

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULA

GRACIELA CARLOS

PORTO ALEGRE, 2014.

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA NA FORMA FARMACÊUTICA CÁPSULA

Dissertação apresentada por **Graciela Carlos**
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

PORTO ALEGRE, 2014.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09.05.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr.: Martin Steppe

Universidade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof^a. Dr.: Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr.: Andrea Inês Horn Adams

Universidade: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

CIP - Catalogação na Publicação

Carlos, Graciela

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para dimesilato de lisdexanfetamina na forma farmacêutica cápsula. / Graciela Carlos. -- 2014.

219 f.

Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich .

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Dimesilato de lisdexanfetamina. 2. Validação de métodos analíticos. 3. Controle de qualidade. 4. Fotodegradação. 5. Produtos de degradação. I. Fröhlich , Pedro Eduardo , orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. As análises de LC-ESI-QTOF foram realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-RS) e as análises de RMN foram realizadas no Instituto de Química da Unicamp, Campinas - SP. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Para realizar grandes conquistas,
Devemos não apenas agir, mas também sonhar;
Não apenas planejar, mas também acreditar.

Anatole France

Dedico este trabalho ao meu esposo **André**,
amor da minha vida,
que me dá meu caminho de luz e
minha vida de amor, carinho e poesia.

E ao meu pai Odoni (*in memoriam*)
pelo seu infinito amor,
exemplo de pessoa, profissional e pai.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, oportunidades, dificuldades e alegrias.

Ao Prof. Pedro Eduardo Fröhlich por me abrir as portas da universidade, pela orientação, dedicação constante, paciência e pelo exemplo de profissional farmacêutico competente e ético.

À Profa. Ana Maria Bergold pela amizade, carinho e colaboração.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Andréia, Andrea, Ana Paula, Charise, Cristiane, Daniela, Esther, Felipe, Fernanda, Luana, Joyce, Jéssica Bauer, Jéssica Knobloch, Marcella, Mariana, Pamela, Leonardo Meneghini, Leonardo Trevisan, Vanessa, Tamara, Marquinho, Sirlei, Viviane e Inélia pela amizade, pelos momentos de descontração, alegria e discussões científicas.

À amiga Eloisa Comiran pela amizade, auxílio e parceria na realização deste trabalho.

Ao amigo Leonardo Meneghini pela amizade e apoio durante todo o mestrado.

Ao Professor Alvicler Magalhães da Unicamp pela oportunidade de trabalhar com RMN, pelos seus ensinamentos e pela amizade.

À amiga Ana Cristina Isler da Unicamp pelo auxílio nas análises de RMN e pela amizade.

À Louise Jank pelo auxílio nas análises de fotodegradação e ao Lanagro, na pessoa do Fabiano Barreto, pela disponibilidade do equipamento.

Ao Jeferson Segalin pelo auxílio nas análises de fotodegradação e pelos valiosos ensinamentos em espectroscopia de massas.

Aos amigos da biblioteca da Faculdade de Farmácia e agregados: Heloísa, Paulo, Claudia, Margarida, Gilson e Fabiana pela amizade, pelos momentos de alegria e descontração.

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

A CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, Terezinha e Odoni (*in memoriam*), por serem minha base, pelo apoio, amor constante e me ensinarem a ser a pessoa que sou.

Aos meus irmãos, Micheline e Ricardo, à minha cunhada, Milla e ao meu cunhado Beto pelo carinho, incentivo e amizade.

Especialmente ao meu esposo André, por compartilhar comigo a dádiva que é a vida, pelo apoio, por enfrentar as dificuldades ao meu lado e iluminar a minha vida com carinho e amor.

RESUMO

O dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) é um pró-fármaco estimulante da classe das anfetaminas, de longa duração e com menor risco de potencial de abuso e é indicado no tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade. Não existe monografia disponível para este fármaco em nenhum código oficial, deste modo faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos para assegurar a qualidade da forma farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para determinação de LDX na forma farmacêutica cápsula e o estudo da estabilidade preliminar do fármaco. LDX SQR foi preparado em nosso laboratório, após extração de LDX da forma farmacêutica cápsula, apresentando 99,56% de pureza, determinada por balanço de massas e identificado por espectroscopia de infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e LC-ESI-QTOF. A identificação de LDX na forma farmacêutica cápsula foi realizada por UV, CL-UV e CL-DAC comparando-se com a SQR. Os métodos, CL-UV, CL-DAC e CL-EM, desenvolvidos e validados para a quantificação de LDX cápsula demonstraram-se específicos, lineares, exatos, precisos e robustos. Os três métodos foram considerados indicativos de estabilidade, pois apresentaram a capacidade de determinar o fármaco frente a produtos de degradação obtidos por estudos de degradação forçada. A análise estatística (ANOVA) determinou que os métodos são intercambiáveis para o objetivo pretendido. O estudo da cinética de fotodegradação do fármaco foi realizado por 48 h de exposição. O fármaco apresentou uma extensão de degradação de 68% quando as amostras foram analisadas por CL-DAC e 62% quando analisadas por CL-Q-ATV e dois produtos de degradação obtidos foram identificados. LDX foi submetida à hidrólise ácida e alcalina em diferentes condições (0.01 M, 0.1 M, 0.5 M e 1 M de DCI e NaOD) e analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e um produto de degradação foi identificado, um diastereoisômero da LDX: dimetanosulfonato de (2R)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-metil-2-feniletil] hexanamida

Palavras-chave: dimesilato de lisdexanfetamina, validação de métodos analíticos, controle de qualidade, fotodegradação, produtos de degradação.

ABSTRACT

Lisdexamfetamine dimesylate (LDX) is a stimulant prodrug of amphetamine class, long-lasting and with less risk of abuse potential and it is indicated for the treatment of Attention Deficit Disorder/Hyperactivity Disorder. There is no monograph available for this drug in any official code, thus it is necessary the development and validation of methods to ensure the quality of dosage form. The objective of this work was the development and validation of analytical methods for determination of LDX in capsule and the evaluation of drug stability in forced degradation. LDX reference standard material (RSM) was prepared in our laboratory through extraction from capsules, with 99.56% of purity, determined by mass balance and identified by infrared spectroscopy, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and LC-ESI-QTOF. The identification of LDX in capsules was performed by UV, LC-UV and LC-CAD comparing with SRM. LC-UV, LC-CAD and LC-MS methods developed and validated for the quantification of LDX in capsules proved to be specific, linear, accurate, precise and robust. The three methods were considered stability-indicating because they exhibited the ability to determine the drug even in the presence of degradation products obtained by forced degradation studies. ANOVA statistical analysis demonstrated that the methods are interchangeable for the intended purpose. LDX photodegradation kinetics study was carried out for 48 h exposure. The drug showed a degradation extent of 68% when the samples were analyzed by LC-CAD and 62% when analyzed by LC-ESI-QTOF and two degradation products obtained were identified. LDX was subjected to acid and alkaline hydrolysis under different conditions (0.01 M, 0.1 M, 0.5 M and 1 M NaOD and DCL) and analyzed by ^1H , ^{13}C , HSQC and HMBC NMR and one degradation product was identified, a diastereoisomer of LDX: (2R)-2,6-diamino-N-[(2S)-1-phenylpropan-2-yl] hexanamide .

Key words: lisdexamfetamine dimesylate, validation methods, quality control, photodegradation, degradation products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do dimesilato de lisdexanfetamina.	46
Figura 2. Espectro de infravermelho de LDX candidato à SQR.....	74
Figura 3. Espectro de RMN de ¹ H de LDX candidato à SQR e atribuições dos deslocamentos químicos.	78
Figura 4. Espectro de RMN de ¹³ C de LDX candidato à SQR e atribuições dos deslocamentos químicos.	79
Figura 5. HMBC de LDX candidato à SQR.....	80
Figura 6. HSQC de LDX candidato à SQR.	81
Figura 7. Espectro de Q-ATV de LDX candidato à SQR e elucidação dos seus fragmentos mais abundantes.	86
Figura 8. Cromatograma obtido para LDX candidato à SQR e impurezas por CLAE-DAC usando coluna CN e fase móvel formato de amônio 20 mM pH 4,0 e acetonitrila (50:50, v/v). (1) Dimesilato; (2) Metanol; (3) e (4) Impurezas; (5) Lisdexanfetamina.	91
Figura 9. Cromatogramas obtidos para LDX candidato à SQR. Condições cromatográficas: coluna CN e fase móvel formato de amônio 20 mM, pH 4,0 e acetonitrila (50:50, v/v). (A) CLAE-UV; (B) CLAE-DAC; 1 – LDX SQR; 2 – LDX cápsula.....	94
Figura 10. Espectros na região do UV da solução SQR (A) e da solução amostra LDX cápsula (B).	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos empregados na farmacoterapia de Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (Adaptada de GABBARD, 2009).	43
Tabela 2. Solubilidade dos excipientes presentes na forma farmacêutica de LDX. ...	72
Tabela 3. Principais bandas de absorção de LDX candidato à SQR no IV e suas atribuições.	75
Tabela 4. Gradiente da fase móvel do sistema cromatográfico utilizado para identificação de LDX candidato à SQR por CL-Q-ATV.....	83
Tabela 5. Parâmetros e condições de análise do espectrômetro de massas (CL-Q-ATV).	84
Tabela 6. Interpretação do espectro de Q-ATV de LDX candidato à SQR.....	85
Tabela 7. Teor de LDX candidato à SQR por balanço de massas.	92
Tabela 8. Resultados comparativos da validação dos métodos por LC-UV, LC-DAC e LC-MS.	205

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Refletância total atenuada
ATV	Analisador de tempo de voo
AUC	Área sob a curva
AUC _{0-∞}	Área sob a curva (zero ao infinito)
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CAD	Charged aerosol detector
CID-10	Classificação Internacional de Doenças
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-DAC	Cromatografia líquida acoplada à detector aerossol carregado
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas
CL-Q-ATV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas do tipo ATV.
CLAE-UV	Cromatografia líquida acoplada à detector ultravioleta
DAC	Detector de aerossol carregado
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCI	Cloreto de deutério
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRD4	Gene do receptor D4 da dopamina
DSM-IV-TR™	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

DP	Degradation product
EM	Espectrometria de massas
F90	Transtornos hipercinéticos
FB 5	Farmacopéia Brasileira, 5ª edição
FDA	Food and Drugs Administration
HMBC	Heteronuclear multi bond correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IV	Espectrofotometria na região do infravermelho
k	Velocidade de reação
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LDX	Dimesilato de lisdexanfetamina
MAO	Monoamino-oxidase
m/z	Relação massa / carga
NaOD	Hidróxido de sódio deuterado
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD	Produtos de degradação
PDA	Photodiode array
r	Coeficiente de correlação de Pearson;
RMN	Espectrometria de Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Espectrometria de Ressonância magnética nuclear de próton
RMN ¹³ C	Espectrometria de Ressonância magnética nuclear de carbono
SNC	Sistema Nervoso Central
SQR	Substância química de referência

TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
TOF	Time-of-Flight Analyser
t_{\max}	Tempo para alcançar a concentração plasmática máxima
USP	Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia)
UV	Espectrofotometria na região do ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos gerais	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
3.1	Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade	39
3.1.1	Prevalência	39
3.1.2	Origem e Fatores de Risco do TDAH	40
3.1.3	Fatores genéticos	40
3.1.4	Comorbidades	41
3.2	Tratamento	42
3.2.1	Histórico das anfetaminas	44
3.3	Dimesilato de lisdexanfetamina	45
3.3.1	Descrição	46
3.3.2	Mecanismo de ação	46
3.3.3	Propriedades farmacocinéticas	47
3.3.4	Efeitos adversos	48
3.3.5	Abuso	48
3.3.6	Determinação de LDX	49
3.4	Validação de métodos analíticos	49
3.5	Técnicas analíticas	50
3.5.1	Detector de aerossol carregado (DAC)	50
3.5.2	Detector ultravioleta	51
3.5.3	Espectroscopia de massas	51
3.5.4	RMN	52

3.6	Estudo de estabilidade	53
3.7	Fotodegradação	53
3.8	Referências	55
4	CAPÍTULO I – Purificação e análise do dimesilato de lisdexanfetamina SQR e identificação da forma farmacêutica	67
4.1	Introdução	69
4.2	Purificação da SQR	70
4.2.1	Procedência da SQR	70
4.2.2	Materiais e métodos	70
4.2.3	Resultados e discussão	71
4.2.3.1	Desenvolvimento do método de purificação de LDX	71
4.3	Caracterização de LDX candidato à SQR	72
4.3.1	Identificação da substância química de referência	72
4.3.1.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	72
4.3.1.1.1	Materiais e métodos	73
4.3.1.1.2	Resultados e discussão	74
4.3.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	75
4.3.1.2.1	Materiais e métodos	76
4.3.1.2.2	Resultados e discussão	77
4.3.1.3	Espectrometria de massas (EM)	82
4.3.1.3.1	Materiais e métodos	82
4.3.1.3.2	Resultados e discussão	84
4.3.2	Ensaio de pureza da SQR	87
4.3.2.1	Determinação de resíduo de ignição (cinzas sulfatadas)	88
4.3.2.1.1	Materiais e métodos	88
4.3.2.1.2	Resultados e discussão	88
4.3.2.2	Perda por dessecação	89
4.3.2.2.1	Materiais e métodos	89
4.3.2.2.2	Resultados e discussão	89
4.3.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-DAC)	89

4.3.2.3.1	Materiais e métodos	90
4.3.2.3.2	Resultados e discussão	90
4.3.2.4	Cálculo da pureza de LDX SQR	91
4.3.2.4.1	Materiais e métodos	91
4.3.2.4.2	Resultados e discussão	92
4.3	Identificação da forma farmacêutica	92
4.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	92
4.4.1.1	Materiais e métodos	93
4.4.1.2	Resultados e discussão	93
4.4.2	Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)	95
4.4.2.1	Materiais e métodos	95
4.4.2.2	Resultados e discussão	95
4.5	Conclusões	97
4.6	Referências	98
5	CAPÍTULO II – ARTIGO 1	101
6	CAPÍTULO III – ARTIGO 2	127
7	CAPÍTULO IV – ARTIGO 3	147
8	CAPÍTULO V – ARTIGO 4	175
9	DISCUSSÃO GERAL	201
10	CONCLUSÕES	209
11	REFERÊNCIAS	213

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é a mais prevalente desordem neurocomportamental na infância (AAP, 2000). TDAH afeta entre 3% a 6% de crianças em todo o mundo e caracteriza-se por sintomas como falta de atenção, impulsividade e hiperatividade que podem impactar em muitos aspectos do comportamento e do desempenho em casa e na escola (ROHDE et al., 1999; FARAONE et al., 2003).

Estimulantes são considerados a classe de medicamentos mais efetivos para pacientes com TDAH, mas a farmacoterapia do transtorno de hiperatividade e déficit de atenção deve ser combinada com terapias educacionais e comportamentais e um acompanhamento que otimize a eficácia do tratamento (VIERHILE et al., 2009; AAP, 2011).

Dimesilato de lisdexanfetamina (LDX), formado a partir de uma *d*-anfetamina ligada covalentemente à L-lisina, é um pró-fármaco estimulante de longa duração indicado para o tratamento do TDAH em crianças e adultos (BOELLNER et al., 2010). Após a administração oral, a substância farmacologicamente ativa, *d*-anfetamina, é liberada quando a ligação covalente é clivada durante o metabolismo (MICKLE et al., 2006).

Dimesilato de lisdexanfetamina é um derivado anfetamínico, ou seja, uma amina simpatomimética de ação indireta. Os anfetamínicos mimetizam os efeitos periféricos da noradrenalina no sistema nervoso simpático e tem importantes efeitos no sistema nervoso central. Em doses repetidas, verifica-se o desenvolvimento de tolerância, explicando, em parte, a tendência da anfetamina e seus derivados a causarem dependência química (DIEHL et al., 2011; RANG et al., 2011). Dimesilato de lisdexanfetamina foi desenvolvido com o objetivo de buscar fármacos com maior duração de ação, ou seja, que melhorem a adesão ao tratamento e que diminuam o potencial de abuso como alternativa no tratamento de TDAH (MICKLE et al., 2006; JASINSKI e KRISHNAN, 2009; JASINSKI e KRISHNAN, 2009a).

