLUID**	
	***d*-AMPH**	**LDX**	***d*-AMPH**	**LDX**
t_{max} (h)	3.82	1.04	4.19	1.51
C_{max} (µg/L)	57.19	28.97	286.76	8.27
Ke (h^{-1})	0.07	1.74	0.17	0.79
Ka (h^{-1})	0.80	1.74	0.41	0.79
$t_{½}$ (h)	9.72	0.40	4.14	0.87
$t_{½abs}$ (h)	0.87	0.40	1.69	0.87
t_o (h)	0.49	0.46	0.50	0.25
$AUC_∞$ (h· µg/L)	1023.43	56.06	3203.65	28.91
Vd/F (L)	0.55	0.41	0.75	0.18
MSC	4.91	1.53	1.78	-0.35

$AUC_∞$= area under the concentration–time curve from time zero to infinity; C_{max} = maximum (peak) drug concentration; k_a = absorption rate constant; k_e = elimination rate constant from the central compartment; MSC = model selection criteria; t_0 = lag time; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration after drug administration; $t_{½}$ = elimination half-life; $t_{½abs}$ = absorption half-life; Vd/F = apparent volume of distribution after nonintravenous administration.

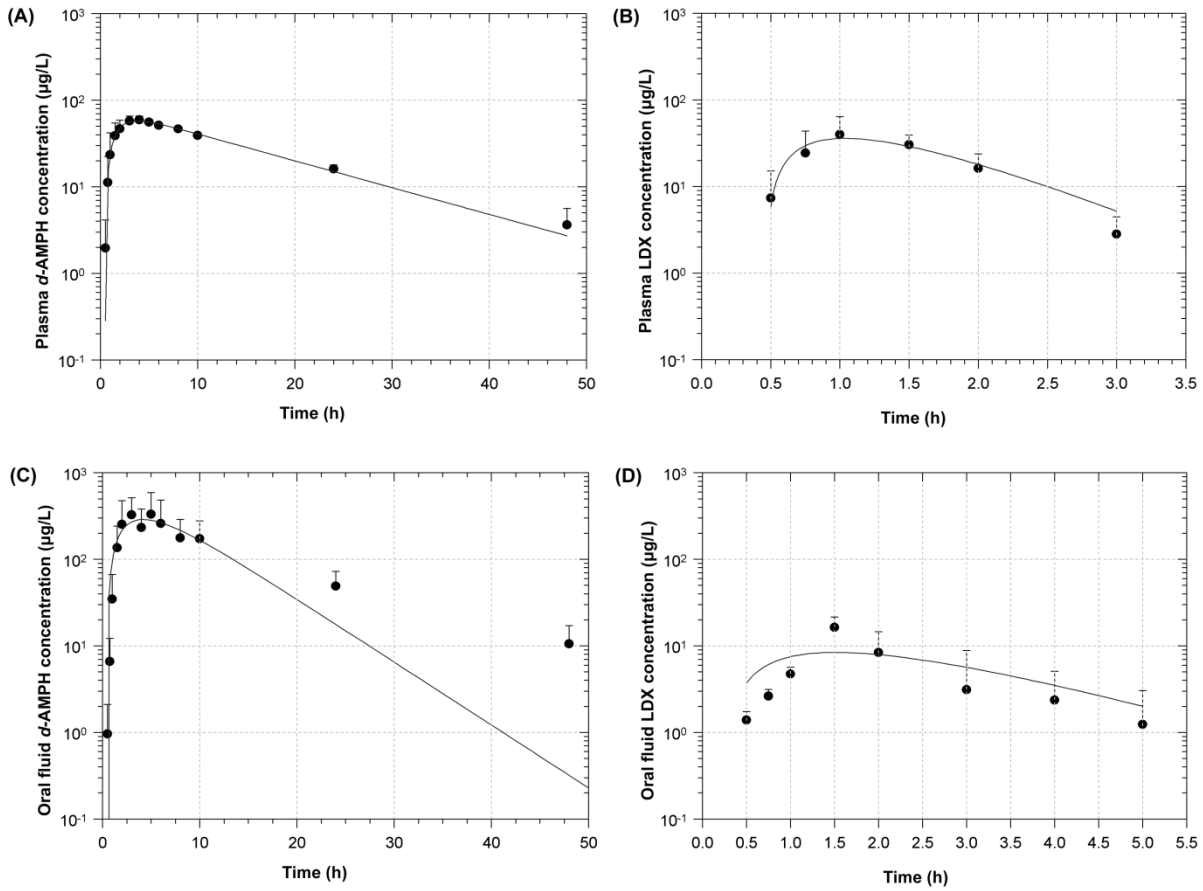


Figure 3: Mean *d*-AMPH and LDX concentrations (n = 6) in plasma (A and B) and oral fluid (C and D) fitted to 1-compartment model. Error bars represent SD.

Detection window

Traditionally, urine is widely used due to its higher concentrations and longer detection time of target substances and blood due to its correlation with the effects caused by the analyte in the body, revealing whether the individual was under its effect at the time of collection. Oral fluid can be correlated with blood for some substances and detection times are close to plasma.[26]

Screening drug tests can detect AMPH due to the use of LDX and the detection window depends on the metabolic characteristics of the individual. The Substance Abuse and Mental Health Services Administration proposes the cutoff for screening analysis of AMPH as 25 and 500 µg/L for oral fluid and urine, respectively.[27,28] Considering these values, screening detection of *d*-AMPH from LDX 70 mg use would be possible from 1-1.5 to 10-24 hours post administration in oral fluid and from 0-4 to 36-72 hours in urine. For confirmation tests, cutoffs are lower, 15 µg/L for oral fluid and 250 µg/L for urine.[27,28] Therefore, detection would occur from 1-1.5 to 24-48 hours for oral fluid and from 0-2 to 36-72 hours in urine. For

these more restrictive values, a major difference appears in oral fluid, in which detection can be done for a longer time. As in other drugs that originate AMPH when they undergo biotransformation, in this case, after some time it is possible to detect only AMPH in the three matrices evaluated. Therefore, to observe the intake of LDX in drug tests, more sensitive and specific tests that detect the parent compound should be run. Furthermore, AMPH being the metabolite of several legal therapeutic and also illegal drugs, the search for its source requires more complex and profound analysis.

LDX/d-AMPH ratios

For LDX and its biotransformation product *d*-AMPH, ratios were found to correlate in an exponential manner in plasma and oral fluid until 3 hours post administration of a therapeutic dose of LDX 70 mg (Figure 4). Greater dispersion between the individuals was seen in the absorption phase in plasma and oral fluid and decreased with time, similarly to what happened in oral fluid for fenproporex, which is also an AMPH prodrug.[29] The coefficient of variation was higher for oral fluid than plasma. In therapeutic drug monitoring, if there is a correlation in the ratios between the drug and its metabolite, it is possible to know the concentration of the one we do not have, knowing the time post administration at which the sample was collected and assuming that all AMPH came from LDX. This ratio can even help to verify if there is something affecting the conversion of the drug into its metabolite. Also, and more importantly, in toxicology, if the ratio does not match it is because there is another source of the substance. This could mean that it is possible that someone who uses LDX legally also uses AMPH illegally. It is a simpler way to search for illegal use than the enantiomer analysis, in which only the *d*-AMPH enantiomer should be detected after LDX ingestion.

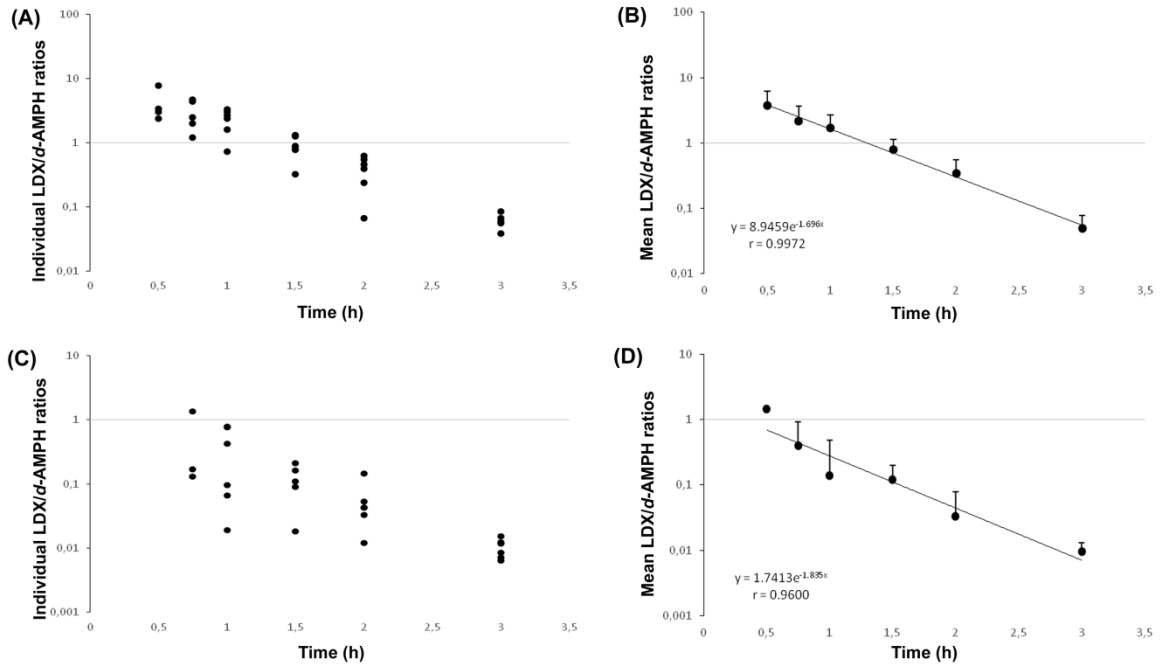


Figure 4: Ratios between LDX and *d*-AMPH in plasma (A and B) and oral fluid (C and D) follow administration of a single 70 mg dose of LDX to 6 subjects.