Atualmente, LDX é um fármaco de prescrição médica para o tratamento do TDAH aprovado nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, vários países europeus (nome comercial: Elvanse[®] / Tyvense[®]) e Brasil. Os Estados Unidos através do FDA

INTRODUÇÃO

foi o primeiro país a aprovar o dimesilato de lisdexanfetamina em 2007 para tratamento de TDAH em crianças de 6-12 anos, na forma farmacêutica cápsula, nas apresentações de 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg e 70 mg, com a marca Vyvanse[®]. Já as indicações para adulto de LDX foram aprovadas pelo FDA em abril de 2008 (FDA, 2014). O Canadá aprovou o LDX em 2009 para tratamento de TDAH para crianças e em 2010 para adolescentes de 13-17 anos, nas apresentações de 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg e 60 mg (HEALTH CANADA, 2014). Na Austrália, o LDX foi aprovado em 2013 para tratamento de TDAH (NSW, 2014). No Brasil, o LDX foi registrado na ANVISA em 2010 e é comercializado pelo laboratório Shire Farmacêutica Brasil Ltda., com o nome comercial Venvanse[®], na forma farmacêutica cápsula, nas apresentações de 30 mg, 50 mg e 70 mg em frascos com 28 cápsulas (BRASIL, 2010). Em 2011, a ANVISA incluiu o LDX na lista de substâncias entorpecentes (A3) através da RDC 36/2011, incluindo-o Portaria SVS/MS 344 de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998; BRASIL, 2011).

.Os medicamentos oferecidos para a população têm por objetivo proteger a saúde, ou seja, devem ter segurança e eficácia adequada a um custo acessível. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologia analítica para controle de qualidade tem papel fundamental já que propicia uma avaliação do fármaco quanto a sua identidade, teor, pureza e estabilidade durante o seu prazo de validade (JAIN e BASNIWAL, 2013).

Com o objetivo de possibilitar a obtenção de novos dados científicos, o fármaco LDX foi escolhido como tema deste estudo para sua análise qualitativa e quantitativa, tanto na forma de matéria-prima, como de medicamento. Esta dissertação objetiva colaborar com o controle de qualidade de LDX na forma farmacêutica de cápsulas, através do desenvolvimento e validação de métodos analíticos e avaliação preliminar da estabilidade através de estudos de degradação forçada, de modo a garantir segurança e eficácia terapêutica aos pacientes usuários deste medicamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa de LDX em cápsulas e realizar estudo de estabilidade preliminar, elucidando seus prováveis produtos de degradação (PD) majoritários formados.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar e caracterizar a substância química de referência (SQR) do fármaco por espectrofotometria na região do infravermelho (IV), espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) e determinar o teor pelo balanço de massas;
- Identificar LDX em cápsula por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CL);
- Desenvolver e validar métodos para a quantificação de LDX em cápsula por CL, utilizando os detectores UV, aerosol carregado (DAC) e EM;
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos;
- Avaliar a estabilidade preliminar do fármaco para auxiliar no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade;
- Avaliar a fotoestabilidade do produto, determinar a cinética de fotodegradação e identificar os PD majoritários;
- Avaliar a estabilidade de LDX frente à hidrólise ácida e alcalina e elucidar estruturalmente os PD majoritários por meio de RMN de ^1H , ^{13}C e por correlação (HSQC e HMBC);

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade

No século 20, o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) surge como o primeiro distúrbio psiquiátrico a ser diagnosticado e tratado em crianças (DOYLE, 2004) e apresenta-se como o distúrbio neurocomportamental mais comum na infância, mas também acomete a jovens e adultos (AAP, 2000). O TDAH se caracteriza por apresentar um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade, mais frequente e grave do que aquele tipicamente observado nos indivíduos em nível equivalente de desenvolvimento, com prejuízo significativo nas áreas social, acadêmica ou ocupacional, de acordo com Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-IV-TR™ (APA, 2002). Em 37% a 80% das crianças os sintomas persistem na adolescência e na vida adulta (FARAONE et al., 2003; KESSLER et al., 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1993), segundo a sua Classificação Internacional de Doenças (CID-10) utiliza um nome diferente para esta doença: transtornos hipercinéticos (F90). Apesar de nomes diferentes, existem mais similaridades do que diferenças nas diretrizes diagnósticas para o transtorno. De acordo com o DSM-IV-TR™ (APA, 2002) três subtipos do transtorno foram definidos para o TDAH, com predomínio de: desatenção, hiperatividade/impulsividade e combinado. Assim, é possível um diagnóstico que acuse a presença ou não de hiperatividade.

3.1.1 Prevalência

A prevalência do TDAH foi estudada em todo o mundo. Os estudos realizados mostram diferenças nas taxas de prevalência encontradas, mas isto reflete muito mais diferenças metodológicas (população amostrada, delineamento do estudo, fonte de informação, idade, sexo, critérios diagnósticos utilizados, ou a forma como eles são aplicados) do que as reais diferenças culturais na prevalência TDAH (FARAONE et al., 2003). Assim, estudos nacionais e internacionais que utilizam os critérios plenos do DSM-IV-TR™ tendem a encontrar prevalências ao redor de 3-6

% em crianças em idade escolar (ROHDE et al., 1999; FARAONE et al., 2003). Dados europeus sugerem que cerca de 5% da população sofre de TDAH, com um total de cerca de 3 milhões de pacientes na Europa (WITTCHEN et al., 2011). Estudos epidemiológicos demonstram que o sexo masculino, baixo nível sócio econômico e a infância estão associados com a prevalência de TDAH (SCAHILL e SCHWAB-STONE, 2000; DOYLE, 2004).

3.1.2 Origem e Fatores de Risco do TDAH

A etiologia do TDAH ainda não foi claramente identificada, apesar de que evidências sugerem que a origem do TDAH se deve a fatores ambientais, neurobiológicos e genéticos (KAPEZINSKI et al., 2011). Complicações na gestação e parto, o uso de álcool e tabagismo materno durante a gravidez e meio ambiente familiar adverso são considerados importantes fatores de risco ao TDAH (SPRICH-BUCKMINSTER et al., 1993; BIEDERMAN et al., 1995; MILBERGER et al., 1996; MICK et al., 2002).

Um perfil fisiopatológico do TDAH não foi totalmente caracterizado, embora estudos de imagem estrutural e funcional impliquem consistentemente em uma disfunção nas vias fronto-subcortical e desequilíbrio nos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico como causa dos principais sintomas (ALEXANDER et al., 1986).

3.1.3 Fatores genéticos

Estudos realizados com gêmeos e com crianças adotadas sugerem que o TDAH apresenta fatores genéticos na sua etiologia. Com base nos resultados dos estudos em gêmeos, considerando a variabilidade na metodologia e definições de TDAH, a hereditariedade média é de 0,77, ou seja, 77% da variação fenotípica pode ser atribuído a fatores genéticos (BIEDERMAN, 2005).

Os estudos mostraram que famílias com pais e/ou irmãos de crianças com TDAH apresentam um risco de duas a oito vezes maiores quando comparados com famílias que não apresentam membros com a doença (MORRISON e STEWART, 1971; CANTWELL, 1972; WELNER et al., 1977; MANSHADI et al., 1983; BIEDERMAN et al., 1990; SCHACHAR e WACHSMUTH, 1990; FRICK et al., 1991; FARAONE et al., 1992).

Estudo realizado com 204 famílias, totalizando 853 indivíduos e 270 pares de irmãos afetados indicou que as regiões 16p13 e 17p11 do genoma são as mais prováveis para a etiologia do TDAH (Ogdie et al., 2003). Cook e colaboradores (1995) observaram uma associação entre o TDAH e o gene do transportador de dopamina, o alelo 480 pb (genótipo). Em humanos, o gene mais fortemente implicado no TDAH é o *7-repeat allele* do gene do receptor D4 da dopamina (DRD4), confirmando que a dopamina é um forte componente na patogênese do TDAH (FARAONE et al., 2001).

3.1.4 Comorbidades

O TDAH pode coexistir com vários transtornos psiquiátricos e vários estudos demonstram uma alta prevalência de comorbidades em crianças e adolescentes que sofrem de TDAH (BIEDERMAN et al., 1998; SPENCER et al., 1999; BIEDERMAN et al., 2002; BUSCH et al., 2002).

Comorbidades psiquiátricas e distúrbios relacionados ao humor, incluindo dificuldades de aprendizagem e de linguagem, ansiedade, depressão e transtorno de conduta, são comuns entre as crianças com TDAH e podem levar a um fraco desempenho escolar, delinquência e dificuldade de relacionamento com colegas e familiares (PLISZKA, 1998; SPENCER et al., 1999; KESSLER et al., 2005).

As comorbidades mais presentes em adultos com TDAH são os transtornos de ansiedade, humor (depressão maior e bipolaridade), explosivo intermitente, de personalidade anti-social, opositor desafiante, de conduta, de abuso ou dependência de substância e a Síndrome de Tourette, resultando numa significativa perda de

produtividade, altas taxas de desemprego, baixo nível socioeconômico e dificuldade em manter as relações sociais (BIEDERMAN et al, 2006; KESSLER et al, 2006; HODGKINS et al, 2011).

3.2 Tratamento

Atualmente o tratamento do TDAH requer uma abordagem multidisciplinar, envolvendo tratamento farmacológico e psicoterápico com a participação de múltiplos agentes sociais como pais, outros familiares, educadores, profissionais de saúde e da própria criança, além de um acompanhamento que otimize a eficácia do tratamento (VIERHILE et al., 2009; AAP, 2011). Muitas das diferentes intervenções não farmacológicas têm demonstrado algum benefício aos pacientes com TDAH, mas geralmente não são suficientes para controlar completamente os sintomas na maioria dos pacientes (VIERHILE et al., 2009).

Os fármacos utilizados atualmente no tratamento no TDAH estão divididos em duas categorias principais: estimulantes e não estimulantes. Os fármacos estimulantes foram a primeira classe de compostos eficazes para tratar os distúrbios comportamentais apresentados em crianças portadoras de TDAH e são considerados os mais efetivos no tratamento deste distúrbio (GABBARD, 2009; VIERHILE et al., 2009). Na Tabela 1 estão descritos os fármacos utilizados de cada categoria (GABBARD, 2009).

Tabela 1. Fármacos empregados na farmacoterapia de Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (Adaptada de GABBARD, 2009).

(A) Estimulantes

- Estimulantes de primeira geração (liberação imediata)

dextro-anfetamina
sais mistos de levo- e dextro-anfetamina
metilfenidato

- Estimulantes de ação prolongada

dimesilato de lisdexanfetamina
metilfenidato
sais mistos de levo- e dextro-anfetamina

(B) Não Estimulantes

- Inibidor específico da recaptação da norepinefrina (IERN)

atomoxetina

- Antidepressivos tricíclicos

Aminas terciárias
imipramina
amitriptilina
clomipramina
Aminas secundárias
desipramina
nortriptilina

- Antidepressivos Inibidores da Monoaminoxidase (IMAOs)

fenilzina
tranilcipromina
selegilina

- Antidepressivo inibidor da recaptação da norepinefrina e dopamina (IRND)

bupropiona (SR)
bupropiona (XR)

- Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS)

fluoxetina
paroxetina
sertralina
citalopram
fluvoxamina

- Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina e norepinefrina (IRSN)

venlafaxina (XR)

- Antidepressivos noradrenérgico e serotoninérgico específico

mirtazapina

- Moduladores noradrenérgicos

Agonistas alfa-2
clonidina
guanfacina
Betabloqueadores
propranolol

- Outros fármacos

modafinil

O tratamento de primeira escolha para TDAH é o uso de medicamentos estimulantes, como o metilfenidato e dextroanfetamina (DOPHEIDE, 2005; PLISZKA e AACAP, 2007). Seis em cada oito adolescentes e adultos e pelo menos 80% das crianças tem respondido bem a estimulantes quando ajustado à dose adequadamente (PLISZKA et al., 2000; AAP, 2001; GREENHILL et al., 2002).

Atomoxetina e bupropiona são considerados fármacos de segunda escolha no tratamento de TDAH e eles tem se mostrado efetivos em estudos placebo-controlado (PLISZKA, 2000; CABALLERO e NAHATA, 2003).

Os antidepressivos tricíclicos são considerados agentes de segunda ou terceira escolha em função do risco de toxicidade, enquanto que os moduladores noradrenérgico, clonidina e guanfacina podem ser considerados como quarta linha. Os moduladores noradrenérgicos também podem ser usados em associação com outros fármacos por causa da falta de eficácia estabelecida em monoterapia (PLISZKA, 2000; AAP, 2001).

3.2.1 Histórico das anfetaminas

As anfetaminas são poderosos estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e foram descobertas por Barger e Dale em 1910 como uma mistura racêmica α -metilfenilamina. Somente em 1927 a anfetamina foi sintetizada pelo químico GA Alles como substituto menos dispendioso que a efedrina. Smith, Kline e French sintetizaram separadamente os dois isômeros dextro e levo da anfetamina e em 1937 iniciou a comercialização de *d*-anfetamina, o mais potente dos dois isômeros, sobre o nome comercial de Dexedrine[®] (HEAL et al., 2013).

As anfetaminas são aminas simpatomiméticas de ação indireta mais potentes sobre o sistema nervoso central (SNC), além das ações α e β periféricas. A anfetaminas agem sobre o SNC através da liberação das aminas biogênicas de seus locais de armazenamento nas terminações nervosas. A anfetamina entra na terminação nervosa através do transportador de norepinefrina e penetra nas vesículas sinápticas via transportador vesicular das monoaminas, em troca da

norepinefrina, que se acumula no citosol. Parte da norepinefrina é degradada pela monoamina-oxidase (MAO) no interior da terminação nervosa e parte atua nos receptores pré-sinápticos. As anfetaminas agem também como substrato competitivo no transporte das monoaminas endógenas, reduzindo a recaptura da norepinefrina e potencializando sua ação (RANG et al., 2011; WESTFALL, T. C. e WESTFALL, D. P.; 2012).

Foi Bradley em 1937, que primeiro relatou os efeitos benéficos da anfetamina no tratamento de crianças com graves problemas comportamentais, que passariam a ser diagnosticadas como sofrendo de TDAH (APA, 1994). Bradley tratou 30 indivíduos durante uma semana, e em cerca de 50% deles observou notáveis melhorias no desempenho escolar, comportamento e atitude (HEAL et al., 2013).

Estimulantes estão disponíveis em formulações de curta e longa duração. Os medicamentos estimulantes de ação prolongada têm por objetivo a redução ou eliminação da necessidade de múltiplas doses diárias, além deste benefício auxiliam na melhor aderência do paciente ao tratamento e menor potencial de abuso em comparação com os seus homólogos de curta duração (BANASCHEWSKI et al., 2006).

3.3 Dimesilato de lisdexanfetamina

O dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) é um pro-fármaco indicado no tratamento do TDAH. LDX é classificado como estimulante de longa duração e apresenta menor risco de potencial de abuso do que os estimulantes de curta duração (MICKLE et al., 2006). LDX é um pro-fármaco composto de uma molécula do aminoácido L-lisina e uma *d*-anfetamina ligados covalentemente, através de uma ligação peptídica. Após a administração oral, LDX é clivado, liberando seu metabólito ativo, a *d*-anfetamina (MICKLE et al., 2006).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.3.1 Descrição

(BRASIL, 2009; SIGMA-ALDRICH, 2014)

Nome químico: dimetanosulfonato de (2S)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-metil-2-feniletil] hexanamida

CAS: 608137-33-3

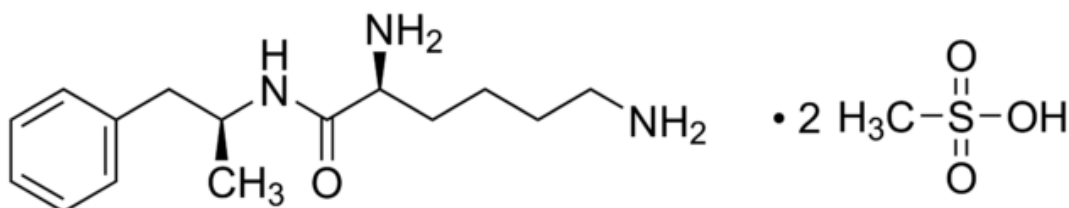
DCB: 09698

Estrutura química: ver Figura 1

Fórmula molecular: C₁₇H₃₃N₃O₇S₂

Massa molecular: 455,5898 g/mol

Figura 1. Estrutura química do dimesilato de lisdexanfetamina.



3.3.2 Mecanismo de ação

Como pró-fármaco da dextroanfetamina, depois da absorção no trato gastrointestinal, LDX é convertido primeiramente no sangue em *d*-anfetamina, que é responsável pela atividade farmacológica. O exato mecanismo de ação de LDX para tratamento dos sintomas do THDA não é conhecido. O mecanismo de ação das anfetaminas está descrito no item 3.2.1.

3.3.3 Propriedades farmacocinéticas

Após a administração oral, LDX é absorvido no intestino delgado através de proteínas de transporte. A natureza exata deste processo, incluindo a sua extensão e duração, não foi determinado (PENNICK, 2010).

Estudos pré-clínicos sugerem que o sangue é o principal local de conversão de LDX em L-lisina e d-anfetamina, localizando a maior parte deste processo (~ 90%), o que foi evidenciado a partir do perfil de concentração-tempo de LDX e d-anfetamina (BOELLNER et al., 2010).

Os parâmetros farmacocinéticos após administração oral de LDX de 70 mg em jejum, foram $C_{max} = 48,0$ ng/mL , $t_{max} = 1,15$ h, $t_{1/2} = 0,41$ h , $AUC = 59,47$ ng.h/mL. E para o metabólito ativo *d*-anfetamina, os parâmetros farmacocinéticos encontrados foram $C_{max} = 69,3$ ng/mL, $t_{max} = 3,78$ h, $t_{1/2} = 9,69$ h , $AUC = 1020$ ng.h/mL (BOELLNER et al., 2010).

A ingestão junto a alimentos promove uma absorção mais lenta e uma diminuição da C_{max} de LDX ($t_{max} = 2,08$ h; $t_{1/2} = 0,63$ h; $C_{max} = 26,2$ ng/mL; $AUC = 53,68$ ng.h/mL). Com relação à *d*-anfetamina, os parâmetros farmacocinéticos praticamente se mantiveram inalterados no estado alimentado, observando-se apenas uma leve diminuição na concentração plasmática. Estas observações sugerem que a contribuição do trato gastrointestinal para a conversão enzimática de LDX é baixa e que a maioria de conversão ocorre na circulação sistêmica (KRISHNAN e ZHANG, 2008).

Um estudo realizado com 18 crianças por Boellner e colaboradores (2010) sugere que a $AUC_{0-\infty}$ para *d*-anfetamina foi proporcional à dose, pois os valores médios de C_{max} (DPR) de *d*-anfetamina liberada após a administração de LDX 30, 50, e 70 mg foram 53,2 (18,1), 93,3 (19,5), e 134,0 (19,4) ng/mL, respectivamente e o $t_{max} \cong 3,5$ horas.

3.3.4 Efeitos adversos

A maioria dos efeitos adversos encontrados durante o tratamento com LDX foi semelhante aos associados a outros estimulantes de ação prolongada. Diminuição do apetite, insônia, dor abdominal superior e dor de cabeça foram os efeitos adversos mais comuns encontrados em crianças (BIEDERMAN et al., 2007; BIEDERMAN et al., 2007a; BOELLNER et al., 2010). Em adultos, os efeitos adversos relatados foram diminuição do apetite, boca seca e insônia (ADLER et al., 2008).

3.3.5 Abuso

Estudos realizados mostraram que LDX apresenta menor potencial de abuso do que a *d*-anfetamina de liberação imediata contendo igual quantidade de *d*-anfetamina base. LDX não causa euforia (efeito adverso) quando comparado com *d*-anfetamina de liberação imediata (MICKLE et al., 2006).

Jasinski e Krishnan (2009; 2009a) mostraram o menor potencial de abuso do LDX em dois estudos. O primeiro, um estudo duplo-cego, placebo-controlado, foi realizado com o objetivo de avaliar a segurança, tolerabilidade e potencial de abuso de LDX. Doses intravenosas equivalente a 25 mg e 50 mg de LDX e 10 mg e 20 mg de sulfato de *d*-anfetamina foram administradas em adultos sem TDAH e com histórico de abuso de drogas. A dose de 50 mg de LDX apresentou resultados significativamente semelhantes ao placebo, enquanto que, após administração de *d*-anfetamina 20 mg, um aumento significativo no escore relacionado com o potencial de abuso foi observado em comparação com o placebo ($p < 0,05$) (JASINSKI e KRISHNAN, 2009). O segundo estudo realizado avaliou doses únicas de 50 mg, 100 mg (equivalente a 40 mg de *d*-anfetamina) e 150 mg de LDX e 40 mg de *d*-anfetamina em 36 indivíduos com história de abuso de estimulantes. Os resultados mostraram que LDX 100 mg apresentou uma resposta atenuada de potencial de abuso comparado com *d*-anfetamina 40 mg de liberação imediata. A *d*-anfetamina

base apresenta uma taxa 50% maior de potencial de abuso comparada com quantia equivalente *d*-anfetamina presente em LDX (JASINSKI e KRISHNAN, 2009a).

3.3.6 Determinação de LDX

Com relação à metodologia analítica envolvendo o fármaco LDX, foram encontrados artigos científicos que avaliam o pró-fármaco e seu metabólito ativo, *d*-anfetamina em matriz biológica e na sua grande maioria corresponde à estudos de farmacocinética (BIEDERMAN et al., 2007; KRISHNAN e MONCRIEF, 2007; KRISHNAN et al., 2008; KRISHNAN e ZHANG, 2008; JASINSKI e KRISHNAN, 2009; PENNICK, 2009; BOELLNER et al., 2010; ERMER et al., 2010; PENNICK, 2010; ERMER et al., 2011; ERMER et al., 2011a; ERMER et al., 2011b). Os estudos não descrevem os sistemas cromatográficos, apenas o equipamento usado, os íons monitorados e os limites de detecção e quantificação.

Até o presente momento não foram encontrados estudos publicados relativos às metodologias analíticas para avaliação da matéria-prima quanto da forma farmacêutica cápsula do fármaco LDX. Este fármaco também não apresenta monografia em nenhum compêndio oficial, nem estudos de degradação forçada e método indicativo de estabilidade em presença de produtos de degradação.

3.4 Validação de métodos analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado (RIBANI et al., 2004).

Farmacopéias (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011; USP 34, 2011), guia internacional (ICH, 2005) e norma nacional (BRASIL, 2003) demonstram a importância da validação de métodos analíticos, a aplicação em laboratórios

analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados à finalidade de uso.

Segundo ICH (2005), o objetivo do procedimento de validação é demonstrar que ele é adequado para o uso pretendido. A validação é aplicada para análises de identificação, controle de impurezas, doseamento e teste de performance. Para que um método seja considerado validado alguns parâmetros devem ser avaliados. Para os ensaios de doseamento são exigidos os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez. E para avaliação do teste de identificação o parâmetro de especificidade é utilizado (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 34, 2011).

3.5 Técnicas analíticas

Uma das tendências da analítica química é o desenvolvimento de novas técnicas de análise e métodos hifenados, tais como a combinação de cromatografia líquida e diferentes detectores como espectrometria de massas, detector aerossol carregado e ressonância magnética nuclear são apenas alguns exemplos. Estas ferramentas poderosas envolveram um investimento considerável em instrumentos e exigem analistas devidamente treinados (TRULLOLS et al., 2004).

3.5.1 Detector de aerossol carregado (DAC)

A utilização da cromatografia líquida com detecção de aerossol carregado (CL-DAC) é relativamente nova, sendo que os primeiros detectores começaram a ser comercializados em 2004. No sistema de detecção do DAC, a fase móvel é nebulizada por um gás ionizado, normalmente nitrogênio. Após as gotas maiores são removidas. A fase móvel residual é evaporada, resultando em partículas de tamanho uniforme após passar pelo tubo de secagem. Concomitante, uma segunda corrente de gás (nitrogênio) é ionizada positivamente pela alta tensão do carregador Corona. Em seguida, as partículas do analito e o gás ionizado colidem numa câmara de mistura, onde a carga é transferida para a partícula. Depois de passar por uma

armadilha de íons para remover o excesso de gás ionizado, ocorre o impacto de partículas carregadas com o coletor. A carga é então transferida e medida por um eletrômetro sensível. O sinal apresenta-se em proporção direta com quantidade de partículas do analito (DIXON e PETERSON, 2002; GÓRECKI et al., 2006).

O DAC é considerado um detector universal, tendo como vantagem a detecção de compostos não voláteis e semi-voláteis, alta sensibilidade, boa precisão, facilidade no uso e resposta consistente independente das características químicas da molécula (VEHOVEC e OBREZA, 2010). O DAC tem sido utilizado na detecção de uma grande quantidade de analitos diferentes (BŁAŻEWICZ et al., 2010; HOLZGRABE et al., 2010; MÁRQUEZ-SILLERO et al., 2010; SHAODONG et al., 2010; JOSEPH e RUSTUM, 2010; ZHANG et al., 2010).

3.5.2 Detector ultravioleta

O detector mais amplamente empregado na cromatografia líquida é o ultravioleta (UV). Possui como vantagens a sua alta sensibilidade, ampla faixa de linearidade, um custo relativamente baixo, facilidade de utilização e o fato de que é compatível com a maioria dos solventes utilizados como fase móvel em modo de eluição isocrático ou gradiente. Possui as desvantagens de detectar apenas compostos que possuem na sua estrutura grupos cromóforos, na qual absorvem a luz UV. Apesar desta limitação, o número de compostos que possuem cromóforos é relativamente alto (VERVOORT et al., 2008).

3.5.3 Espectroscopia de massas

A espectroscopia de massas (EM) é um método analítico de detecção bastante específico e normalmente é acoplado à cromatografia líquida ou gasosa. É utilizado para determinação ou confirmação da identidade de fármacos e metabólitos, doseamento e determinação de impurezas presente em matérias-primas, medicamentos, fluidos biológicos, tecidos, entre outros. Também é utilizada

em controle de poluentes, controle de alimentos, química forense, produtos naturais e monitoramento de processos. Apresenta como limitação o alto custo do equipamento e analistas treinados (WATSON, 2005).

A espectroscopia de massas apresenta como princípio de funcionamento a geração em alto vácuo de moléculas ou fragmentos das moléculas carregados na forma positiva ou negativa. Através de um campo elétrico ou magnético ocorre a separação e a determinação da razão massa/carga das moléculas e seus fragmentos, que são detectados em função de sua abundância, resultando em um espectro de massas (WATSON, 2005; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

3.5.4 RMN

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido principalmente utilizada para elucidar e confirmar estruturas químicas. Durante a última década, os métodos de RMN têm sido utilizados para determinar o perfil de impurezas e caracterizar a composição de fármacos (HOLZGRABE, 1998). Esta técnica apresenta vantagens sobre muitas outras técnicas analíticas, pois além de ser uma técnica não destrutiva, é possível obter uma vasta quantidade de informações sobre a estrutura química das moléculas em uma única análise. RMN apresenta como desvantagem a menor sensibilidade com relação a outras técnicas como, por exemplo, EM.

O espectro de RMN permite identificar estereoisômeros, substâncias que são completamente idênticas no que diz respeito às suas propriedades químicas e físicas, mas diferentes nas suas fórmulas estruturais espaciais. Além disso, experimentos bidimensionais, RMN 2D, podem ser utilizados quando informações adicionais são necessárias para a elucidação da estrutura química de diferentes compostos presentes em uma mistura (CARDOZA et al., 2003).

3.6 Estudo de estabilidade

Degradações químicas e físicas de fármacos e medicamentos podem mudar os seus efeitos farmacológicos, resultando em eficácia terapêutica alterada, bem como podem gerar produtos tóxicos. Em função de que os produtos farmacêuticos são usados terapeuticamente com base na sua eficácia e segurança, os medicamentos devem ser estáveis e manter a sua qualidade durante todo o seu prazo de validade. A qualidade dos produtos farmacêuticos deve ser mantida nas diversas condições em que se encontrarem, desde a produção, armazenamento, transporte, bem como na casa do paciente. Portanto, a compreensão dos fatores que alteram a estabilidade dos medicamentos e as formas de garantir a sua estabilidade são fundamentais (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

O emprego de métodos analíticos indicativos de estabilidade é uma das formas de garantir a estabilidade de medicamentos. De acordo com o FDA (1987), métodos indicativos de estabilidade podem ser definidos, como métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades estruturais, químicas ou biológicas de cada princípio ativo de um medicamento e que podem distinguir cada um dos ingredientes ativos dos seus produtos de degradação, de modo que o teor do ingrediente ativo pode ser medido com exatidão.

Segundo a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) estudos de degradação forçada podem ajudar a identificar os prováveis produtos de degradação, que por sua vez podem ajudar a estabelecer as vias de degradação, a estabilidade intrínseca da molécula e validar o método indicativo de estabilidade utilizado. Os estudos de degradação forçada devem ser realizados sobre uma variedade de condições, como hidrólise em uma ampla faixa de pH, fotólise, oxidação, calor seco e umidade (ICH, 2003).

3.7 Fotodegradação

A presença de fármacos no meio ambiente é uma emergente área de pesquisa principalmente porque o impacto ecológico dos fármacos descartados no meio

ambiente não é conhecido (CHRISTENSEN, 1998; BOREEN, 2003). Há evidências da presença de mais de 160 fármacos diferentes no ambiente aquático, como efluentes, em água de superfície, água do mar, água subterrânea e água potável (KÜMMERER, 2010). Degradação fotoquímica pode ser considerada a principal via de degradação desses compostos nas águas de superfície e pode ser utilizada como uma forma de diminuir as suas concentrações no meio ambiente ou removê-los totalmente e, assim, reduzir o seu potencial de impacto na saúde humana e na vida aquática (BOREEN, 2003; SIRTORI, 2010).

A cinética de degradação corresponde à velocidade com que ocorre às reações de degradação do fármaco. A cinética de degradação ocorre com velocidade definida e as reações são de natureza química. Os principais fatores que influenciam a velocidade de degradação são a concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiações e catálise (NUDELMAN, 1975).

3.8 Referências

AAP (American Academy of Pediatrics). Clinical practice guideline: diagnosis and evaluation of the child with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatrics**, v.105, p.1158-1170, 2000.

AAP (American Academy of Pediatrics - Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Committee on Quality Improvement). Clinical practice guideline: treatment of the school-aged child with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatrics**, v. 108, p. 1033-1044, 2001.

AAP (American Academy of Pediatrics). ADHD: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. **Pediatrics**, v.128, n. 5, 2011.

ADLER, L.A., GOODMAN, D.W., KOLLINS, S.H., WEISLER, R.H., KRISHNAN, S., ZHANG, Y., BIEDERMAN, J; 303 STUDY GROUP. 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. 1364–1373, 2008.

ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel organization of functionally linking basal ganglia and cortex. **Annual Review of Neuroscience**, v. 9, p. 357–381, 1986.

APA (American Psychiatric Association). **The diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 1994.

APA (American Psychiatric Association). **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-IV-TR™**. 4. ed. rev. Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 112, 114.

BANASCHEWSKI, T.; COGHILL, D.; SANTOSH, P.; ZUDDAS, A.; ASHERSON, P.; BUITELAAR, J.; DANCKAERTS, M.; DOPFNER, M.;

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V.; KEENAN, K.; KNEE, D.; TSUANG, M. T. Family-genetic and psychosocial risk factors in DSM-III attention deficit disorder. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 29, n. 4, p. 526–533, 1990.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BIEDERMAN, J.; MILBERGER, S.; FARAONE, S. V.; , K.; GUTE, J.; MICK, E.; ABLON, S.; WARBURTON, R.; REED, E. Family-environment risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder: A test of Rutter's indicators of adversity. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 464–470, 1995.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V.; TAYLOR, A.; SIENNA, M.; WILLIAMSON, S.; FINE, C. Diagnostic Continuity Between Child and Adolescent ADHD: Findings From a Longitudinal Clinical Sample. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 37, n. 3, p. 305–313, 1998.

BIEDERMAN, J.; MICK, E.; FARAONE, S. V.; BRAATEN, E.; DOYLE, A.; SPENCER, .; WILENS, T. E.; FRAZIER, J.; JOHNSON, M. A. Influence of Gender on Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Referred to a Psychiatric Clinic. **The American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 1, p. 36–42, 2002.

BIEDERMAN, J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1215–1220, 2005.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; SPENCER, T. J.; MICK, E.; MONUTEAUX M. C.; ALEARDI, M. Functional impairments in adults with self-reports of diagnosed ADHD: a controlled study of 1001 adults in the community. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 524-540, 2006.

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. 970–976, 2007.

BIEDERMAN, J.; KRISHNAN, S.; ZHANG, Y.; MCGOUGH, J. J.; FINDLING, R. L. Efficacy and Tolerability of Lisdexamfetamine Dimesylate (NRP-104) in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Forced-Dose, Parallel-Group Study. **Clinical therapeutics**, v. 29, n. 3, p. 450–463, 2007a.