Oral fluid / Plasma correlation

A correlation between oral fluid and plasma concentrations can be found for some drugs. For *d*-AMPH obtained after LDX 70 mg single oral dose administration, a correlation of 0.87 was found between these two matrices (Figure 5). This means that, under these conditions, it is possible to predict to some degree plasma concentrations of *d*-AMPH from oral fluid concentrations. A correlation was not found for LDX, probably due to its fast biotransformation.

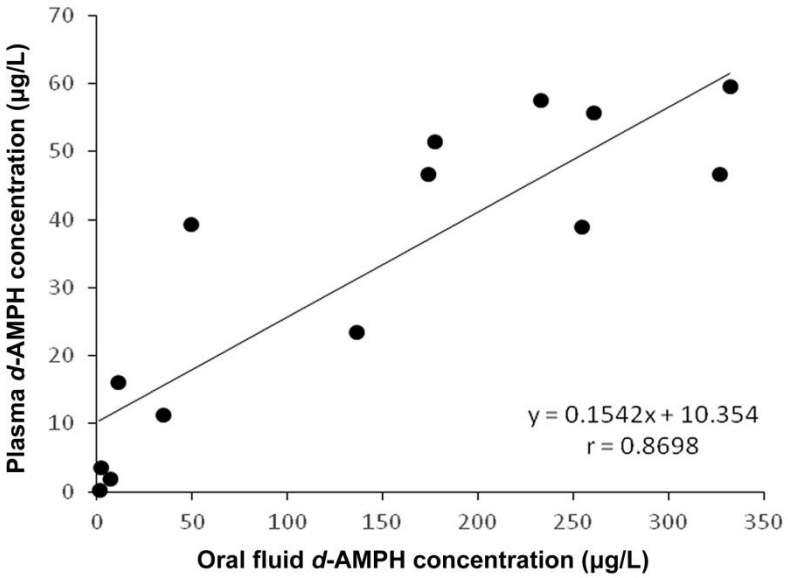


Figure 5: Oral fluid/plasma *d*-AMPH correlation from mean concentrations (n = 6).

Plasma results are in accordance with those already reported in literature. For oral fluid and urine, no data was available for comparisons. Some study limitations should be considered in the data interpretation, such as the small number of volunteers. This study was single dose, which may be appropriate for abuse/toxicological analysis, but it does not reflect the situation of multiple dose use.

CONCLUSION

After a single-dose administration of 70 mg LDX, both LDX and *d*-AMPH were detected in oral fluid, plasma and urine. Intact LDX could be detected in oral fluid, despite what would be expected because of some properties of the molecule, although it is present at low concentrations. The best fit of compartmental analysis was found in the 1-compartment model for both analytes in plasma and oral fluid. After LDX 70 mg single oral dose administration, there is a correlation between oral fluid and plasma *d*-AMPH concentrations. There is also a correlation regarding parent to metabolite ratios over time in plasma and oral fluid.

The data generated in this study about detection windows and the findings that detection of both parent and metabolite are possible in the matrices analyzed will be helpful to interpret toxicological tests in the different situations in which these tests are needed.

REFERENCES

1. Shire. Highlights and Full Prescribing Information/Medication Guide. Revised 04/2015. 2015:1–31. Available at: http://pi.shirecontent.com/PI/PDFs/Vyvanse_USA_ENG.pdf. Accessed September 10, 2015.

2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.

3. Polanczyk G, De Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007;164(June):942–948. doi:10.1176/appi.ajp.164.6.942.

4. Fayyad J, De Graaf R, Kessler R, et al. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J psychiatry*. 2007;190:402–9. doi:10.1192/bjp.bp.106.034389.

5. Kessler RC, Berglund PA, Chiu WT, et al. The prevalence and correlates of binge eating disorder in the WHO World Mental Health Surveys. *Biol Psychiatry*. 2013;73(9):904–914. doi:10.1016/j.biopsych.2012.11.020.

6. Mickle T, Krishnan S, Bishop B, et al. Abuse-resistant amphetamine compounds (US 7,105,486 B2). 2006.

7. Findling RL, Ginsberg LD, Jain R, Gao J. Effectiveness, safety, and tolerability of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: an open-label, dose-optimization study. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2009;19(6):649–62. doi:10.1089/cap.2008.0165.

8. Jasinski DR, Krishnan S. Abuse liability and safety of oral lisdexamfetamine dimesylate in individuals with a history of stimulant abuse. *J Psychopharmacol*. 2009;23(4):419–27. doi:10.1177/0269881109103113.

9. Jasinski DR, Krishnan S. Human pharmacology of intravenous lisdexamfetamine dimesylate: abuse liability in adult stimulant abusers. *J Psychopharmacol*. 2009;23(4):410–8. doi:10.1177/0269881108093841.

10. Biederman J, Boellner SW, Childress A, Lopez F a, Krishnan S, Zhang Y. Lisdexamfetamine dimesylate and mixed amphetamine salts extended-release in children with ADHD: a double-blind, placebo-controlled, crossover analog classroom study. *Biol Psychiatry*. 2007;62(9):970–6. doi:10.1016/j.biopsych.2007.04.015.

11. Boellner SW, Stark JG, Krishnan S, Zhang Y. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a single-dose, randomized, open-label, crossover. *Clin Ther*. 2010;32(2):252–64. doi:10.1016/j.clinthera.2010.02.011.

12. Ermer JC, Dennis K, Haffey MB, et al. Intranasal versus Oral Administration of Lisdexamfetamine Dimesylate: A Randomized, Open-Label, Two-Period, Crossover, Single-Dose, Single-Centre Pharmacokinetic Study in Healthy Adult Men. *Clin Drug Investig*. 2011;31(6):357–70. doi:10.2165/11588190-000000000-00000.

13. Ermer JC, Haffey MB, Doll WJ, et al. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate after targeted gastrointestinal release or oral administration in healthy adults. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(2):290–7. doi:10.1124/dmd.111.040691.

14. Ermer J, Haffey MB, Richards C, et al. An open-label investigation of the pharmacokinetic profiles of lisdexamfetamine dimesylate and venlafaxine extended-release, administered alone and in combination, in healthy adults. *Clin Drug Investig*. 2013;33(4):243–254. doi:10.1007/s40261-013-0073-1.

15. Ermer J, Haffey MB, Richards C, et al. Double-blind, placebo-controlled, two-period, crossover trial to examine the pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy older adults. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:219–29. doi:10.2147/NDT.S38377.

16. Krishnan SM, Stark JG. Multiple daily-dose pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy adult volunteers. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(1):33–40. doi:10.1185/030079907X242737.

17. Krishnan SM, Pennick M, Stark JG. Metabolism, Distribution and Elimination of Lisdexamfetamine Dimesylate Open-Label, Single-Centre, Phase I Study in Healthy Adult Volunteers. *Clin Drug Investig*. 2008;28(12):745–755. doi:10.2165/0044011-200828120-00002.

18. Krishnan S, Zhang Y. Relative bioavailability of lisdexamfetamine 70-mg capsules in fasted and fed healthy adult volunteers and in solution: a single-dose, crossover pharmacokinetic study. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(3):293–302. doi:10.1177/0091270007310381.

19. Pennick M. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2010;6:317–27.

20. Pennick M. Metabolism of the prodrug lisdexamfetamine dimesylate in human red blood cells from normal and sickle cell disease donors. *J Drug Assess*. 2013;2:17–20. doi:10.3109/21556660.2013.775132.

21. Roesch B, Corcoran ME, Fetterolf J, et al. Pharmacokinetics of coadministered guanfacine extended release and lisdexamfetamine dimesylate. *Drugs R D*. 2013;13(2):119–128. doi:10.1007/s40268-013-0014-8.

22. Rowley HL, Kulkarni R, Gosden J, Brammer R, Hackett D, Heal DJ. Lisdexamfetamine and immediate release d-amfetamine - differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activit. *Neuropharmacology*. 2012;63(6):1064–74. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.008.

23. Ermer J, Corcoran M, Martin P. Lisdexamfetamine Dimesylate Effects on the Pharmacokinetics of Cytochrome P450 Substrates in Healthy Adults in an Open-Label, Randomized, Crossover Study. *Drugs R D*. 2015. doi:10.1007/s40268-015-0090-z.

24. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005;150(2-3):119–31. doi:10.1016/j.forsciint.2004.10.026.

25. Cody JT. Metabolic precursors to amphetamine and methamphetamine. *Forensic Sci Rev*. 1993;5(2):109–127.

26. Moreau RL de M, Siqueira MEPB de. *Toxicologia Analítica*. 1st ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008.

27. Department of Health and Human Services - Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. *Fed Regist*. 2015;80:28053.

28. Department of Health and Human Services - Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs. *Fed Regist*. 2015;80:28101.

29. Comiran E, Souza DZ, Boehl PO, et al. Fenproporex and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid After Controlled Oral Administration of Fenproporex. *Ther Drug Monit*. 2012;34(5):545–553. doi:10.1097/FTD.0b013e318263c6c5.

9 DISCUSSÃO GERAL

A utilização do novo medicamento estimulante contendo o fármaco LDX está crescendo nos países em que é comercializada, inclusive no Brasil, apesar de seu alto custo. No Brasil, esse fármaco é aprovado somente para o tratamento dos sintomas do TDAH. Porém, o FDA recentemente aprovou a inserção de uma nova utilização para esse medicamento nos Estados Unidos: tratamento dos sintomas do TCAP. Assim, é grande a possibilidade de a ANVISA também seguir esse caminho e inserir essa nova aprovação no Brasil. Por ser biotransformada à molécula psicoativa *d*-ANF, a LDX possui potencial para abuso e dependência, sendo assim, controlada pela Portaria 344/1998, e sujeita ao uso inadequado e desvio para fins não terapêuticos.

Apesar de não ser muito comum, existem dados de apreensão de ANF no Brasil. Em 2012, foram apreendidas 10.000 unidades de ANF. Em geral, as drogas sintéticas não são produzidas no país e sim traficadas da Europa (International Narcotics Control Board, 2014). Esses dados comprovam que podem ser encontrados resultados positivos para ANF em testes toxicológicos no nosso país. Assim, esse resultado pode ser gerado a partir de uma ingestão ilícita de ANF bem como de uma ingestão lícita ou ilícita de medicamentos derivados da ANF aprovados no país. Dentre esses medicamentos, a LDX se caracteriza como mais um possível interferente falso positivo em testes toxicológicos com resultado positivo para ANF devido a essa molécula ser gerada na sua biotransformação.

Uma vez que alguns testes toxicológicos podem detectar ANF devido à utilização de alguns medicamentos dificultando a sua interpretação, são necessários métodos bioanalíticos eficientes de diferenciação. Esse é o caso principalmente quando consequências legais estão envolvidas para que as medidas adequadas sejam tomadas. Dessa forma, para fazer a identificação e a quantificação dos analitos alvo foi escolhida a técnica de cromatografia líquida acoplada à detecção de massas devido a sua confiabilidade para análise de moléculas em fluidos biológicos. Um primeiro passo foi a tentativa da utilização do equipamento *single* quadrupolo que, apesar de ser uma boa técnica, não obteve o desempenho almejado em relação à sensibilidade e à especificidade neste caso. Procurou-se, então, utilizar o equipamento triplo quadrupolo, no qual foi possível alcançar os valores alvo mesmo utilizando diluições e pouca preparação de amostra. Desta forma, a CL-EM/EM foi utilizada devido à alta especificidade e sensibilidade requeridas para o estudo de

quantificação da LDX e seu produto de biotransformação nos fluidos biológicos. A preparação de amostra foi realizada através da precipitação de proteínas para o plasma, com pouca quantidade de solvente orgânico, da diluição para o fluido oral e da filtração para urina, ambas com nenhuma quantidade de solvente orgânico. Assim, o pré-tratamento é simples, pois utiliza uma pequena variedade de reagentes e solventes facilmente encontrados nos laboratórios, exigindo pequena ou nenhuma quantidade de solvente orgânico, e rápido nos casos do fluido oral e urina. Os métodos desenvolvidos para fluido oral e urina possuem um leve efeito matriz, provavelmente devido à baixa complexidade de preparação de amostra. Para amostras que podem ser utilizadas também em triagens há uma grande importância na rapidez e simplicidade de preparação de amostras. Para isso acontecer, às vezes em amostras biológicas precisa-se aceitar a presença de um leve efeito matriz que acompanha uma menor preparação de amostra. No entanto, apesar da presença do efeito matriz de supressão os métodos foram precisos e exatos dentro da legislação utilizada e atingiram a sensibilidade esperada, aceitando-se o resultado do efeito avaliado neste caso. Isso ocorreu provavelmente porque não houve picos de supressão e/ou aumento do sinal, mas supressão na corrida inteira ou zonas de supressão contínua, assim, não prejudicando a quantificação na zona do analito.

É de extrema importância o estudo da origem da ANF encontrada no resultado analítico para, juntamente com outros dados, auxiliar na distinção entre a legalidade e ilegalidade. Para isso, um amplo conhecimento dos precursores da molécula ANF é extremamente necessário. Uma das maneiras de estudar a origem dessa molécula no organismo é a detecção dos seus precursores nos fluidos biológicos e a avaliação das concentrações de ANF que podem ser alcançadas após exposição a certas doses de medicamento. Essas informações são obtidas a partir de estudos farmacocinéticos. No entanto, os dados da literatura mostram a farmacocinética da LDX somente em plasma, de pacientes pediátricos e adultos, analisados apenas de maneira não-compartimental. Além disso, não havia dados farmacocinéticos para outras matrizes biológicas como urina e fluido oral. Considerando a importância do entendimento dos padrões de disponibilidade metabólica para cada substância em cada matriz para a interpretação de resultados analíticos (Cone e Huestis, 2007), esse estudo estabeleceu o perfil farmacocinético preliminar da LDX em plasma, fluido oral e urina utilizando os métodos

desenvolvidos por CL-EM/EM. Também, os dados foram analisados de maneira não-compartimental e compartimental. A LDX e seu produto de biotransformação foram detectados nas três matrizes avaliadas. Embora em baixas concentrações, a LDX estava presente inclusive no fluido oral, apesar das suas características físico-químicas não serem propicias a difusão passiva e sua biotransformação à *d*-ANF ser rápida. No entanto, não podem ser excluídas outras formas de transporte. No caso do fluido oral, através da farmacocinética pode-se verificar se há correlação com o plasma, o que geralmente ocorre para os derivados da anfetamina. Caso a substância de interesse possa ser detectada no fluido oral e seja comprovada uma correlação, essa pode ser monitorada nessa matriz alternativa. Neste estudo verificou-se que há uma correlação entre as matrizes biológicas plasma e fluido oral para *d*-ANF gerada a partir da LDX, mas não para LDX intacta provavelmente devido à rápida biotransformação. Dessa maneira, seria possível utilizar o fluido oral como matriz de análise, assumindo que toda *d*-ANF detectada foi produzida a partir da LDX. Assim, o estudo demonstrou que o fluido oral, o plasma e a urina podem ser utilizados para identificação da LDX e seu produto de biotransformação *d*-ANF, observadas suas características e dependendo do uso pretendido de aplicação.

Um bom toxicologista conhece a utilidade e particularidades de cada matriz, sabendo escolher a melhor para uma dada situação. O sangue e a urina são as matrizes mais amplamente utilizadas e estudadas na detecção de substâncias no organismo. Esse extenso conhecimento das suas características, vantagens e desvantagens passa segurança aos profissionais quanto aos seus usos e suas limitações. O plasma geralmente demonstra correlação com os efeitos da substância no organismo, indicando se o indivíduo estava sob seu efeito no momento da coleta para fins legais. A urina possui concentrações mais altas de substâncias alvo e/ou seus produtos de biotransformação, porém não possui correlação com os efeitos. Assim, observa-se a importância de se estudar não somente as matrizes convencionais, mas também as matrizes alternativas utilizadas corriqueiramente em toxicologia, para verificar se a substância alvo pode ser detectada no fluido biológico de interesse e quais suas particularidades de comportamento. Neste contexto, o fluido oral vem se destacando e assumindo espaço junto as matrizes mais convencionais. Devido as suas diversas vantagens o fluido oral é muitas vezes complementar as matrizes convencionais e algumas vezes até substitutivo – como

vem ocorrendo no trânsito – podendo ser utilizado em situações de triagem e de confirmação. No entanto, assim como as outras matrizes necessita de muito conhecimento para sua utilização e uma boa avaliação e interpretação dos resultados, não esquecendo nunca as suas desvantagens e limitações. A coleta do fluido oral pode ser facilitada utilizando dispositivos de coleta disponíveis comercialmente. Porém, vários fatores devem ser considerados se um dispositivo de coleta comercial for utilizado, tais como a estimulação, o pH, o volume coletado e recuperado bem como a recuperação e estabilidade da substância a partir do dispositivo (Crouch, 2005). Um fator especialmente interessante é o aumento da concentração de moléculas de caráter básico, como é o caso dos analitos estudados, no pH levemente ácido do fluido oral. Ao se utilizar ácido cítrico para estimular a produção de saliva é esperado que a diminuição do pH devido a esse composto resulte no aumento de concentração de substâncias de caráter básico na saliva. Contudo, essa estimulação acaba influenciando mais no volume salivar do que na diminuição do pH, prejudicando as concentrações salivares das anfetaminas (Bosker e Huestis, 2009). Dessa forma, por ser um estudo com poucos voluntários em um ambiente controlado preferiu-se utilizar a técnica de coleta por expectoração (método do cuspe) sem estimulação devido as suas características de não haver diluição da amostra, ser simples e por ser mais adequada às moléculas que seriam analisadas. Ainda, por não ter a necessidade de dispositivos comerciais para auxiliar na coleta, tem baixo custo e menor influência de variáveis que devem ser avaliadas nesses dispositivos passíveis de influência no resultado e sua interpretação.