BŁAŻEWICZ, A.; FIJAŁEKA, Z.; WAROWNA-GRZES'KIEWICZA, M.; JADACHB, M. Determination of atracurium, cisatracurium and mivacurium with their impurities in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with charged aerosol detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1266-1272, 2010.

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 Study. **Clinical Therapeutics**, v. 32, n. 2, p. 252-264, 2010.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. **Aquatic Sciences**, v. 65, p. 320–341, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 38 de 7 de julho de 2009. Dispõe sobre a inclusão de substâncias farmacêuticas na lista de Denominações Comuns Brasileiras - DCBs. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 jul. 2009.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London : The Stationery Office BP Commission, 2011. 4 v. : il. 824 p.

BUSCH, B.; BIEDERMAN, J.; COHEN, L. G.; SAYER, J. M.; MONUTEAUX, M. C.; MICK, E.; ZALLEN, B.; FARAONE, S.V. Correlates of ADHD Among Children in Pediatric and Psychiatry Clinics. **Psychiatric Services**, v. 53, n. 9, p. 1103–1111, 2002.

CABALLERO, J.; NAHATA, M. C. Atomoxetine hydrochloride for the treatment of ADHD. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 12, p. 3065-3083, 2003.

CANTWELL, D. P. Psychiatric illness in the families of hyperactive children. **Archives of General Psychiatry**, v. 27, n. 3, p. 414–417, 1972.

CARDOZA, L. A.; ALMEIDA, V. K.; CARR, A.; LARIVE, C. K.; GRAHAM, D. W. Separations coupled with NMR detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 766–775, 2003.

COOK, E. H.; STEIN, M. A.; KRASOWSKI, M. D.; COX, N. J.; OLKON, D. M.; KIEFFER, J. E.; LEVENTHAL, B. L. Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. **American Journal Human Genetic**, v. 56, n. 4, p. 993–998, 1995.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CHRISTENSEN, F. M. Pharmaceuticals in the Environment - A Human Risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 212-221, 1998.

DIXON, R. W.; PETERSON, D. S. Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 13, p. 2930–2937, 2002.

DOPHEIDE, J. A. ASHP therapeutic position statement on the appropriate use of medications in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in pediatric patients. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 14, p. 1502-1509, 2005.

DOYLE, R. The history of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatric Clinics of North America**. v.27, n. 2, p. 203–214, 2004.

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. 1001-1010, 2010.

ERMER, J.; HAFHEY, 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: the biological fate of chemicals**, v. 40, n. 2, p. 290-297, 2011.

ERMER, J.; BUCKWALTER, M.; MARTIN, P.; P.7.c.002 Low variability in exposure to d-amphetamine in children and adults after administration of lisdexamfetamine dimesylate. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. study 1, p. S605, 2011a.

ERMER, J. C.; DENNIS, K.; HAFHEY, 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. **Clinical Drug Investigation**, v.31, n. 6, p. 357-370, 2011b.

FARAONE, S. V.; BIEDERMAN, J.; CHEN, W. J.; KRIFCHER, B.; KEENAN, K.; MOORE, C.; SPRICH, S.; TSUANG, M. T. Segregation analysis of attention deficit

hyperactivity disorder: Evidence for single gene transmission. **Psychiatric Genetics**, v. 2, n. 4, p. 257–275, 1992.

FARAONE, S. V.; DOYLE, A. E.; MICK, E.; BIEDERMAN, J. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine d(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 7, p. 1052–1057, 2001.

FARAONE, S. V.; SERGEANT, J.; GILLBERG, C.; BIEDERMAN, J. The worldwide prevalence of ADHD: Is it an American condition? **World Psychiatry**, v. 2, n. 2, p. 104–113, 2003.

FDA (Food and Drugs Administration), Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics. Rockville, MD, 1987.

FRICK, P. J.; LAHEY, B. B.; CHRIST, M. A. G.; LOEBER, R.; GREEN, S. (1991): History of childhood behavior problems in biological relatives of boys with attention deficit hyperactivity disorder and conduct disorder. **Journal of Clinical Child Psychology**, v. 20, n. 4, p. 445–451, 1991.

GABBARD, G. O. **Tratamento dos Transtornos Psiquiátricos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

GÓRECKI, T.; LYNEN, F.; SZUCS, R.; SANDRA, P. Universal Response in Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 3186–3192, 2006.

GREENHILL, L. L.; PLISZKA, S.; DULCAN, M. K.; BERNET, W.; ARNOLD, V.; BEITCHMAN, J.; BENSON, R. S.; BUKSTEIN, O.; KINLAN, J.; MCCLELLAN, J.; RUE, D.; SHAW, J. A.; STOCK, S.; AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY. Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 41, n. 2 suppl, p. 26S–49S, 2002.

HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; GOSDEN, J.; NUTT, D. J. Amphetamine, past and present - a pharmacological and clinical perspective. **Journal of psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 479–496, 2013.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3rd ed. Chichester: Wiley-Interscience, 2007

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

HODGKINS, P.; MONTEJANO, L.; SASANÉ, R.; HUSE, D. Cost of illness and comorbidities in adults diagnosed with attention-deficit/hyperactivity disorder: a retrospective analysis. **The Primary Care Companion for CNS Disorders**, v. 13, n. 2, p. e1–e6, 2011.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. W. K.; WAWER, I. NMR spectroscopy in pharmacy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. , p. 557–616, 1998.

HOLZGRABE, U.; NAP, C.J.; ALMELING, S. Control of impurities in L-aspartic acid and L-alanine by high-performance liquid chromatography coupled with a corona charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 3, p. 294-301, 2010.

ICH (International Conference on Harmonization). Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2) International Conference on Harmonization, Harmonised Tripartite Guideline, Geneva, 2003.

ICH (International Conference on Harmonization). Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

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. 410–418, 2009.

JASINSKI, D. R.; KRISHNAN, S. Abuse liability and safety of oral lisdexamfetamine dimesylate in individuals with a history of stimulant abuse. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 419–427, 2009a.

JOSEPH, A.; RUSTUM, A. Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a charged aerosol detector. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 521-531, 2010.

KAPEZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; EZQUIERDO I. e colaboradores. **As bases biológicas dos transtornos psiquiátricos: uma abordagem translacional**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

KESSLER, R. C.; CHIU, W. T.; DEMLER, O.; WALTERS, E. E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617–627, 2005.

KESSLER, R. C.; ADLER, L.; BARKLEY, R.; BIEDERMAN, J.; CONNERS, C. K.; DEMLER, O.; FARAONE, S. V.; GREENHILL, L. L.; HOWES, M. J.; SECNIK, K.; SPENCER, T.; USTUN, T. B.; WALTERS, E. E.; ZASLAVSKY, A. M. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey replication. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 4, p. 716-723, 2006.

KRISHNAN, S.; MONCRIEF, S. An Evaluation of the Cytochrome P450 Inhibition Potential of Lisdexamfetamine in Human Liver Microsomes. **DMD - Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 1, p. 180-184, 2007.

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.; 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, 2008.

KÜMMERER, K. Pharmaceuticals in the Environment, **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 57-75, 2010.

MÁRQUEZ-SILLERO, I.; AGUILERA-HERRADOR, E.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 1-6, 2010.

MICKLE, T.; KRISHNAN, S.; BISHOP, B.; LAUDERBACK, C.; MONCRIEF, J. S.; OBERLENDER, R. O.; PICCARIELLO, T. inventors, New River Pharmaceuticals, Inc., assignee. Abuse-resistant amphetamine compounds. **US patent 7, 105, 486**, 2006.

MANSHADI, M.; LIPPMANN, S.; O'DANIEL, R. G.; BLACKMAN, A. Alcohol abuse and attention deficit disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 44, n. 10, p. 379-380, 1983.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MORRISON, J. R.; STEWART, M. A. A family study of the hyperactive child syndrome. **Biological Psychiatry**, v. 3, n. 3, p. 189-195, 1971.

MICK, E.; BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V.; SAYER, J.; KLEINMAN, S. Case-control study of attention-deficit/hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 41, n. 4, p. 378–385, 2002.

MILBERGER, S.; BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V.; CHEN, L.; JONES, J. Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder in children? **The American Journal of Psychiatry**, v. 153, n. 9, p. 1138-1142, 1996.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

OGDIE, M. N.; MACPHIE, I. L.; MINASSIAN, S. L.; FISHER, S. E.; FRANCK, C.; CANTOR, R. M.; MCCracken, J. T.; MCGOUGH, J. J.; NELSON, S. F.; MONACO, A. P.; SMALLEY, S. L. A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 5, p. 1268-1279, 2003.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Editora Artes Médicas; 1993.

PENNICK, M. Absorption and Hydrolysis of Lisdexamfetamine Dimesylate to Form the Active Moiety, D-Amphetamine. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**. v.19, n.6, p. 786-786, 2009.

PENNICK, M. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 6, p. 317-327, 2010.

PLISZKA, S. R. Comorbidity of attention-deficit/hyperactivity disorder with psychiatric disorder: an overview. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59, suppl 7, p. 50-58, 1998.

PLISZKA, S. R.; GREENHILL, L. L.; CRISMON, M. L.; SEDILLO, A.; CARLSON, C.; CONNERS, C. K.; MCCracken, J. T.; SWANSON, J. M.; HUGHES, C. W.; LLANA, M. E.; LOPEZ, M.; TOPRAC, M. G. The Texas Children's Medication Algorithm

Project: report of the Texas Consensus Conference Panel on Medication Treatment of Childhood Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Part II: tactics. Attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 39, n. 7, p. 908-919, 2000.

PLISZKA, S.; AACAP Work Group on Quality Issues. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, n. 46, n. 7, p. 894-921, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROHDE L. A.; BIEDERMAN, J.; BUSNELLO E. A.; ZIMMERMANN, H., SCHMITZ, M.; MARTINS, S.; TRAMONTINA, S. ADHD in a School Sample of Brazilian Adolescents: A Study of Prevalence, Comorbid Conditions, and Impairments. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 6, p. 716-722, 1999.

SCAHILL, L.; SCHWAB-STONE M. Epidemiology of ADHD in school-age children. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 9, n. 3, p. 541-555, 2000.

SCHACHAR, R.; WACHSMUTH, R. Hyperactivity and parental psychopathology. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 381-392, 1990.

SHAODONG, J.; LEE, W. J.; EE, J. W.; PARK, J. H.; KWON, S. W.; LEE, J. Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 4, p. 973-978, 2010.

SIGMA-ALDRICH.COM Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/cerillian/l026?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 10 jan. 2014.

SIRTORI, Carla. Evaluación analítica de procesos de transformación biológica, fotoquímica y fotocatalítica de fármacos en água. Directores: Dr. D. Sixto Malato Rodríguez y Dra. Dña. Ana Agüera López. 2010, 304 f. Tese – (Doctorado en Ciencias Químicas) - Departamento de Hidrogeología y Química Analítica, Universidad de Almería, Almeria, España, 2010.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SOLANTO, M. V. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 1, p. 127-152, 1998.

SPENCER, T.; BIEDERMAN, J.; WILENS T. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Comorbidity. **Pediatric Clinics of North America**, v. 46, n. 5, p. 915-927, 1999.

SPRICH-BUCKMINSTER, S.; BIEDERMAN, J.; MILBERGER, S.; FARAONE, S.; LEHMAN, B. K. Are perinatal complications relevant to the manifestation of ADD? Issues of comorbidity and familiarity. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 32, n. 5, p. 1032–1037, 1993.

TRULLOLS E., RUISANCHEZ I., RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.

USP 34. The United States Pharmacopeia. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.

VERVOORT, N.; DAEMEN, D.; TÖRÖK, G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p. 92-100, 2008.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 10, p. 1549–1556, 2010.

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.

WATSON, D. G. Pharmaceutical Analysis: **A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005, 337 p.

WELNER, Z.; WELNER, A.; STEWART, M.; PALKES, H.; WISH, E. A controlled study of siblings of hyperactive children. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 165, n. 2, p. 110-117, 1977.

WITTCHEN, H.U.; JACOBI, F.; REHM, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; JÖNSSON, B.; OLESEN, J.; ALLGULANDER, C.; ALONSO, J.; FARAVELLI, C.; FRATIGLIONI, L.; JENNUM, P.; LIEB, R.; MAERCKER, A.; VAN OS, J.; PREISIG, M.; SALVADOR-CARULLA, L.; SIMON, R.; STEINHAUSEN, H. C. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 655–679, 2011.

ZHANG, K.; DAI, L.; CHETWYN, N.P. Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 37, p. 5776-5784, 2010.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Kluwer: Academic Publishers, 2002.

4 **CAPÍTULO I –**

Purificação e análise do dimesilato de lisdexanfetamina SQR e identificação da
forma farmacêutica

4.1 Introdução

Substâncias químicas de referência (SQR) são importantes no controle de qualidade de fármacos e são amplamente utilizadas para análise qualitativa e quantitativa de medicamentos. O grau de pureza de substâncias químicas de referência deve ser elevado e exato, uma vez que é utilizado como parâmetro de comparação (WHO, 2006), por isso, a pureza da SQR deve ser rigorosamente determinada. O valor medido deve ser a melhor estimativa do valor verdadeiro quando a SQR é determinada por meio de métodos químicos. O desvio entre o valor medido e o valor verdadeiro não deve ser maior do que a incerteza do método de análise (LIU e HU, 2007).

Não existe no Brasil a SQR de dimesilato de lisdexanfetamina (LDX), logo para a sua aquisição seria necessário recorrer ao mercado internacional. Como LDX é um fármaco da lista A3 (substâncias entorpecentes) da Portaria SVS/MS 344 de 12 de maio de 1998, a obtenção de um padrão farmacopeico ou, neste caso, de uma SQR não compendial seria de extrema dificuldade, devido ao alto custo, morosidade e necessidade de aprovação de diferentes órgãos regulatórios (BRASIL, 1998). Em função disso, optou-se pela obtenção da SQR de LDX através da forma farmacêutica.

A adequação de uma substância para a utilização como SQR requer uma avaliação cuidadosa. É necessário considerar todos os resultados obtidos a partir de uma grande variedade de métodos analíticos. Estes dados quando tomados em conjunto irão assegurar que a substância é adequada para o uso pretendido. A extensão das análises requeridas depende do propósito para o qual a SQR será empregada e pode envolver uma série de laboratórios independentes (WHO, 2006).

A SQR de LDX utilizada nesta dissertação foi purificada da forma farmacêutica e identificada por espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). O teor da SQR foi obtido por balanço de massas.

4.2 Purificação da SQR

A SQR de LDX foi obtida pela purificação do fármaco presente na sua forma farmacêutica.

4.2.1 Procedência da SQR

LDX cápsula 70 mg, de nome comercial Venvanse[®] foi adquirido em farmácia do comércio local. A forma farmacêutica apresentava o lote 3096430A e validade 11/2013. Cada cápsula de Venvanse[®], de acordo com a bula deveria conter: 70 mg de dimesilato de lisdexanfetamina, excipientes do conteúdo da cápsula (celulose microcristalina, croscarmelose sódica e estearato de magnésio) e excipientes do envólucro da cápsula (gelatina, dióxido de titânio, corantes FD&C Red nº 3, FD&C Yellow nº 6).

4.2.2 Materiais e métodos

Para a realização da purificação de LDX utilizou-se a técnica de cristalização adaptada. Separou-se 28 cápsulas da forma farmacêutica, retirou-se o conteúdo de cada cápsula, e pesou-se cerca de 5 g da amostra e adicionou-se 75 mL de metanol misturando com um bastão de vidro. A mistura foi mantida por 15 minutos em ultrassom. A solução foi filtrada à temperatura ambiente em membrana de poliamida (0,45 µm), sob vácuo, e transferida para um balão de fundo cônico. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório (modelo Laborota 4000OB, marca Heidolph, Alemanha) a baixa pressão. O processo foi realizado novamente com o resíduo obtido, dissolvendo esta vez em 20 mL de metanol. Após, o sólido obtido foi seco em estufa a vácuo (modelo TE-395, marca Tecnal, Brasil), 60 °C, sob vácuo (- 500 mmHg), por 6 horas.

4.2.3 Resultados e discussão

4.2.3.1 Desenvolvimento do método de purificação de LDX

O método mais comum de purificação de compostos orgânicos é a cristalização, por ser a mais simples e mais efetiva técnica de purificação de sólidos orgânicos. O processo envolve os estágios de dissolução, filtração, cristalização e secagem dos cristais. A cristalização baseia-se na diferença de solubilidade entre a substância desejada e seus contaminantes, num solvente adequado a uma dada temperatura (HARWOOD et al., 1999; PAVIA et al., 2007; MARQUES e BORGES, 2012)

O primeiro ponto a ser avaliado é a escolha do solvente. O solvente ideal para a cristalização não deve reagir com o composto, deve ser altamente volátil, ou seja, de fácil remoção, não tóxico e não inflamável (HARWOOD et al., 1999; PAVIA et al., 2007; MARQUES e BORGES, 2012). A escolha do solvente foi determinada a partir das seguintes premissas: LDX deveria ser muito solúvel no solvente e as impurezas pouco solúveis. Como LDX é uma amina polar, com uma grande solubilidade em água (792 mg/mL), e os excipientes, celulose microcristalina, croscarmelose sódica e estearato de magnésio apresentam baixa solubilidade em água (Tabela 2), o metanol foi escolhido por ter uma alta polaridade e um baixo ponto de ebulição.

CAPÍTULO I

Tabela 2. Solubilidade dos excipientes presentes na forma farmacêutica de LDX.

Excipiente	Solubilidade
	Ligeiramente solúvel em 5% (p/v) de solução de hidróxido de sódio;
celulose microcristalina	Praticamente insolúvel em água; Dilui-se em ácidos e a maior parte dos solventes orgânicos.
croscarmelose sódica	Insolúvel em água; Praticamente insolúvel em acetona, etanol e tolueno.
	Praticamente insolúvel em etanol, etanol (95%), éter e água;
estearato de magnésio	Ligeiramente solúvel em benzeno quente e etanol quente (95%).

Fonte: ROWE et al., 2006.

O processo foi realizado em temperatura ambiente, pois desta forma foi possível obter a completa solubilização de LDX e evitar a dissolução dos excipientes. Foi realizada uma recristalização para obter uma SQR de LDX com a maior pureza possível. O rendimento obtido foi de 88,01%.

4.3 Caracterização de LDX candidato à SQR

4.3.1 Identificação da substância química de referência

4.3.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia no IV é uma técnica analítica que fornece informações estruturais de uma molécula, pois quase todos os compostos que apresentem

ligações covalentes, orgânicos ou inorgânicos, absorvem a radiação eletromagnética nesta região do espectro. A faixa do espectro de IV situa-se entre as regiões do visível e microondas, e a faixa mais usual na química orgânica encontra-se entre 4000 cm^{-1} (alta frequência) e 400 cm^{-1} (baixa frequência). Vibrações e rotações moleculares podem ser excitadas pela absorção da radiação nesta região do espectro eletromagnético em intensidade superior à região do visível. Muitos grupos funcionais em moléculas orgânicas apresentam vibrações características que correspondem a bandas de absorção em regiões definidas do espectro de IV. Assim, os grupos funcionais podem ser identificados por suas bandas de absorção características. A identificação de uma substância é realizada através da análise detalhada do espectro, comparando o espectro obtido com espectros de bancos de dados e tabelas de correlação (PAVIA et al., 2007; HESSE et al., 2008).

A espectroscopia na região do IV é largamente utilizada na análise de fármacos. Os principais usos encontram-se na identificação de fármacos em matérias-primas e em medicamentos, caracterização de amostras e detecção de polimorfos. Porém, esta técnica apresenta algumas limitações quanto à complexidade de preparação de amostras para quantificação e a falta de sensibilidade na detecção de impurezas (WATSON, 2005). A espectroscopia na região do IV foi utilizada para a caracterização de LDX SQR.

4.3.1.1.1 Materiais e métodos

A análise de LDX candidato à SQR por espectroscopia no IV foi realizada por refletância total atenuada (ATR) através da leitura direta, utilizando uma faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro FTIR da marca Shimadzu, modelo 8001.

4.3.1.1.2 Resultados e discussão

O espectro de IV obtido para LDX candidato à SQR, mostrado na Figura 2, apresenta bandas de absorção características dos grupamentos apresentados na estrutura química da molécula, listados na Tabela 3. Através do espectro foi possível caracterizar cinco grupamentos importantes para identificação de LDX: banda da amida secundária, carbonila da amida, deformação angular de N-H e estiramento C-N de amida secundária, sais de amina primária e o dimesilato através vibrações simétrica e assimétrica do mesilato. Sais de amina primária, (formados através de ligações iônicas com mesilato) são caracterizados por uma banda intensa e larga entre 3200 a 2800 cm^{-1} , devido ao estiramento assimétrico e simétrico de NH_3^+ (COLTHUP et al., 1990; MARGARETA e MATEESCU, 1972).

Não foi encontrado na literatura pesquisada o espectro de IV de LDX, mas foi possível identificar as possíveis bandas referentes aos principais grupamentos da molécula com o auxílio de tabelas de correlação presente nas referências citadas.

Figura 2. Espectro de infravermelho de LDX candidato à SQR.

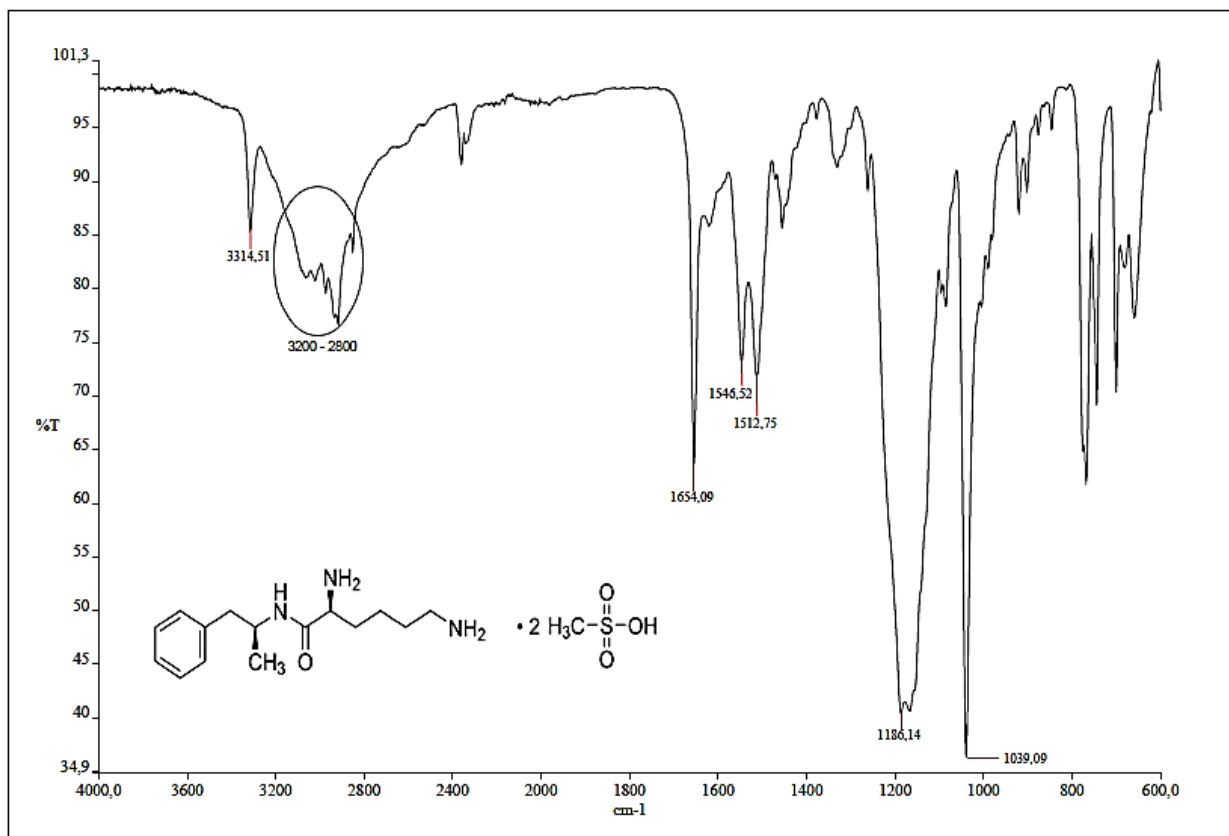


Tabela 3. Principais bandas de absorção de LDX candidato à SQR no IV e suas atribuições.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3314	Deformação axial de N-H de amida secundária
3200 - 2800	Sais de amina primária
1654	Deformação axial de carbonila (C=O) de amida
1546 / 1512	Deformação angular de N-H e estiramento C-N de amida secundária
1186 / 1039	Vibrações simétrica e assimétrica, respectivamente, do derivado do ácido sulfônico - CH ₃ SO ₃ H (mesilato)

Fonte: MARGARETA e MATEESCU, 1972; COLTHUP et al., 1990; SILVERSTEIN et al., 2007.

4.3.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A RMN é uma ferramenta analítica que permite a visualização de átomos e moléculas em solução ou em estado sólido. É uma técnica não-destrutiva e permite a elucidação da estrutura e quantificação simultaneamente. Os espectros de RMN fornecem informações detalhadas da estrutura configuracional e conformacional da molécula (BALCI, 2005; HOLZGRABE et al., 2008).

A RMN baseia-se nas transições entre níveis de energia de um núcleo com spin nuclear exposto a um campo magnético (B_0). Átomos como o ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , entre outros, que apresentam núcleos com número quântico de spin nuclear (I) diferente de zero, sofrem este fenômeno. A blindagem magnética nuclear, originada da circulação de elétrons em torno do núcleo, estabelece diferenças entre núcleos de mesma natureza em ambientes químicos diferentes. Um sinal de radiofrequência ao ser emitido, responsável por um segundo campo magnético (B_1), gera valores de ΔE referente as transições dos núcleos. Os valores de ΔE são convertidos em

deslocamentos químicos e são apresentados em um espectro. Cada núcleo apresentará um deslocamento químico diferente (URSINI, 1997; BALCI, 2005).

RMN de ^1H e ^{13}C , chamados de RMN 1D, foram os primeiros a serem descobertos e são os mais comumente utilizados na identificação de fármacos. Os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos permitem determinar sua posição na estrutura química da molécula (BALCI, 2005).

O chamado espectro de RMN 2D é um gráfico de 3 dimensões que nos permite avaliar as correlações entre H-H, H-C ou outro núcleo. Em RMN medem-se as constantes de acoplamento (J) entre núcleos, que pode ser de curta ou longa distância. Quando este acoplamento ocorre entre núcleos do mesmo tipo é chamado acoplamento homonuclear, como por exemplo, COSY (correlation spectroscopy) e quando este acoplamento ocorre entre dois tipos diferentes de núcleos é chamado acoplamento heteronuclear, como exemplo temos HETCOR (heteronuclear correlation), HSQC (heteronuclear single quantum coherence) e HMBC (heteronuclear multi bond correlation). HMBC é um RMN 2D usado para correlacionar sinais de átomos de ^1H e sinais de átomos de ^{13}C separados por ligações múltiplas, geralmente 2 ou 3 (SILVERSTEIN et al., 2007).

RMN foi utilizado para determinar a identidade de LDX candidato à SQR.

4.3.1.2.1 Materiais e métodos

Os espectros de RMN foram realizados a partir de uma amostra preparada com 20 mg de LDX candidato à SQR em 0,5 mL de solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-D_6). A amostra foi transferida para tubo de vidro para RMN (0,5 cm x 18 cm).

Foram utilizados os espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III 400 e Bruker Avance III 600. A avaliação dos dados foi realizada através do software Bruker-Topspin, versão 3.0. As especificações dos

experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C estão descritas nas Figuras 4.2 e 4.3. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Unicamp, Campinas, SP.

Os espectros de RMN 1-D de ^1H e ^{13}C , juntamente com a análise RMN 2D de HMBC foram utilizadas para a identificação de LDX candidato à SQR.

4.3.1.2.2 Resultados e discussão

A análise dos espectros RMN 1D (^1H e ^{13}C) e RMN 2D (HSQC e HMBC) permitiu realizar as atribuições dos hidrogênios e carbonos de LDX candidato à SQR. As Figuras 3 e 4 apresentam os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de LDX candidato à SQR, respectivamente, assim como as suas atribuições dos deslocamentos químicos.

As correlações entre carbonos e hidrogênios podem ser vistas nas Figuras 5 e 6. A combinação de todas as informações confirmou a identidade de LDX candidato à SQR.

Figura 3. Espectro de RMN de 1H de LDX candidato à SQR e atribuições dos deslocamentos químicos.

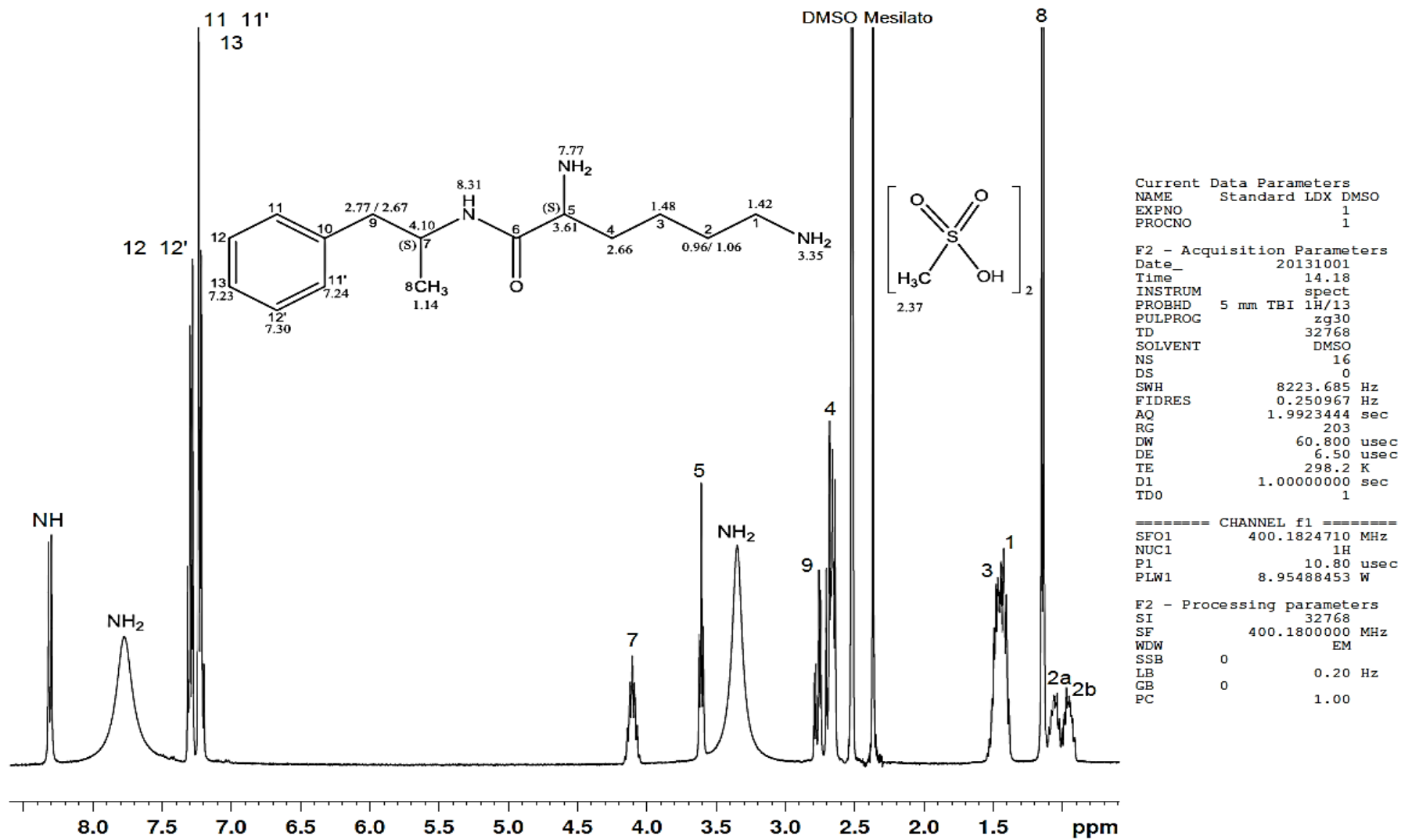


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C de LDX candidato à SQR e atribuições dos deslocamentos químicos.