Como possíveis aplicações do trabalho desenvolvido podem ser citadas:

1 Aplicações do estudo de fragmentação da LDX sob diversas condições de detecção de massas:

1.1 Desenvolvimento e ajustes de métodos em diferentes equipamentos;

1.2 Orientação de análises de amostras desconhecidas de toxicologia em métodos de triagem que utilizam detector de massas.

2 Aplicações dos métodos validados em CL-EM/EM para matrizes biológicas:

2.1 Análises clínicas e toxicológicas, nas diversas situações em que exista necessidade de se detectar rapidamente e com confiabilidade a ingestão terapêutica, abusiva ou acidental.

2.2 Análises toxicológicas com consequências legais: doping, forense e trânsito. Essas áreas necessitam de uma análise confirmatória extremamente confiável devido ao alcance das consequências que podem ser geradas para o indivíduo sob análise e para o toxicologista emissor do laudo.

3 Aplicações dos dados farmacocinéticos gerados para fluido oral, plasma e urina:

3.1 Inferência sobre momento do uso e quantidade administrada: esta inferência pode ser feita quando se tem o resultado dos níveis do analito na matriz no momento da coleta e o conhecimento da sua toxicocinética na mesma matriz (Moreau e Siqueira, 2008).

3.2 Economia de recursos humanos e financeiros: antes de se iniciar uma análise toxicológica, para qualquer que seja a sua finalidade, deve-se ter o conhecimento da possibilidade de detecção na matriz a ser analisada e a sua janela de detecção. Assim, por exemplo, não se despenderá tempo bem como recursos humanos e materiais analisando uma matriz em que o analito não é detectado ou é detectado por um curto período de tempo sendo que a amostra foi coletada tardiamente.

3.3 Monitoramento

3.3.1 Em pacientes pediátricos: o fluido oral é promissor para o monitoramento nessa população devido à facilidade de coleta e não invasividade. Apesar de a LDX e ANF não se encaixarem nas situações de realização de monitoramento terapêutico clássico, com a facilidade de coleta e análise do fluido oral, podem ser avaliados a adesão ao tratamento *vs* a imprecisão do relatório dos pais (Marchei *et al.*, 2010).

3.3.2 Testes de abuso de drogas de rotina em clínicas: para evolução do indivíduo é importante que ele não esteja conseguindo nenhum tipo de substância de alguma forma dentro da clínica, em visitas ou em situações de saída de dentro da clínica conforme avançam no tratamento (Bosker e Huestis, 2009). Ao ser liberado também é importante que se saiba que medicamentos que se biotransformam à drogas ilícitas devem ser avaliados com cuidado para evitar recidivas ou novo caso de adição.

3.3.3 No controle de dopagem esportiva: o uso de anfetamina tem consequências legais no esporte devido ao seu efeito estimulante. Assim, pode ser necessário diferenciar o uso ilegal do uso legal para verificar se o atleta sofrerá sanções ou não (Thevis *et al.*, 2014). Também, os atletas devem conhecer bem os medicamentos que utilizam para não utilizar fármacos que se biotransformam à substâncias proibidas no esporte, como é o caso da ANF.

3.3.4 No trânsito: dirigir sob influência de substâncias psicoativas tem consequências legais. Dessa forma, matrizes como o fluido oral estão sendo cada vez mais utilizadas no mundo inteiro para monitorar esse padrão de consumo pelas facilidades relacionadas à sua coleta neste ambiente não laboratorial. O monitoramento pode ser feito na população em geral e especificamente em empresas de motoristas profissionais como taxistas, transportadoras, vans escolares e especialmente caminhoneiros, que utilizam para manter-se alerta devido a longas jornadas.

3.3.5 No local de trabalho: em alguns países é comum trabalhadores serem submetidos a testes de drogas (Bosker e Huestis, 2009). Nesses locais pode ser corriqueiro encontrar indivíduos sob tratamento com diversos fármacos para diversas condições. Dessa forma, a importância do conhecimento de usos de fármacos que geram resultados positivos para substâncias ilegais ganham destaque.

3.4 Em testes de intoxicações e de abuso de drogas em situações únicas ou de emergência. Nessas situações frequentemente estão associadas várias substâncias e é importante saber se a pessoa já utiliza um medicamento que se biotransforma à ANF para fazer uma avaliação correta da situação. Um exemplo é a diferenciação entre uma intoxicação acidental ou intencional, que pode ser diferenciada pelos níveis de ANF no organismo. A correta interpretação da situação pode levar o indivíduo a nenhuma ação ou a um acompanhamento psiquiátrico adequado.

As técnicas validadas de detecção aliadas a estudos farmacocinéticos auxiliam na análise e interpretação adequadas de testes toxicológicos nas mais variadas situações. Assim, os dados gerados neste estudo possibilitam a identificação e o conhecimento de mais um interferente derivado da ANF em testes toxicológicos auxiliando os laboratórios de toxicologia e a aplicação da legislação brasileira sobre o uso de substâncias psicotrópicas. Salienta-se a importância deste estudo especialmente para o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia (LABTOXICO), contribuindo para o seguimento e a ampliação de uma linha de pesquisa sobre os estimulantes tipo-anfetamínicos, métodos de detecção de massas e análises em fluido oral (Comiran *et al.*, 2012; Mariotti *et al.*, 2014, 2013; Souza *et al.*, 2011, 2012). Ainda, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos e geração de conhecimento farmacológico e toxicológico no Brasil são de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento da toxicologia como ciência no nosso país.

10 CONCLUSÕES

Os métodos validados neste trabalho permitem a quantificação simultânea da LDX e do seu produto de biotransformação ANF de forma rápida e sensível nas três principais matrizes utilizadas na clínica e em toxicologia. A otimização da preparação da amostra permitiu que o passo de extração dos analitos das amostras biológicas seja feito de maneira simples e, nos casos do fluido oral e urina, rápida. A estabilidade dos analitos também foi avaliada nas três matrizes de estudo e longos períodos de armazenamento antes da análise não são aconselhados.

Os métodos podem ser aplicados em diferentes áreas do conhecimento a fim de certificar os resultados de uma análise de triagem positiva para LDX e ANF. Porém, para interpretação das situações tanto de triagem quanto de confirmação é necessário aliar o conhecimento farmacocinético gerado no trabalho, que demonstra se há a possibilidade de detecção na matriz analisada e por quanto tempo após a administração da LDX a fim de auxiliar na diferenciação do uso de outros medicamentos derivados da ANF e do uso ilegal.

Foi determinada a farmacocinética preliminar da LDX e *d*-ANF após administração oral de LDX em fluido oral, plasma e urina, obtendo-se os perfis de comportamento nas diferentes matrizes. Ambos os analitos foram detectados nas três matrizes. A farmacocinética demonstrou que os analitos obedecem ao modelo de 1 compartimento em plasma e em fluido oral. Verificou-se que há uma correlação entre as matrizes biológicas plasma e fluido oral para *d*-ANF gerada a partir da LDX, mas não para LDX intacta.

Visto as lacunas nos estudos farmacocinéticos e o potencial para abuso da LDX e as dificuldades de análise e interpretação de resultados positivos para ANF, esse estudo trouxe como resultados subsídios para análise e interpretação de mais um derivado da ANF. Isto foi realizado através da revisão e compilação de dados da literatura bem como de desenvolvimentos práticos de métodos bioanalíticos eficientes que devem ser aliados ao conhecimento farmacocinético, todos gerados com êxito neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ADLER, L. A *et al.* Double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and safety of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 69, n. 9, p. 1364–73, set. 2008.

___. Effect of lisdexamfetamine dimesylate on sleep in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, p. 34, jan. 2009.

___. A translational approach to evaluate the efficacy and safety of the novel AMPA receptor positive allosteric modulator org 26576 in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 11, p. 971–7, 1 dez. 2012.

___. Self-Reported quality of life in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and executive function impairment treated with lisdexamfetamine dimesylate: a randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled, parallel-group study. **BMC psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 253, jan. 2013.

ADLER, L. A. *et al.* Short-term effects of lisdexamfetamine dimesylate on cardiovascular parameters in a 4-week clinical trial in adults with attention-deficit/ hyperactivity disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70, n. 12, p. 1652–1661, 2009.

___. Lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder who report clinically significant impairment in executive function: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 74, n. 7, p. 694–702, 2013.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Clinical Practice Guideline: Treatment of the School-Aged Child With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Pediatrics**, v. 108, n. 4, p. 1033–1044, 1 out. 2001.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th ed. ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.

ANIZAN, S.; HUESTIS, M. A. The potential role of oral fluid in antidoping testing. **Clinical Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 307–322, 2014.

ANTONUCCI, D.; KUNINS, C.; *et al.* Assessing Effects of Treatment With Lisdexamfetamine Dimesylate for Pediatric ADHD Using a Parental Survey. **CNS spectrums**, v. 15, n. 4, p. 248–256, 2010.

ANTONUCCI, D.; MANOS, M.; *et al.* Patient Experience and Satisfaction with Lisdexamfetamine Dimesylate in Adults with ADHD. **Primary Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 48–57, 2010.

APOSTOL, G. *et al.* Efficacy and safety of the novel α4β2 neuronal nicotinic receptor partial agonist ABT-089 in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study.

Psychopharmacology, v. 219, n. 3, p. 715–25, fev. 2012.

APS, J. K. M.; MARTENS, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic science international**, v. 150, n. 2-3, p. 119–31, 10 jun. 2005.

ARNSTEN, A. F. T. The Emerging Neurobiology of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The Key Role of the Prefrontal Association Cortex. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. S22–S31, 1 maio 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO DÉFICIT DE ATENÇÃO. **Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade**. Disponível em: <http://www.tdah.org.br/>.

BABCOCK, T. *et al.* Efficacy of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder previously treated with amphetamines: analyses from a randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled titration study. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 13, p. 18, 2012.

BAIN, E. E. *et al.* A randomized pilot study of the efficacy and safety of ABT-089, a novel α4β2 neuronal nicotinic receptor agonist, in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 73, n. 6, p. 783–9, jun. 2012.

BANASCHEWSKI, T. *et al.* Health-related quality of life and functional outcomes from a randomized, controlled study of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. **CNS Drugs**, v. 27, n. 10, p. 829–840, 2013.

___. Health-Related Quality of Life and Functional Outcomes from a Randomized-Withdrawal Study of Long-Term Lisdexamfetamine Dimesylate Treatment in Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **CNS Drugs**, v. 28, n. 12, p. 1191–1203, 2014.

BANKS, M. L. *et al.* Preclinical Assessment of Lisdexamfetamine as an Agonist Medication Candidate for Cocaine Addiction: Effects in Rhesus Monkeys Trained to Discriminate Cocaine or to Self-Administer Cocaine in a Cocaine Versus Food Choice Procedure. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. pyv009–pyv009, 2015.

BARKLEY, R. A; COX, D. A review of driving risks and impairments associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and the effects of stimulant medication on driving performance. **Journal of safety research**, v. 38, n. 1, p. 113–28, jan. 2007.

BARKLEY, R. A. *et al.* The persistence of attention-deficit/hyperactivity disorder into young adulthood as a function of reporting source and definition of disorder. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 111, n. 2, p. 279–289, 2002.

BIEDERMAN, J.; KRISHNAN, S.; *et al.* Efficacy and Tolerability of Lisdexamfetamine

Dimesylate (NRP-104) in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Phase lll, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Forced-Dose, Parallel-Group Study. **Clinical therapeutics**, v. 29, n. 3, p. 450–463, 2007.

BIEDERMAN, J.; BOELLNER, S. W.; *et al.* Lisdexamfetamine dimesylate and mixed amphetamine salts extended-release in children with ADHD: a double-blind, placebo-controlled, crossover analog classroom study. **Biological psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 970–6, 1 nov. 2007.

BIEDERMAN, J.; FRIED, R.; HAMMERNESS, P.; SURMAN, C.; MEHLER, B.; PETTY, C. R.; FARAONE, S. V; MILLER, C.; BOURGEOIS, M.; MELLER, B.; GODFREY, K. M.; REIMER, B. The effects of lisdexamfetamine dimesylate on the driving performance of young adults with ADHD: a randomized, double-blind, placebo-controlled study using a validated driving simulator paradigm. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 4, p. 484–91, abr. 2012.

BIEDERMAN, J.; FRIED, R.; HAMMERNESS, P.; SURMAN, C.; MEHLER, B.; PETTY, C. R.; FARAONE, S. V; MILLER, C.; BOURGEOIS, M.; MELLER, B.; GODFREY, K. M.; BAER, L.; *et al.* The effects of lisdexamfetamine dimesylate on driving behaviors in young adults with ADHD assessed with the Manchester driving behavior questionnaire. **The Journal of Adolescent Health**, v. 51, n. 6, p. 601–7, dez. 2012.

BOELLNER, S. W. *et al.* Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a single-dose, randomized, open-label, crossover. **Clinical therapeutics**, v. 32, n. 2, p. 252–64, fev. 2010.

BOSKER, W. M.; HUESTIS, M. A. Reviews Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. v. 1931, n. 11, p. 1910–1931, 2009.

BRADLEY, C. The behavior of children receiving benzedrine. **The American Journal of Psychiatry**, v. 94, n. 3, p. 577–85, 1937.

BRASIL. **Lei n° 9.503, de 23 de setembro de 1997 e suas atualizações - Institui o Código de Trânsito Brasileiro.**Brasília, DF: Diário Oficial da União, 1997.

___. **Nota técnica sobre eficácia e segurança dos medicamentos inibidores de apetite.** Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/anorexigenos/pdf /Nota_Tecnica_Anorexigenos.pdf>.

___. **RDC n° 52, de 6 de outubro de 2011. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros, bem como intermediários e medidas de controle da prescrição e dispensação de medicamentos que contenham a substância sibutramina, seus**

sais e isômeros, bem como intermediários e dá outras providências. Brasília, DFDiário Oficial da União, , 2011b.

___. **RDC n° 27 de 17 de maio 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2012.

___. **Consulta de Produto - Medicamentos**. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp>. Acesso em: 15 jul. 2014a.

___. **RDC n°50, de 25 de setembro de 2014. Dispõe sobre as medidas de controle de comercialização, prescrição e dispensação de medicamentos que contenham as substâncias anfepramona, femproporex, mazindol e sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermermediários e dá outras providências.** Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2014b.

BREWER, A. *et al.* Evaluation of lisdexamfetamine alone and lisdexamfetamine+modafinil for cocaine use disorder. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 146, n. 2015, p. e231, 2015.

BROWN, T. E. *et al.* Open-label administration of lisdexamfetamine dimesylate improves executive function impairments and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. **Postgraduate medicine**, v. 122, n. 5, p. 7–17, set. 2010.

BROWN, T. E. *et al.* Clinical utility of ADHD symptom thresholds to assess normalization of executive function with lisdexamfetamine dimesylate treatment in adults. **Current Medical Research and Opinion**, v. 27, n. S2, p. 23–33, 2011.

BULISANI, A. C. P. *et al.* Síndrome de Stevens-Johnson e Necrólise Epidérmica Tóxica em Medicina Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 3, p. 292–297, 2006.

BURGARD, D. A *et al.* Potential trends in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) drug use on a college campus: wastewater analysis of amphetamine and ritalinic acid. **The Science of the total environment**, v. 450-451, p. 242–9, 15 abr. 2013.

CARVALHO, M. *et al.* Toxicity of amphetamines: an update. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 8, p. 1167–231, ago. 2012.

CHILDRESS, A. C. *et al.* The effects of lisdexamfetamine dimesylate on emotional lability in children 6 to 12 years of age with ADHD in a double-blind placebo-controlled trial. **Journal of attention disorders**, v. 18, n. 2, p. 123–32, fev. 2014.

CHRISTENSEN, L. *et al.* PMH34 Treatment burden and costs of lisdexamfetamine

dimesylate users compared with users of other long-acting treatments in patients with attention-deficit hyperactivity disorder. **Value in Health**, v. 12, n. 3, p. A178–A179, maio 2009.

CITROME, L. Lisdexamfetamine for binge eating disorder in adults: a systematic review of the efficacy and safety profile for this newly approved indication – what is the number needed to treat, number needed to harm and likelihood to be helped or harmed? **International Journal of Clinical Practice**, 2015.

CODY, J. T. Metabolic precursors to amphetamine and methamphetamine. **Forensic Science Review**, v. 5, n. 2, p. 109–127, 1993.