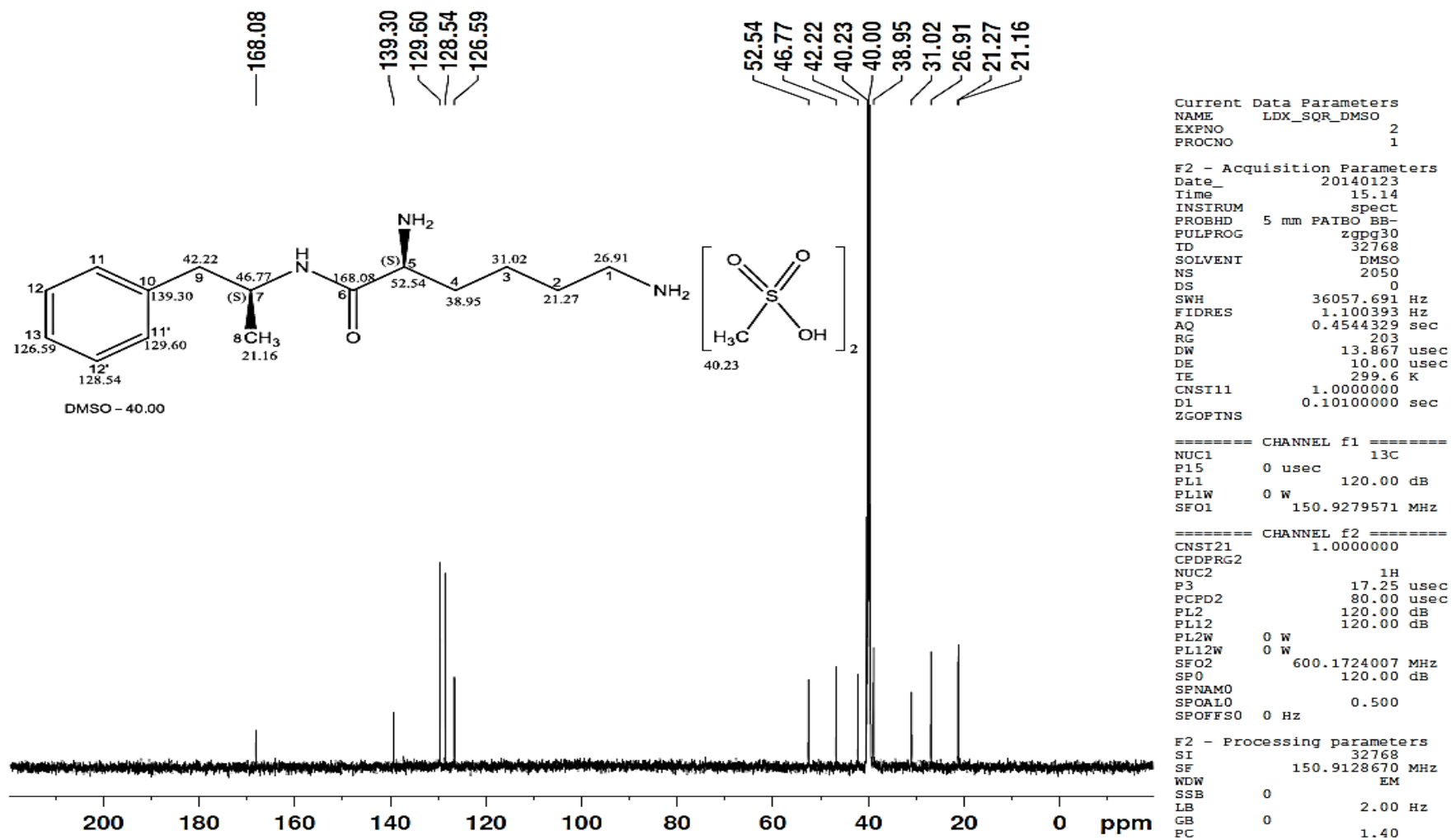


Figura 5. HMBC de LDX candidato à SQR.

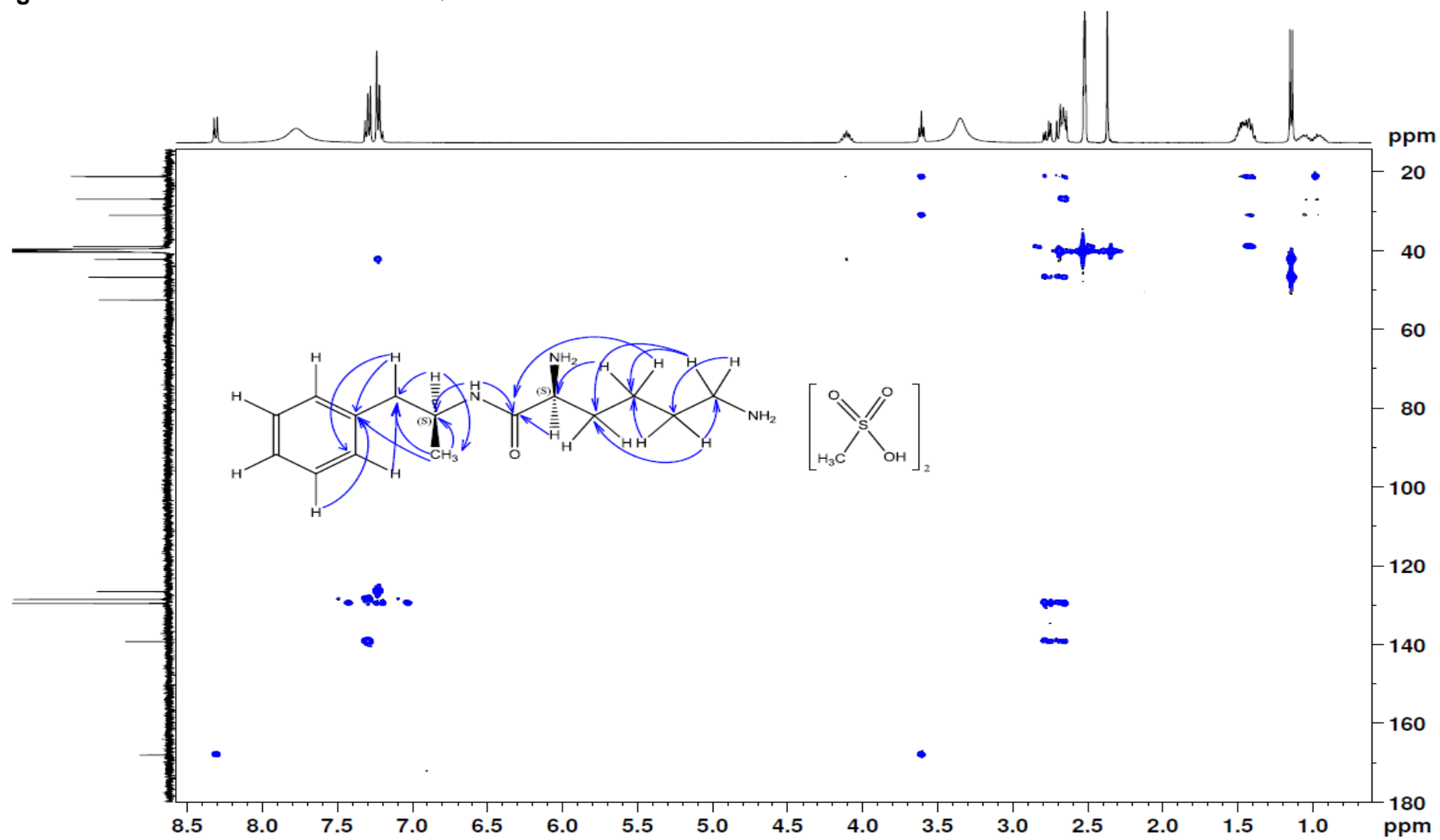
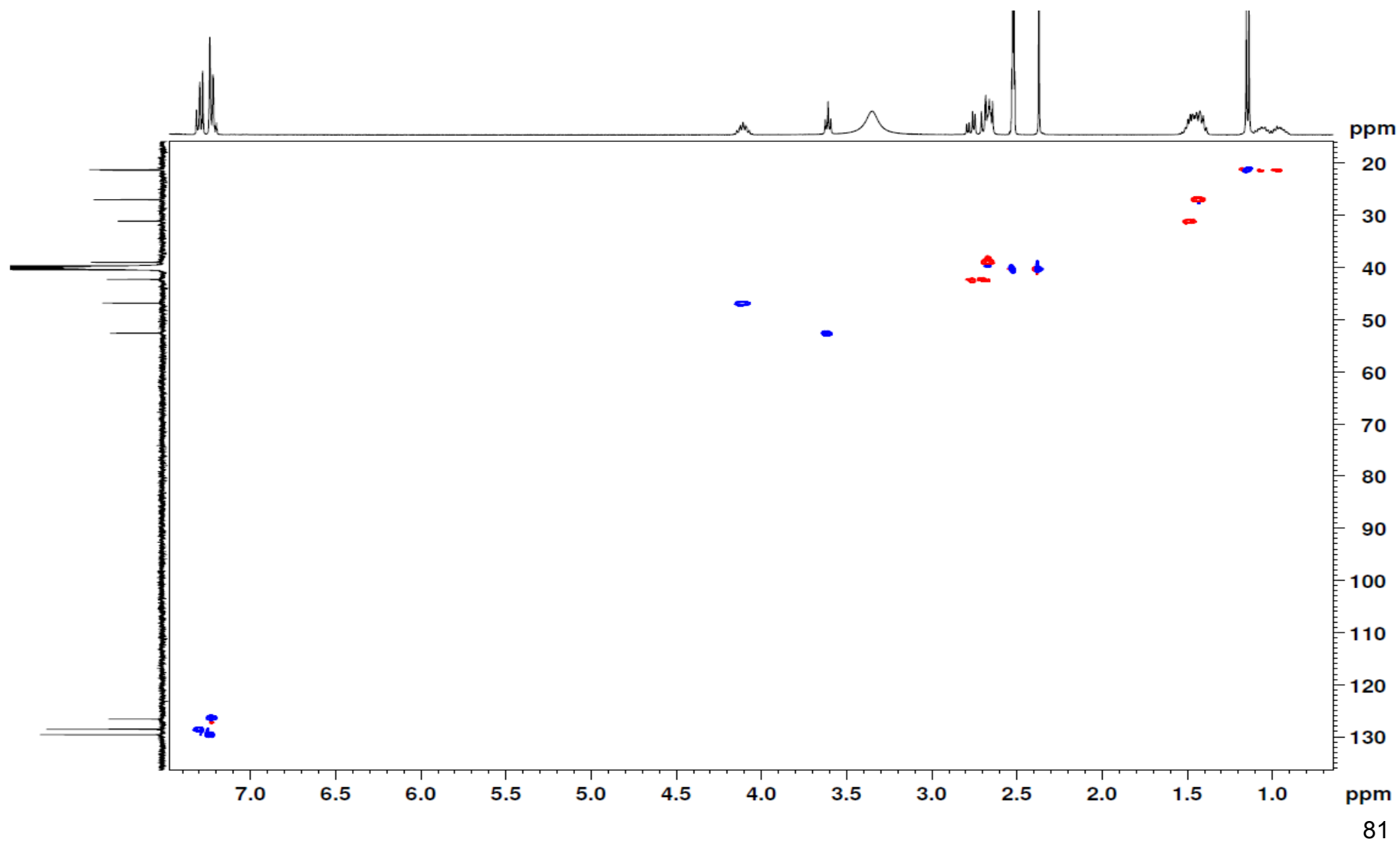


Figura 6. HSQC de LDX candidato à SQR.



4.3.1.3 Espectrometria de massas (EM)

Espectrometria de massas (EM) difere de outras técnicas como espectroscopia no IV e RMN por não absorver radiação do espectro eletromagnético, mas apresenta especificidade na identificação de compostos comparáveis a estas técnicas. A espectrometria de massas é um método destrutivo, isto é, a amostra não pode ser recuperada após a análise. Por outro lado, a EM é altamente sensível, fornece um grande número de informações sobre a estrutura do analito e requer menor quantidade de amostra que o IV ou RMN (SMITH, 2004).

EM baseia-se na produção de íons de analito, ou seja, na detecção dos valores da relação massa / carga (m/z). Consequentemente, em nível instrumental três componentes são essenciais para realizar o experimento de EM: (i) fonte de ions, (ii) analisador de massa, e (iii) detector (TRALDI et al., 2006).

O analisador de tempo de voo (ATV), também conhecido como Time-of-Flight Analyser (TOF), é um analisador de massas bastante utilizado na identificação de compostos. A separação de íons no ATV baseia-se no princípio de que os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são acelerados através de um “tubo de voo” para serem identificados. É dada a mesma energia inicial aos íons e estes apresentarão velocidades diferentes proporcionais aos seus valores de massa/carga (m/z). ATV permite determinar a composição elementar dos analitos com bastante exatidão, pois obtém a massa dos compostos com 4 casas após a vírgula (SMITH, 2004; CHIARADIA et al., 2008).

A espectrometria de massas do tipo ATV acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (CL-Q-ATV) foi utilizada para determinar a identidade de LDX candidato à SQR.

4.3.1.3.1 Materiais e métodos

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, acoplado a um espectrômetro de

massas híbrido quadrupolo Q-TOF ABSCIEX TripleTOF 5600 (CL-Q-ATV). A análise cromatográfica foi realizada usando uma coluna Thermo Hypersil GOLD HILIC (150 mm x 2,1 mm x 5 µm), em modo de eluição gradiente, conforme Tabela 4. Para todas as análises, o volume de amostra foi de 10 µL e o fluxo de fase móvel foi de 300 µL/min. A amostra foi preparada na concentração de 1 ppm em acetonitrila. O tempo de equilíbrio entre corridas foi de 6 min com 5% da fase A. A Tabela 5 apresenta os parâmetros e as condições utilizadas no CL-Q-ATV.

As análises foram realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Porto Alegre, RS.

Tabela 4. Gradiente da fase móvel do sistema cromatográfico utilizado para identificação de LDX candidato à SQR por CL-Q-ATV.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	5	95
1	5	95
4	80	20
7	80	20
8	5	95
10	5	95

A: formato de amônio 10 mM, com adição de 0,1% ácido fórmico.

B: acetonitrila, com adição de 0,1% ácido fórmico.

CAPÍTULO I

Tabela 5. Parâmetros e condições de análise do espectrômetro de massas (CL-Q-ATV).

MS conditions		MS/MS conditions	
GS1	50 (psi)	DP	60 (V)
GS2	50 (psi)	CE	35 (eV)
CUR	15 (psi)	CES	15 (eV)
TEM	400 (°C)	Mass range	100 - 1000 (Da)
IS	4500 (V)	High resolution mode	0.1 (s)
DP	60 (V)	Accumulation time	
CE	10 (eV)	Ionization	
Mass range	100 - 1000 (Da)	ESI+	
Accumulation time	0.5 s		

4.3.1.3.2 Resultados e discussão

A análise por CL-Q-TOF permitiu identificar o íon molecular (IM) de LDX com uma exatidão de 4 casas (m/z 264,2077) e um erro de 2,6 ppm, dentro do ideal que é de 5 ppm (Figura 7 e Tabela 6). Os íons produzidos (*product-ion*) a partir da fragmentação do IM de LDX foram elucidados e permitiram confirmar a identidade de LDX candidato à SQR.