___. Precursor Medications as a Source of Methamphetamine and/or Amphetamine Positive Drug Testing Results. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, n. 5, p. 435–450, maio 2002.

CODY, J. T. Amphetamines. *In*: BOGUSZ, M. J. (Ed.). . **Handbook of Analytical Separations**. Volume 6: ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2008. v. 6p. 127–174.

COGHILL, D. *et al.* European, randomized, phase 3 study of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 10, p. 1208–1218, 2013.

COGHILL, D. R. *et al.* Maintenance of efficacy of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: Randomized-withdrawal study design. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 6, p. 647–657.e1, 2014.

COMIRAN, E. *et al.* Fenproporex and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid After Controlled Oral Administration of Fenproporex. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 34, n. 5, p. 545–553, 2012.

CONE, E. J.; HUESTIS, M. A. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, p. 51–103, mar. 2007.

COWLES, B. J. Update on the management of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adults: patient considerations and the role of lisdexamfetamine. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 5, p. 943–8, jan. 2009.

CROUCH, D. J. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. **Forensic science international**, v. 150, n. 2-3, p. 165–73, 10 jun. 2005.

DAUGHTON, J. M.; KRATOCHVIL, C. J. Review of ADHD pharmacotherapies: advantages, disadvantages, and clinical pearls. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 3, p. 240–8, mar. 2009.

DITTMANN, R. W. *et al.* Efficacy and safety of lisdexamfetamine dimesylate and atomoxetine in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: A head-to-head, randomized, double-blind, phase IIIb study. **CNS Drugs**, v. 27, n. 12, p. 1081–

1092, 2013.

DRUMMER, O. H. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. **Forensic science international**, v. 150, n. 2-3, p. 133–42, 10 jun. 2005.

DUPAUL, G. J. *et al.* Double-blind, placebo-controlled, crossover study of the efficacy and safety of lisdexamfetamine dimesylate in college students with ADHD. **Journal of attention disorders**, v. 16, n. 3, p. 202–20, abr. 2012.

ERMER, J. *et al.* Lisdexamfetamine dimesylate: linear dose-proportionality, low intersubject and intrasubject variability, and safety in an open-label single-dose pharmacokinetic study in healthy adult volunteers. **Journal of clinical pharmacology**, v. 50, n. 9, p. 1001–10, set. 2010.

ERMER, J.; HAFFEY, M. B.; *et al.* An open-label investigation of the pharmacokinetic profiles of lisdexamfetamine dimesylate and venlafaxine extended-release, administered alone and in combination, in healthy adults. **Clinical Drug Investigation**, v. 33, n. 4, p. 243–254, 2013.

ERMER, J.; HAFFEY, M. B.; *et al.* Double-blind, placebo-controlled, two-period, crossover trial to examine the pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy older adults. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 9, p. 219–29, jan. 2013.

ERMER, J. C. *et al.* Intranasal versus Oral Administration of Lisdexamfetamine Dimesylate: A Randomized, Open-Label, Two-Period, Crossover, Single-Dose, Single-Centre Pharmacokinetic Study in Healthy Adult Men. **Clinical Drug Investigation**, v. 31, n. 6, p. 357–70, jan. 2011.

___. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate after targeted gastrointestinal release or oral administration in healthy adults. **Drug metabolism and disposition**, v. 40, n. 2, p. 290–7, fev. 2012.

ERMER, J.; CORCORAN, M.; MARTIN, P. Lisdexamfetamine Dimesylate Effects on the Pharmacokinetics of Cytochrome P450 Substrates in Healthy Adults in an Open-Label, Randomized, Crossover Study. **Drugs in R&D**, 2015.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

FARAONE, S. V *et al.* Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1313–23, 1 jun. 2005.

FARAONE, S. V; GLATT, S. J. A comparison of the efficacy of medications for adult attention-deficit/hyperactivity disorder using meta-analysis of effect sizes. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 6, p. 754–763, 2010.

FARAONE, S. V. *et al.* Effect of Stimulants on Height and Weight. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 47, n. 9, p. 994–1009,

set. 2008.

___. Effects of Lisdexamfetamine Dimesylate Treatment for ADHD on Growth. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 1, p. 24–32, jan. 2010.

FINDLING, R. L. Evolution of the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children: a review. **Clinical therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 942–57, maio 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. [s.l: s.n.].

___. **FDA News Release: FDA expands uses of Vyvanse to treat binge-eating disorder**. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm432543.htm>. Acesso em: 3 mar. 2015.

GASIOR, M. *et al.* Maintenance of Wakefulness With Lisdexamfetamine Dimesylate, Compared With Placebo and Armodafinil in Healthy Adult Males Undergoing Acute Sleep Loss. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 690–696, 2014.

GEHRICKE, J.-G. *et al.* ADHD medication reduces cotinine levels and withdrawal in smokers with ADHD. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 98, n. 3, p. 485–91, maio 2011.

GEORGE, S.; BRAITHWAITE, R. Using amphetamine isomer ratios to determine the compliance of amphetamine abusers prescribed dexedrine. **Journal of analytical toxicology**, v. 24, n. 3, p. 223–7, abr. 2000.

GIBLIN, J. *et al.* P03-332 - Effect of treatment with lisdexamfetamine dimesylate on self-reported quality of life in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **European Psychiatry**, v. 25, p. 947, jan. 2010.

GIBLIN, J. M.; STROBEL, A. L. Effect of lisdexamfetamine dimesylate on sleep in children with ADHD. **Journal of attention disorders**, v. 15, n. 6, p. 491–8, ago. 2011.

GINSBERG, L. *et al.* Long-term treatment outcomes with lisdexamfetamine dimesylate for adults with attention-deficit/hyperactivity disorder stratified by baseline severity. **Current medical research and opinion**, v. 27, n. 6, p. 1097–1107, 2011.

GJERDE, H.; VERSTRAETE, A. Can the prevalence of high blood drug concentrations in a population be estimated by analysing oral fluid? A study of tetrahydrocannabinol and amphetamine. **Forensic science international**, v. 195, n. 1-3, p. 153–9, 25 fev. 2010.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 [traduç ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GOODMAN, D. W. Lisdexamfetamine dimesylate (Vyvanse), a prodrug stimulant for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 273–87, maio 2010.

HAFFEY, M. B. *et al.* Effects of omeprazole on the pharmacokinetic profiles of lisdexamfetamine dimesylate and extended-release mixed amphetamine salts in adults. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 5, p. 11–19, 2009.

HAILE, C. N. *et al.* Pharmacotherapeutics directed at deficiencies associated with cocaine dependence: focus on dopamine, norepinephrine and glutamate. **Pharmacology & therapeutics**, v. 134, n. 2, p. 260–77, maio 2012.

HEAL, D. J. *et al.* A preclinical evaluation of the discriminative and reinforcing properties of lisdexamfetamine in comparison to D-amfetamine, methylphenidate and modafinil. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 348–58, out. 2013.

HEAL, D. J.; CHEETHAM, S. C.; SMITH, S. L. The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7-8, p. 608–18, dez. 2009.

HUTSON, P. H.; PENNICK, M.; SECKER, R. Preclinical pharmacokinetics, pharmacology and toxicology of lisdexamfetamine: A novel d-amphetamine pro-drug. **Neuropharmacology**, v. 87C, p. 41–50, dez. 2014.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of Analytical Procedures**, 2005.

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD. **Report of the International Narcotics Control Board for 2013**. New York: United Nations, 2014.

JAIN, R. *et al.* Efficacy of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder previously treated with methylphenidate: a post hoc analysis. **Child and adolescent psychiatry and mental health**, v. 5, n. 1, p. 35, jan. 2011.

JASINSKI, D. R.; KRISHNAN, S. Human pharmacology of intravenous lisdexamfetamine dimesylate: abuse liability in adult stimulant abusers. **Journal of psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 410–8, jun. 2009a.

___. Abuse liability and safety of oral lisdexamfetamine dimesylate in individuals with a history of stimulant abuse. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 23, n. 4, p. 419–27, jun. 2009b.

JOHNSON, M. D. *et al.* Meeting Highlights on Psychiatric Clinical Challenges and Advancing the Science of Treatment: The 3rd Annual Chair Summit. **Health Outcomes Research in Medicine**, v. 2, n. 3, p. e169–e182, ago. 2011.

KAPLAN, G.; NEWCORN, J. H. Pharmacotherapy for child and adolescent attention-deficit hyperactivity disorder. **Pediatric clinics of North America**, v. 58, n. 1, p. 99–

120, mar. 2011.

KATIC, A. *et al.* Clinically relevant changes in emotional expression in children with ADHD treated with lisdexamfetamine dimesylate. **Journal of attention disorders**, v. 16, n. 5, p. 384–97, jul. 2012.

KESSLER, R. C. *et al.* The prevalence and correlates of binge eating disorder in the WHO World Mental Health Surveys. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 9, p. 904–914, 2013.