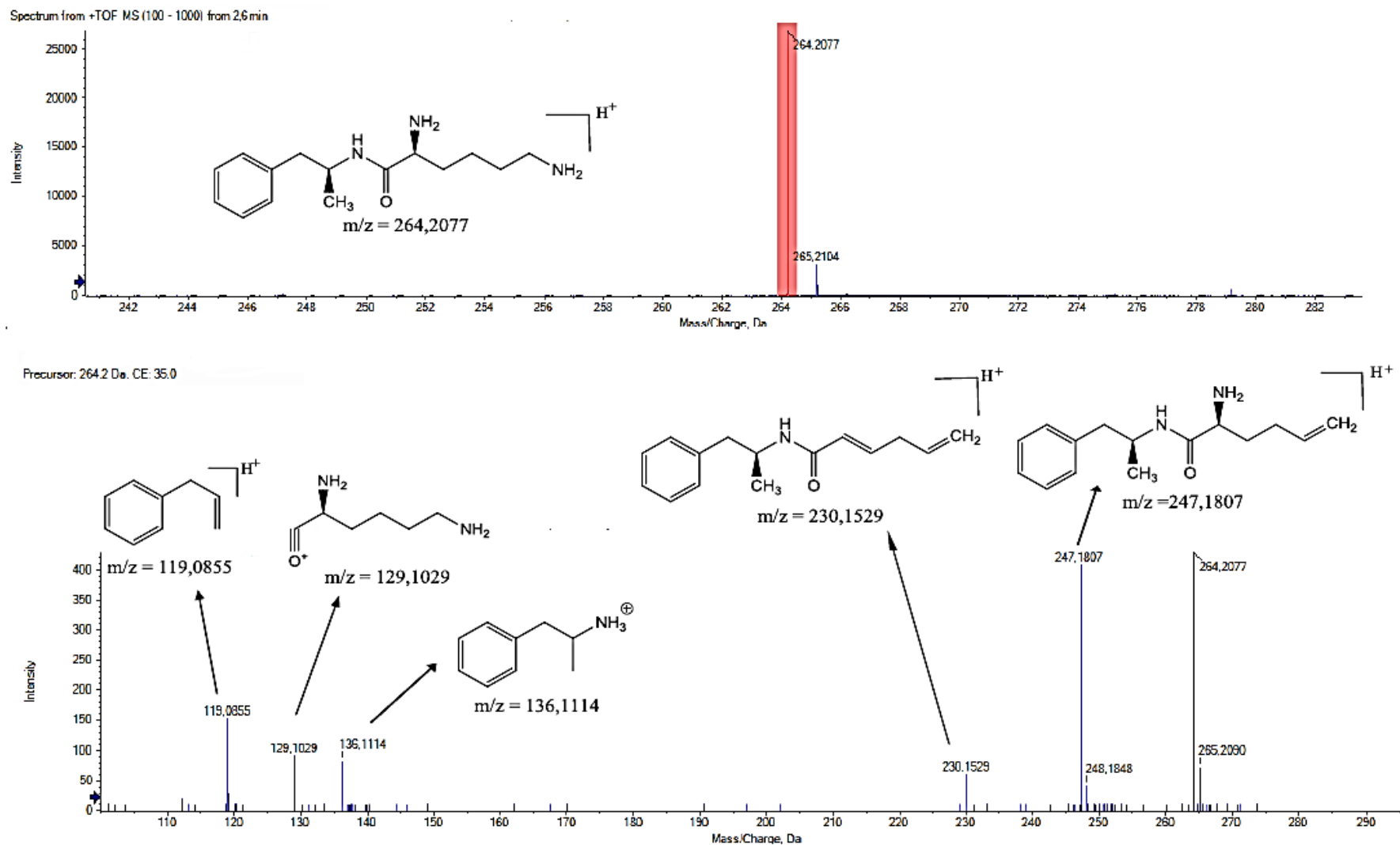
Tabela 6. Interpretação do espectro de Q-ATV de LDX candidato à SQR.

Experimento	Massa encontrada para o íon (m/z)	Composto sugerido (íon)	Massa teórica (m/z)	Erro (ppm)	DBE
Q-ATV	264,2077	[LDX + H] ⁺ C ₁₅ H ₂₆ N ₃ O	264,2070	2,6	5
<i>product-ion</i>	247,1807	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O	247,1805	0,8	6
<i>product-ion</i>	230,1529	C ₁₅ H ₂₀ NO	230,1539	-4,3	7
<i>product-ion</i>	136,1114	C ₉ H ₁₄ N	136,1121	-5,1	4
<i>product-ion</i>	129,1029	C ₆ H ₁₃ N ₂ O	129,1022	5,4	2
<i>product-ion</i>	119,0855	C ₉ H ₁₁	119,0855	0	5

DBE: double bound equivalent (número de insaturações e anéis).

CAPÍTULO I

Figura 7. Espectro de Q-ATV de LDX candidato à SQR e elucidação dos seus fragmentos mais abundantes.



4.3.2 Ensaio de pureza da SQR

A definição de doseamento (assay) segundo o guia do ICH é a seguinte: "Doseamento: aquele que fornece um resultado exato na qual permite uma declaração exata do conteúdo ou potência do analito na amostra" (ICH, 2005).

A escolha dos métodos analíticos a serem empregados na análise de uma substância química de referência deve ser considerada em relação ao uso pretendido (WHO, 1999). A Farmacopeia Americana (USP) apresenta três abordagens para avaliar a pureza de um candidato a material de referência: (I) análise de grupo funcional, por exemplo, titulação, que é um método exato e preciso, não necessita de padrão, mas é um método não seletivo; (II) ensaio frente a outro padrão, considerado método seletivo; (III) balanço de massas, apresenta uma baixa porcentagem de erro e pode ser utilizado quando a SQR não está disponível (WILLIAMS, 2006).

O método mais comumente empregado para avaliar a pureza das SQR pela USP é o balanço de massas (WILLIAMS, 2006). A Farmacopeia Internacional e a Farmacopeia Europeia também tem adotado o balanço de massas para o estabelecimento de SQR e a Organização Mundial da Saúde (WHO) tem recomendado seu uso em suas guias (LIU e HU, 2007; MA et al., 2009). Em função disto, esta metodologia foi escolhida para avaliar a pureza de LDX candidato à SQR.

O balanço de massa é um processo indireto para a atribuição de pureza por determinação do peso (%) de todas as espécies não relacionadas, tais como os solventes residuais, materiais inorgânicos, água e impurezas orgânicas (HUANG, 2014). O método de balanço de massa é determinado subtraindo a soma de todas as impurezas (voláteis, orgânicas e inorgânicas) de 100%. A CLAE acoplada a detectores de ultravioleta (UV) e aerossol carregado (DAC) permite determinar as impurezas orgânicas utilizando o método de normalização de áreas. Neste caso, considera-se a soma das áreas do fármaco e das impurezas igual a 100 %. As impurezas voláteis como umidade e solventes residuais são determinados através da técnica de perda por dessecação, quando possível, ou titulação de água (Karl-Fischer) e cromatografia gasosa para os solventes residuais. As impurezas

inorgânicas são quantificadas pela técnica de resíduo de ignição (cinzas sulfatadas) (GÖRÖG, 2008; LIU e HU, 2007; MA et al., 2009).

4.3.2.1 Determinação de resíduo de ignição (cinzas sulfatadas)

Cinzas sulfatadas correspondem ao resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico. O ensaio tem por objetivo determinar o teor de impurezas inorgânicas presentes em substâncias orgânicas (FB 5, 2010).

4.3.2.1.1 Materiais e métodos

Pesou-se exatamente cerca de 0,2 g de amostra de LDX candidato à SQR, previamente dessecada, em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico e aqueceu-se em bico de Bunsen até completa carbonização. Esfriou-se e adicionou-se mais 1 mL de ácido sulfúrico para umedecer o resíduo, e aqueceu-se em bico de Bunsen até completa carbonização. Em seguida, incinerou-se em forno de mufla a 600 °C por 3 h. O cadinho foi colocado em dessecador para esfriar, pesou-se e incinerou-se em forno de mufla a 600 °C por mais 30 min até verificar peso constante.

4.3.2.1.2 Resultados e discussão

A técnica utilizada foi a descrita na Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (FB 5), com modificação da quantidade utilizada em função da quantidade de SQR disponível para a realização do teste.

O valor encontrado de substâncias inorgânicas presente em LDX candidato à SQR foi de 0,2 %. Considerando que o LDX não possui monografia em compêndio oficial e que é um derivado anfetamínico, comparou-se a porcentagem encontrada para LDX candidato à SQR com o valor especificado de cinzas sulfatadas para

sulfato de anfetamina, segundo a USP 34 (2011), que estipula um máximo de 0,2 % em relação à substância dessecada. Pode-se assim sugerir que a amostra de LDX candidato à SQR apresenta um teor de substâncias inorgânicas aceitável.

4.3.2.2 Perda por dessecação

O ensaio de perda por dessecação tem por objetivo determinar a quantidade de substâncias voláteis de qualquer natureza (FB 5, 2010).

4.3.2.2.1 Materiais e métodos

Pesou-se, exatamente, cerca de 0,3 g de LDX candidato à SQR em pesa-filtro previamente dessecado (30 min em estufa a 105 °C) e pesado. Colocou-se o pesa-filtro contendo a amostra na estufa a 105 °C até peso constante. Após resfriamento em dessecador, o mesmo foi pesado.

4.3.2.2.2 Resultados e discussão

A técnica utilizada foi a descrita na FB 5, com modificação da massa pesada em função da quantidade de SQR disponível para a realização do teste.

O teor de umidade encontrado para LDX candidato à SQR foi de 0,06 %. Quando este resultado foi comparado com a especificação do sulfato de anfetamina, observou-se que o teor de compostos voláteis da LDX candidato à SQR está abaixo da faixa especificada pela USP 34 (2011), que é de no máximo 1,0 %.

4.3.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-DAC)

A CLAE acoplada aos detectores de UV e DAC foi utilizada para determinar as impurezas orgânicas.

4.3.2.3.1 Materiais e métodos

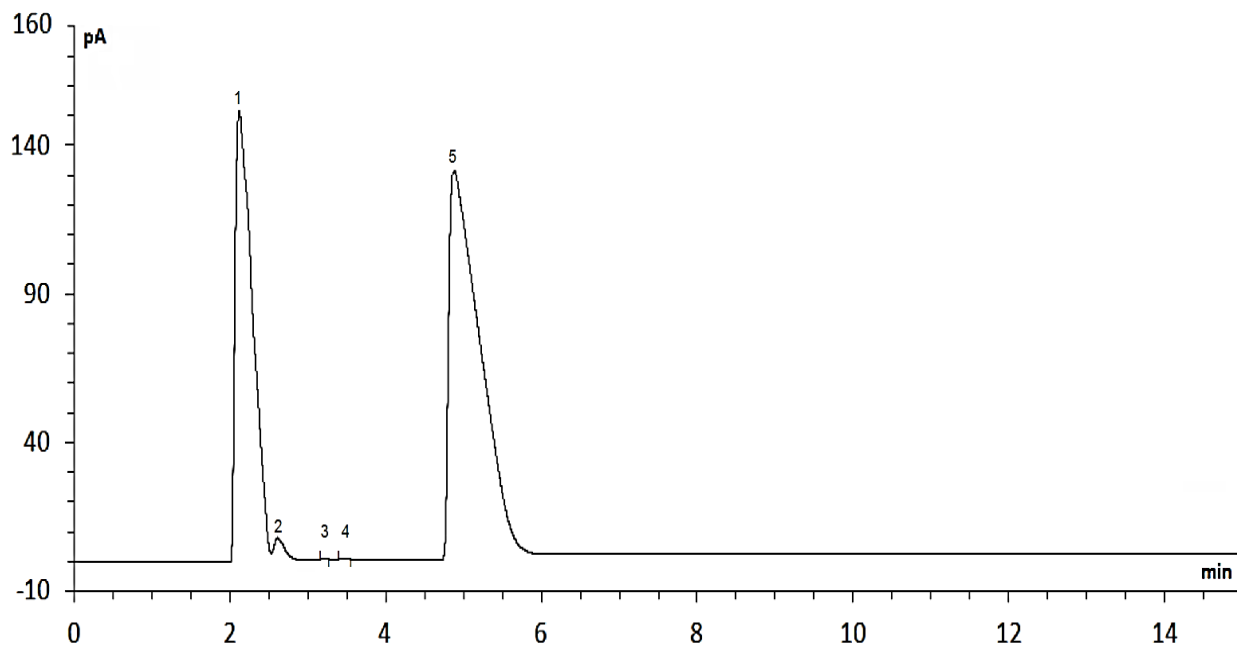
Um cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japan), equipado com bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10AVP, detector UV SPD-10A, detector DAC, ESA Bioscience, Inc. (Chelmsford, MA, USA) e injetor manual RHEODYNE, 7725i, com loop de 20 μ L foi utilizado na realização das análises. A aquisição e análise de dados foram realizadas através do software Chromeleon 6.8 (Dionex Corporation).

As análises foram realizadas utilizando uma coluna Zorbax CN, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m (Agilent Technologies, USA), em modo de eluição isocrático constituído por formato de amônio 20 mM pH 4,0 e acetonitrila (50:50, v/v), fluxo de 1,0 mL/min a temperatura ambiente. Foram realizadas injeções de 20 μ l de uma solução contendo 1 mg/mL de LDX candidato à SQR diluída em metanol, com tempo de corrida de 3 vezes o tempo de retenção de LDX (15 minutos). O comprimento de onda fixado para o detector UV foi 207 nm.

4.3.2.3.2 Resultados e discussão

A Figura 8 mostra o cromatograma obtido por CLAE-DAC para a amostra de LDX candidato à SQR e as duas impurezas presentes identificadas como (1) e (2), com tempos de retenção de 3,20 min e 3,48 min, respectivamente. O cálculo das impurezas orgânicas foi realizado utilizando a normalização das áreas e o valor encontrado foi de 0,18 %. Os picos em 2,12 min e 2,61 min referem-se ao dimesilato e ao diluente da amostra (metanol), respectivamente. O cromatograma obtido por CLAE-UV não mostrou a presença de impurezas.

Figura 8. Cromatograma obtido para LDX candidato à SQR e impurezas por CLAE-DAC usando coluna CN e fase móvel formato de amônio 20 mM pH 4,0 e acetonitrila (50:50, v/v). (1) Dimesilato; (2) Metanol; (3) e (4) Impurezas; (5) Lisdexanfetamina.



4.3.2.4 Cálculo da pureza de LDX SQR

4.3.2.4.1 Materiais e métodos

O cálculo da pureza da amostra pelo método de balanço de massas foi determinado subtraindo a soma de todas as impurezas (voláteis, orgânicas e inorgânicas) de 100%, de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Teor (\%)} = 100 - \sum \% \text{ impurezas}$$

$$= 100 - \% \text{ impurezas voláteis} - \% \text{ impurezas inorgânicas} - \% \text{ impurezas orgânicas}$$

Equação 4.1

4.3.2.4.2 Resultados e discussão

Na Tabela 7 estão descritas as impurezas e os valores encontrados, de acordo com os itens 4.3.2.1, 4.3.2. 2, 4.3.2.3. O valor encontrado para a pureza de LDX candidato à SQR foi de 99,56 %.

Tabela 7. Teor de LDX candidato à SQR por balanço de massas.

Impurezas	%
Impurezas orgânicas	0,18
Impurezas inorgânicas	0,20
Impurezas voláteis	0,06
Teor LDX SQR	99,56

4.3 Identificação da forma farmacêutica

A identificação de LDX na forma farmacêutica foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV e CLAE-DAC) e espectroscopia na região do ultravioleta (UV).

LDX cápsulas 70 mg, com nome comercial Venvanse[®], de lote 3099752A e validade 05/2014 foram adquiridas em farmácia do comércio local. A composição das cápsulas está descrita no item 4.2.1.

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

O método anteriormente descrito para avaliação de impurezas orgânicas por CLAE-UV-DAC (item 4.3.2.1.3) foi utilizado para identificar LDX na forma farmacêutica cápsula.

4.4.1.1 Materiais e métodos

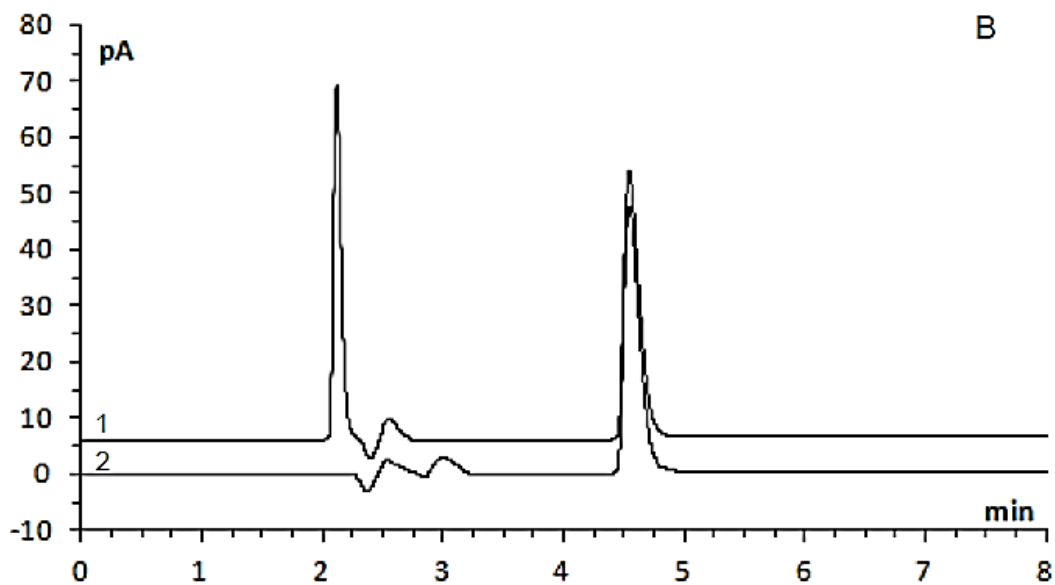
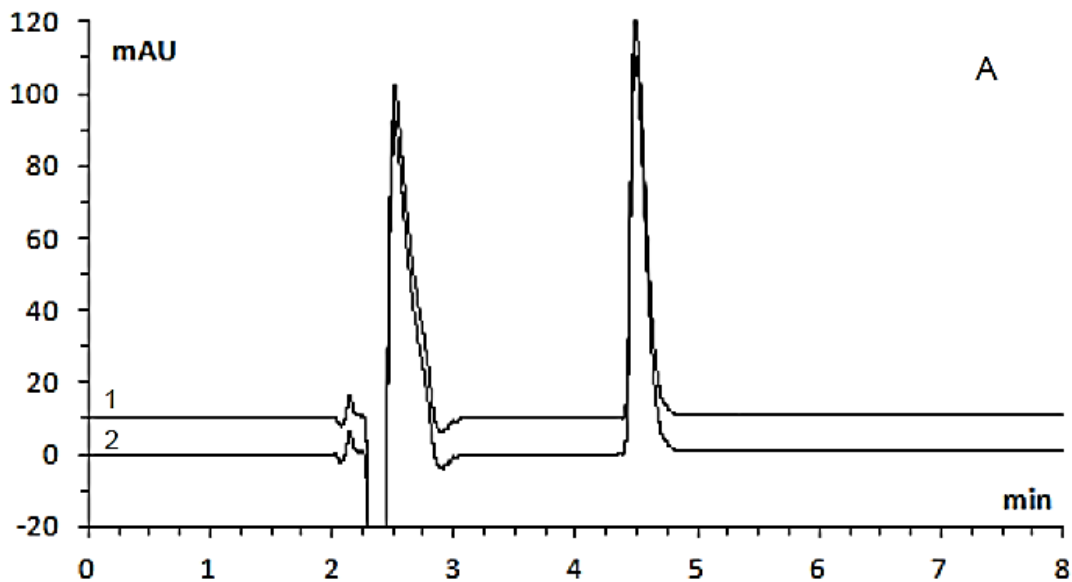
Com relação ao método anteriormente descrito, neste ensaio foi utilizada uma solução contendo o equivalente a 100 µg/mL de LDX, preparada a partir das cápsulas.