KHAN, U.; NICELL, J. A. Refined sewer epidemiology mass balances and their application to heroin, cocaine and ecstasy. **Environment international**, v. 37, n. 7, p. 1236–52, out. 2011.

___. Sewer epidemiology mass balances for assessing the illicit use of methamphetamine, amphetamine and tetrahydrocannabinol. **The Science of the total environment**, v. 421-422, p. 144–62, 1 abr. 2012.

KOLLINS, S. H. *et al.* A pilot study of lis-dexamfetamine dimesylate (LDX/SPD489) to facilitate smoking cessation in nicotine-dependent adults with ADHD. **Journal of attention disorders**, v. 18, n. 2, p. 158–68, fev. 2014.

KOTAGAL, S. Hypersomnia in Children. **Sleep Medicine Clinics**, v. 7, n. 2, p. 379–389, jun. 2012.

KRISHNAN, S. M.; PENNICK, M.; STARK, J. G. Metabolism, Distribution and Elimination of Lisdexamfetamine Dimesylate Open-Label, Single-Centre, Phase I Study in Healthy Adult Volunteers. **Clinical Drug Investigation**, v. 28, n. 12, p. 745–755, 2008.

KRISHNAN, S. M.; STARK, J. G. Multiple daily-dose pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate in healthy adult volunteers. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 1, p. 33–40, 1 jan. 2008.

KRISHNAN, S.; MONCRIEF, S. An evaluation of the cytochrome p450 inhibition potential of lisdexamfetamine in human liver microsomes. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 35, n. 1, p. 180–4, jan. 2007.

KRISHNAN, S.; MONTCRIEF, S. Toxicity profile of lisdexamfetamine dimesylate in three independent rat toxicology studies. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 101, n. 4, p. 231–40, out. 2007.

KRISHNAN, S.; ZHANG, Y. Relative bioavailability of lisdexamfetamine 70-mg capsules in fasted and fed healthy adult volunteers and in solution: a single-dose, crossover pharmacokinetic study. **Journal of clinical pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 293–302, mar. 2008.

LASSER, R. A *et al.* Adjunctive Lisdexamfetamine Dimesylate Therapy in Adult Outpatients With Predominant Negative Symptoms of Schizophrenia: Open-Label

and Randomized-Withdrawal Phases. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2140–2149, 2013.

LAWSON, K. *et al.* PW01-18 - Utilization and expenditures for lisdexamfetamine dimesylate compared to other attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) medications in the Texas Medicaid program. **European Psychiatry**, v. 25, p. 1436, jan. 2010.

LECENDREUX, M. L. *et al.* Psychiatric-related safety outcomes of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: A phase 3, randomized, double-blind, multicentre, parallel-group, placebo- and active-controlled, dose-optimized. **Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence**, v. 60, n. 5, p. S263, jul. 2012.

LEYTON, V. *et al.* Uso de anfetamínicos por motoristas profissionais brasileiros: aspectos gerais. **Saúde, Ética & Justiça**, v. 5/7, n. 1-2, p. 32–36, 2002.

MADHOO, M. *et al.* Lisdexamfetamine dimesylate augmentation in adults with persistent executive dysfunction after partial or full remission of major depressive disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 6, p. 1388–98, maio 2014.

MALI, N.; KARPE, M.; KADAM, V. A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse. **Journal of Applied Pharmaceutical …**, v. 1, n. 06, p. 58–65, 2011.

MANOS, M. J. *et al.* Changes in emotions related to medication used to treat ADHD. Part I: literature review. **Journal of attention disorders**, v. 15, n. 2, p. 101–12, fev. 2011.

MARCHEI, E. *et al.* Correlation between methylphenidate and ritalinic acid concentrations in oral fluid and plasma. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 4, p. 585–92, abr. 2010.

MARIOTTI, K. D. C. *et al.* Simultaneous Analysis of Amphetamine-type Stimulants in Plasma by Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 432–437, 1 set. 2014.

MARIOTTI, K. DE C. *et al.* Trends in counterfeits amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil. **Forensic Science International**, v. 229, n. 1-3, p. 23–26, jun. 2013.

MARTIN, P. *et al.* Safety and Pharmacokinetics of Lisdexamfetamine Dimesylate in Adults With Clinically Stable Schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 682–689, 2014.

MARTIN, P. T. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study of the effects of lisdexamfetamine dimesylate and mixed amphetamine salts on

cognition throughout the day in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Clinical Drug Investigation**, v. 34, n. 2, p. 147–157, 2014.

MATTINGLY, G. W. *et al.* Clinical response and symptomatic remission in short- and long-term trials of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **BMC psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 39, jan. 2013.

MAURER, H. H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. **Clinical biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 310–8, abr. 2005.

MCELROY, S. L. *et al.* Efficacy and Safety of Lisdexamfetamine for Treatment of Adults With Moderate to Severe Binge-Eating Disorder. **JAMA Psychiatry**, 2015.

MCELROY, S. L. *et al.* Psychopharmacologic Treatment of Eating Disorders: Emerging Findings. **Current Psychiatry Reports**, v. 17, n. 5, p. 1–7, 2015.

MCGOUGH, J. J. *et al.* Sex Subgroup Analysis of Treatment Response to Lisdexamfetamine Dimesylate in Children Aged 6 to 12 Years With Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology - Letters to the Editors**, v. 32, n. 1, p. 138–140, 2012.

MICKLE, T. *et al.* **Abuse-resistant amphetamine compounds (US 7,105,486 B2)**United States, 2006.

MOELLER, M. R.; STEINMEYER, S.; KRAEMER, T. Determination of drugs of abuse in blood. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 713, p. 91–109, 1998.

MOREAU, R. L. DE M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. DE. **Toxicologia Analítica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

MORROW, S. A. *et al.* Lisdexamfetamine dimesylate improves processing speed and memory in cognitively impaired MS patients: A phase II study. **Journal of Neurology**, v. 260, n. 2, p. 489–497, 2013.

MTA COOPERATIVE GROUP. A 14-Month Randomized Clinical Trial of Treatment Strategies for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, n. 12, p. 1073–86, 1 dez. 1999.

MUSSHOFF, F. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. **Drug metabolism reviews**, v. 32, n. 1, p. 15–44, fev. 2000.

NASCIMENTO, E. C. DO; NASCIMENTO, E.; SILVA, J. DE P. Alcohol and amphetamines use among long-distance truck drivers. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 2, abr. 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem**

Compound Database CID 11597698. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov//compound/11597698>.

PENNICK, M. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 6, p. 317–27, jan. 2010.

___. Metabolism of the prodrug lisdexamfetamine dimesylate in human red blood cells from normal and sickle cell disease donors. **Journal of Drug Assessment**, v. 2, p. 17–20, 2013.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 7, n. 11, p. 441–449, 1 nov. 2002.

PETERSON, P. C.; HUSAIN, A. M. Pediatric narcolepsy. **Brain & development**, v. 30, n. 10, p. 609–23, nov. 2008.

PLISZKA, S. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 46, n. 7, p. 894–921, jul. 2007.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E/OU CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS ENCONTRADOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RANG, H. P. *et al.* **Rang and Dale's Pharmacology - 7th Edition**. 7. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2012.

ROESCH, B. *et al.* Pharmacokinetics of coadministered guanfacine extended release and lisdexamfetamine dimesylate. **Drugs in R and D**, v. 13, n. 2, p. 119–128, 2013.

ROWLEY, H. L. *et al.* Lisdexamfetamine and immediate release d-amfetamine - differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activit. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1064–74, nov. 2012.

ROWLEY, H. L. *et al.* Differences in the neurochemical and behavioural profiles of lisdexamfetamine methylphenidate and modafinil revealed by simultaneous dual-probe microdialysis and locomotor activity measurements in freely-moving rats. **Journal of psychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 254–69, mar. 2014.

SETYAWAN, J.; HODGKINS, P.; GUERIN, A.; GAUTHIER, G.; CLOUTIER, M.; WU, E. Q.; *et al.* PMH65 Comparison of Deviation Rates from the Labeled Daily Average Consumption in Patients Initiated on Stimulant Medication for the Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Value in Health**, v. 15, n. 4, p. A93, jun.

2012.

SETYAWAN, J.; HODGKINS, P.; GUERIN, A.; GAUTHIER, G.; CLOUTIER, M.; WU, E.; *et al.* Comparison of discontinuation risk in patients initiated on lisdexamfetamine dimesylate (LDX) vs. other medications for the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A retrospective claims analysis. **Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence**, v. 60, n. 5, p. S261, jul. 2012.

SHIRE. **Shire Reports Top-line Results from Two Phase 3 Studies for Vyvanse® (lisdexamfetamine dimesylate) Capsules (CII) as an Adjunctive Treatment for Adults with Major Depressive Disorder**. Disponível em: <http://www.shire.com/shireplc/en/investors/investorsnews/irshirenews?id=921>. Acesso em: 13 out. 2014.

___. **Highlights and Full Prescribing Information/Medication Guide. Revised 04/2015**. Disponível em: <http://pi.shirecontent.com/PI/PDFs/Vyvanse_USA_ENG.pdf>. Acesso em: 10 set. 2015.

SILVA, O. A. *et al.* Drug Use by Truck Drivers in Brazil. **Drugs: Education, Prevention, and Policy**, v. 10, n. 2, p. 135–139, jan. 2003.

SOUTULLO, C. *et al.* Effect of lisdexamfetamine dimesylate on functional impairment in children and adolescents with ADHD. **Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence**, v. 60, n. 5, p. S76, jul. 2012.

SOUZA, D. Z. *et al.* Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 696, n. 1-2, p. 67–76, 24 jun. 2011.

___. Which amphetamine-type stimulants can be detected by oral fluid immunoassays? **Therapeutic drug monitoring**, v. 34, n. 1, p. 98–109, fev. 2012.

SOUZA, J. C.; PAIVA, T.; REIMÃO, R. Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 925–930, 2005.

SPENCER, T. J. Issues in the Management of Patients with Complex ADHD Symptoms. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. S4–S12, 1 maio 2009.

STOOPS, W. W. *et al.* Methylphenidate increases choice of cigarettes over money. **Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 13, n. 1, p. 29–33, jan. 2011.

THEVIS, M. *et al.* Isotope-dilution mass spectrometric quantification of the prodrug lisdexamfetamine in human urine in doping control analysis. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 28, n. 7, p. 781–6, 15 abr. 2014.

TOENNES, S. W. *et al.* Driving under the influence of drugs - Evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment

symptoms. **Forensic Science International**, v. 152, n. 2-3, p. 149–155, 2005.

TRIVEDI, M. H. *et al.* A randomized controlled trial of the efficacy and safety of lisdexamfetamine dimesylate as augmentation therapy in adults with residual symptoms of major depressive disorder after treatment with escitalopram. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 74, n. 8, p. 802–9, ago. 2013.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of amphetamines. **NTP CERHR MON**, n. 16, p. vii–III1, jul. 2005.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **ClinicalTrials.gov [Internet]**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=lisdexamfetamine&Search=Search>. Acesso em: 21 maio. 2015.

UNITED NATIONS. **Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva**New YorkUnited Nations, , 2001.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. The non-medical use of prescription drugs, policy direction issues. **United Nations Office on Drugs and Crime**, 2011.

VANSICKEL, A. R. *et al.* Methylphenidate increases cigarette smoking in participants with ADHD. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 2, p. 381–90, nov. 2011.

VERSTRAETE, A. G. Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, n. 2, p. 200–205, abr. 2004.

VIERHILE, A.; ROBB, A.; RYAN-KRAUSE, P. Attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents: closing diagnostic, communication, and treatment gaps. **Journal of pediatric health care : official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners**, v. 23, n. 1 Suppl, p. S5–23, 2009.

WALSH, J. M. **A State-by-State Analysis of Laws Dealing With Driving Under the Influence of Drugs (DOT HS 811 236).** Washington, DC: National Highway Traffic Safety Administration, 2009.

WEISLER, R. *et al.* Long-term safety and effectiveness of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/ hyperactivity disorder. **CNS spectrums**, v. 14, n. 10, p. 573–85, out. 2009.

WIGAL, S. B. *et al.* A laboratory school comparison of mixed amphetamine salts extended release (Adderall XR) and atomoxetine (Strattera) in school-aged children with attention deficit/hyperactivity disorder. **Journal of attention disorders**, v. 9, n. 1, p. 275–89, ago. 2005.

___. Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy in children and adults. **CNS drugs**, v. 23 Suppl 1, p. 21–31, jan.

2009.

WIGAL, S. B. Efficacy and Safety Limitations of Attention Deficit Hyperactivity Disorder Pharmacotherapy in Pediatric Patients. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. S13–S21, maio 2009.

WIGAL, S. B. *et al.* Efficacy and tolerability of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: sex and age effects and effect size across the day. **Child and adolescent psychiatry and mental health**, v. 4, n. 1, p. 32, jan. 2010.

WIGAL, S. B.; MALTAS, S.; *et al.* Reading performance as a function of treatment with lisdexamfetamine dimesylate in elementary school children diagnosed with ADHD. **Journal of attention disorders**, v. 16, n. 1, p. 23–33, jan. 2012.

WIGAL, S. B.; WONG, A. A; *et al.* Adverse events in medication treatment-naïve children with attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a small, controlled trial of lisdexamfetamine dimesylate. **Journal of child and adolescent psychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 149–56, abr. 2012.

WIGAL, T. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study of the efficacy and safety of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: novel findings using a simulated adult workplace environment design. **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 6, p. 34, jan. 2010.

___. Effect size of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Postgraduate medicine**, v. 123, n. 2, p. 169–76, mar. 2011.

WILENS, T. E. *et al.* Safety and efficacy of ABT-089 in pediatric attention-deficit/hyperactivity disorder: results from two randomized placebo-controlled clinical trials. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 50, n. 1, p. 73–84.e1, jan. 2011.

WOLRAICH, M. *et al.* ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. **Pediatrics**, v. 128, n. 5, p. 1007–22, nov. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lisdexamfetamine Pre-Review Report**. [s.l: s.n.].

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2004.

ZUDDAS, A.; BANASCHEWSKI, T.; *et al.* Duration of response of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with ADHD. **Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence**, v. 60, n. 5, p. S76, jul. 2012.

ZUDDAS, A.; COGHILL, D. R.; *et al.* Weight-related safety outcomes of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with ADHD: Post-hoc analysis from a phase 3, randomized, double-blind, multicentre, parallel-group, placebo- and active-controlled, dose-optimized study in Europe. **Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence**, v. 60, n. 5, p. S263, jul. 2012.

ANEXOS

10.1 ANEXO I: Documento de aprovação ética e metodológica

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110175

Pesquisador Responsável
FLAVIO PECHANSKY

Título: ESTIMULANTES ANFETAMÍNICOS: desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida utilizando microextração em fase sólida e avaliação farmacocinética.

	Data da Versão:
EMENDA	04/12/2015
TCLE	04/12/2015

Este documento referente ao projeto acima foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 16 de janeiro de 2015.

Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

Data da impressão: 16/01/2015 Página 1 de 1

10.2 ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "ESTIMULANTES ANFETAMÍNICOS: desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida utilizando microextração em fase sólida e avaliação farmacocinética".

Justificativa e objetivos: faltam dados sobre o intervalo de tempo após administração oral da lisdexanfetamina em que podem ser detectados a lisdexanfetamina e seu metabólito anfetamina na urina e saliva. Assim, o objetivo deste estudo é determinar as concentrações salivares, urinárias e sanguíneas da lisdexanfetamina e anfetamina com o passar do tempo, após administração única, via oral, deste medicamento; bem como comprovar a efetividade de técnicas analíticas previamente desenvolvidas para a detecção destas substâncias. Além disso, caso seja encontrada uma correlação entre os níveis da substância no sangue e na saliva, será possível o futuro monitoramento na saliva refletindo as concentrações encontradas no sangue de forma menos invasiva.

Como será realizado o estudo: você deverá fazer alguns exames dias antes do estudo para garantir que você esta apto a participar. No dia marcado para início, você deverá comparecer ao local do estudo na hora agendada. Antes de ingerir o medicamento, você passará por uma anamnese, na qual você responderá um questionário breve, sua pressão será aferida e sua temperatura corpórea medida. Após, você deverá ingerir um comprimido de 70 mg do dimesilato de lisdexanfetamina de especialidade farmacêutica aprovada para comercialização no Brasil e permanecer durante um período de 12 horas para o fornecimento das amostras de fluido oral e sangue com retorno para uma coleta em 24, 48 e 72 horas. Durante o período inicial de coleta de sangue, no qual o intervalo de tempo entre as coletas é pequeno, você ficará com um acesso venoso no braço para evitar a frequente introdução de agulha e tornar a coleta mais confortável. As amostras serão coletadas sob supervisão dos pesquisadores responsáveis em intervalos de tempo pré-estabelecidos. A coleta de toda urina será realizada durante 5 dias, sempre que você tiver vontade de urinar. As amostras de saliva serão coletadas através do método da expectoração ou "método do cuspe". Serão fornecidos aos voluntários todos os materiais (devidamente identificados) e informações necessárias para coleta.

Métodos Alternativos Existentes: não há outra metodologia de estudo para a obtenção dos dados requeridos senão a proposta.

HCPA / GPPG
ERSÃO APROVADA
15/01/2015
MK 110175

Local e Horário da Realização do Estudo: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, situado na Rua Ramiro Barcelos, 2.350, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre / RS; CEP 90036-903. As análises de dosagem do medicamento serão realizadas na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Assinaturas:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento entendo que minha participação é voluntária. Confirmo que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo no meio científico.

_____	_____
Nome do participante	Nome do pesquisador
_____	_____
Assinatura	Assinatura

Local e data: _____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
15 / 01 / 2015
ME 110175