A identificação foi realizada através do seu tempo de retenção, comparando-se os tempos de retenção da SQR e solução amostra.

4.4.1.2 Resultados e discussão

Conforme pode ser visto na Figura 9, pode-se verificar que LDX cápsula apresentou o tempo de retenção similar ao da solução SQR nos dois métodos CLAE-UV e CLAE-DAC, confirmando a identidade de LDX presente na forma farmacêutica cápsula.

Figura 9. Cromatogramas obtidos para LDX candidato à SQR. Condições cromatográficas: coluna CN e fase móvel formato de amônio 20 mM, pH 4,0 e acetonitrila (50:50, v/v). (A) CLAE-UV; (B) CLAE-DAC; 1 – LDX SQR; 2 – LDX cápsula.



4.4.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

4.4.2.1 Materiais e métodos

As análises espectroscópicas foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu UV-2600 UV-Vis utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de percurso óptico e as leituras foram realizadas entre 200 e 400 nm. A aquisição e análise de dados foram realizadas através do software UV Probe, versão 2.42.

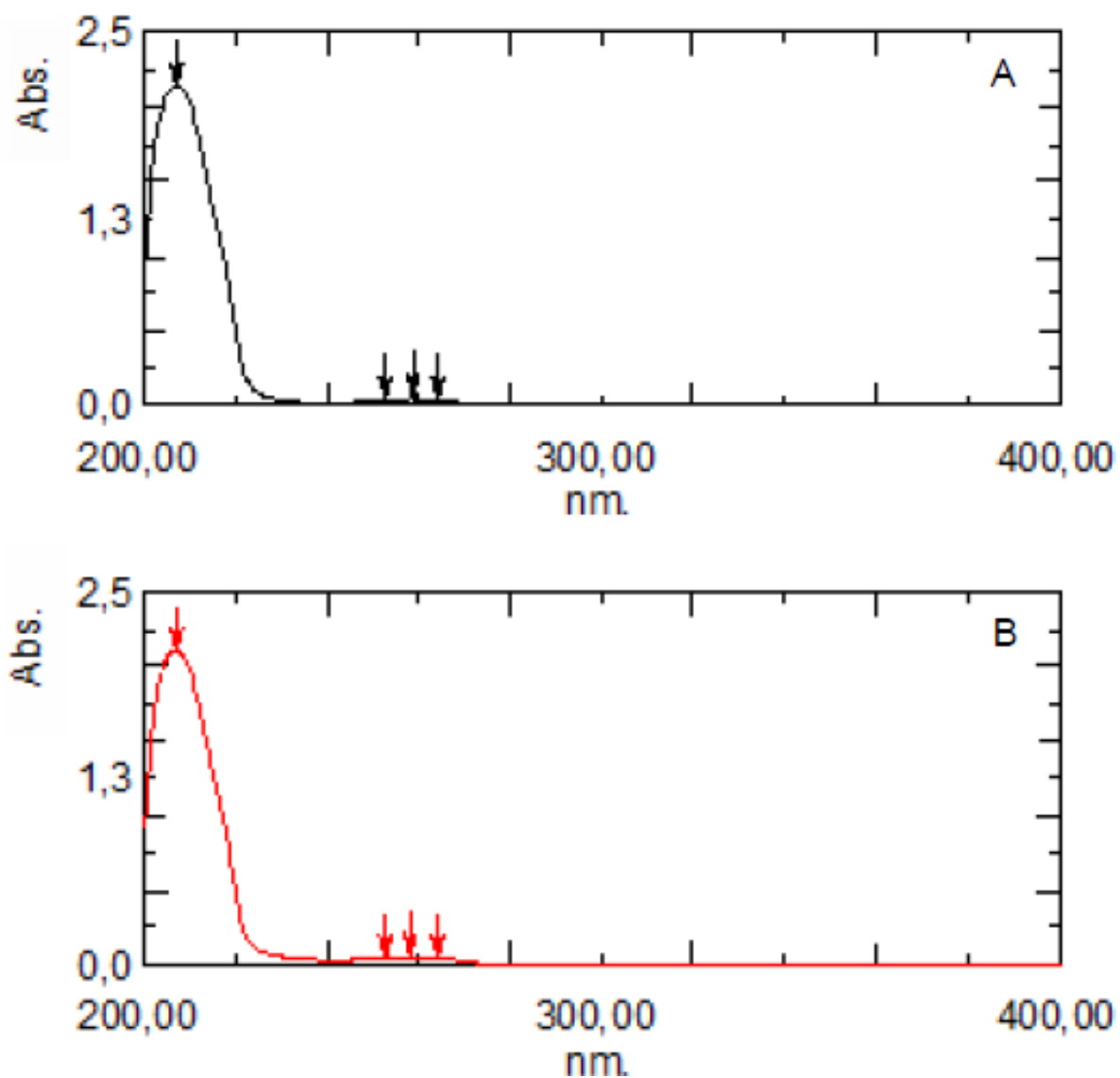
Foram obtidos os espectros de absorção molecular na região do UV da solução SQR e da solução amostra de LDX, na concentração de 100 µg/mL diluídas em metanol. Utilizou-se metanol como branco. A solução amostra foi filtrada em filtro de 0,45 µm após a primeira diluição.

4.4.2.2 Resultados e discussão

Os espectros obtidos para a solução SQR e a solução amostra estão apresentados na Figura 10. A forma farmacêutica apresentou perfil de absorção semelhante ao da SRQ e ambas as soluções apresentaram os máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda. As soluções apresentaram máximos de absorção em 264 nm, 258 nm, 253 nm e 207 nm ($\lambda_{\text{máx}}$).

Pode-se concluir que a espectroscopia na região do UV é útil para avaliar a identidade de LDX presente na forma farmacêutica cápsula, pois permitiu a confirmação da sua identidade.

Figura 10. Espectros na região do UV da solução SQR (A) e da solução amostra LDX cápsula (B).



4.5 Conclusões

A identificação de LDX SQR foi realizada por espectrometria nas regiões do IV, RMN e EM, sendo possível confirmar a identidade da amostra.

Segundo a WHO (2006), as SQR utilizadas em doseamento devem possuir um alto grau de pureza e determina como um princípio orientador que um grau de pureza de 99,5% ou superior é desejável, calculado como base anidra. A pureza de LDX SQR determinada pelo método de balanço de massas foi de 99,56% e pode ser considerada satisfatória de acordo com a WHO.

Após as análises de caracterização de LDX candidato à SQR através de um conjunto de testes de identificação e de determinação do teor, pode-se considerar que os resultados obtidos são adequados aos objetivos pretendidos e permitem o emprego de LDX como SQR.

A identificação do fármaco na forma farmacêutica foi assegurada através da realização das análises por espectroscopia na região do UV e por CLAE.

4.6 Referências

BALCI, M. **Basic ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopy**. 1st ed. Hardbound: Elsevier Science, 2005, 430 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344 de 12 de maio de 1998. Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 1998.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman Spectroscopy**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1990, p. 343, 375.

FB 5. FARMACOPEIA BRASILEIRA 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 247-253, 2008.

HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B. editors. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2008, 528 p.

HARWOOD, L. M.; MOODY, C. J.; PERCY, J. M. **Experimental Organic Chemistry: Standard and Microscale**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 1999, p.131.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopic Methods in Organic Chemistry**. 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 2008. cap. 2, p. 33-68.

HUANG, Y.; SU, B-N.; YE Q.; PALANISWAMY, V.A.; BOLGAR, M.S.; RAGLIONE, T.V. Improving the efficiency of quantitative (¹H) NMR: an innovative external standard–internal reference approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 1-6, 2014.

ICH (International Conference on Harmonization). Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

LIU, S.; HU, C. Q. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 602, n. 1, p. 114–121, 2007.

MA, K.; WANG, H.; ZHAO, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, n. 2, p. 227–233, 2009.

MARGARETA, A., MATEESCU, G.D. **Infrared Spectroscopy: applications in organic chemistry**. 99 ed. New York: Wiley-Interscience, 1972. 527 p.

MARQUES, J. A.; BORGES, C. P. F. **Práticas de Química Orgânica**, 2. ed. Campinas: Átomo, 2012, 71-79 p.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques: A microscale approach**. 4th ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007, Part 6, p. 647-668.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S.C. (eds) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5th ed. Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2006. p.133, 212, 430.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SMITH, R.M. **Understanding Mass Spectra: A Basic Approach**. 2nd ed. Wiley-Interscience: New Jersey, 2004. p. 1, 13.

TRALDI, P.; MAGNO, F.; LAVAGNINI, I.; SERAGLIA, R.; **Quantitative Applications of Mass Spectrometry**. 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006, p. 1

USP 34. The United States Pharmacopeia. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.

CAPÍTULO I

URSINI, C. V. Ressonância Magnética Nuclear de Platina-195 em Compostos Organometálicos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 72–82, 1997.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2nd ed. rev. London: Churchill Livingstone, 2005. 382 p.

WHO (World Health Organization). General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances. WHO Technical Report Series, n. 943, Part A, 2006, 65 p.

WHO (World Health Organization). Reference Substances and Infrared Reference Spectra for Pharmacopoeial Analysis. WHO Technical Report Series, n. 885, Part A, 1999.

WILLIAMS, R. L. Official USP Reference Standards: metrology concepts, overview, and scientific issues and opportunities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 40, n. 1, p. 3-15, 2006.

5 CAPÍTULO II – ARTIGO 1

Development, validation and comparison of two stability-indicating RP-LC methods using charged aerosol and UV detectors for analysis of lisdexamfetamine dimesylate in capsules

Artigo submetido ao Journal of Chromatography A

Development, validation and comparison of two stability-indicating RP-LC methods using charged aerosol and UV detectors for analysis of lisdexamfetamine dimesylate in capsules

Graciela Carlos^a, Eloisa Comiran^a, Renata Pereira Limberger^a, Ana Maria Bergold^a, Pedro Eduardo Froehlich^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author. Tel./fax: +55 51 33085313
E-mail address: gracielacarlos@ig.com.br (G. Carlos)

Abstract

Two new stability-indicating liquid chromatographic methods using two detectors, an ultraviolet (UV) and a charged aerosol detector (CAD) simultaneously connected in series were validated for the assessment of lisdexamfetamine dimesylate (LDX) in capsule. The method was optimized and the influence of individual parameters on UV and CAD response and sensitivity was studied. Chromatography was performed on a Zorbax CN column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) in an isocratic elution mode, using acetonitrile and 20 mM ammonium formate at pH 4.0 (50:50, v/v) as mobile phase and UV detection at 207 nm. The developed method was validated according to ICH guidelines and the parameters specificity, limit of detection, limit of quantitation, linearity, accuracy, precision and robustness were evaluated. CAD is designated to be a non-linear detector in a wide dynamic range, however, the method was linear over the concentration range of 70-130 μ g mL⁻¹ in both detectors. The method was precise and accurate. Robustness study was performed by a Plackett–Burman design, delivering results within the acceptable range. Neither the excipients nor the degradation products showed interference in the method after studies of specificity as well as under stress conditions. The results of the LC-UV and LC-CAD methods were statistical compared through ANOVA and showed no significant difference ($p > 0.05$). Both proposed methods could be considered interchangeable and stability-indicating, and can be applied as an appropriate quality control tool for routine analysis of LDX in capsule.

Keywords: lisdexamfetamine dimesylate, stability-indicating, liquid chromatography, charged aerosol detector, stress testing, Plackett–Burman

6 CAPÍTULO III – ARTIGO 2

Validation of a simple and sensitive stability-indicating LC-MS method for determination of LDX dosage form.

Artigo a ser submetido à publicação.

**Validation of a simple and sensitive stability-indicating LC-MS method for
determination of LDX dosage form**

**Graciela Carlos^a, Eloisa Comiran^a, Renata Pereira Limberger^a, Pedro Eduardo
Froehlich^a**

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal
University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author. Tel./fax: +55 51 33085313
E-mail address: graciela-carlos@ig.com.br (G. Carlos)

Abstract

A simple and sensitive stability-indicating LC-MS analytical method was developed and validated for determination of LDX 70 mg capsule. Assays were performed on an Agilent HPLC system using a Zorbax CN column and isocratic elution with acetonitrile and ammonium acetate, 20 mM, pH 4.0, at a flow rate of 1 mL min⁻¹. A quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization interface, operated in the positive mode was utilized as detector. The method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy, LOD, LOQ and robustness according ICH guideline. Calibration curve was linear over the concentration range of 70-130 ng ml⁻¹ with correlation coefficient of 0.9999. The accuracy (recovery) of the proposed method was 101.36% ± 0.50 and intra- and inter-day relative standard deviations were less than 2%. Validation showed that LC-MS method developed provide the necessary sensitivity, linearity, precision, accuracy and specificity for determination of LDX in capsules. Neither excipients nor degradation products produced as a result of stress studies interfered with detection and analysis of lisdexamfetamine dimesylate, thus this method could be considered stability indicating. LC-MS method was compared with UV and CAD RP-LC methods previously validated and there is equivalence in quantification between the methods.

Keywords: lisdexamfetamine dimesylate, stability-indicating, liquid chromatography, mass spectrometry, stress testing, validation.

.

7 CAPÍTULO IV – ARTIGO 3

Photodegradation kinetics of lisdexamfetamine dimesylate and structure elucidation of degradation products by LC-ESI-QTOF.

Artigo a ser submetido à publicação.

Photodegradation kinetics of lisdexamfetamine dimesylate and structure elucidation of degradation products by LC-ESI-QTOF.

Graciela Carlos^a, Jéferson Segalin^b, Louise Jank^c, Eloisa Comiran^a, Pedro Eduardo Froehlich^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

^b INMETRO, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c LANAGRO, Laboratório Nacional Agropecuário/RS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author. Tel./fax: +55 51 33085313

E-mail address: graciela-carlos@ig.com.br (G. Carlos)

Abstract

Pharmaceutical compounds and metabolites are being found in aquatic environment and there is the need for studies of photochemical degradation of contaminants in surface waters as manner as treatment or removal of trace amounts of active pharmaceutical ingredients (APIs). Photodegradation of lisdexamfetamine (LDX) in aqueous solution was investigated. It was carried out through the exposure of the drug in solution to UV radiation in different periods of time during 48 h. Fragmentation pattern of LDX was established and two degradation products were identified (DP-01 e DP-02) and structurally characterized by liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight electrospray ionization (LC-ESI-QTOF). Photodegradation kinetics of LDX was determined by liquid chromatography (LC) coupled to charged aerosol detector (CAD) ($r = 0.9960$; $k = 0.0234 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2} = 29.67 \text{ h}$) and LC-ESI-QTOF ($r = 0.9905$; $k = 0.0204 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2} = 33.91 \text{ h}$). LDX was found to be unstable to light exposure under the evaluated conditions and photochemistry studies allowed predicting the behavior and environmental persistence of this compound in surface waters or as an option in wastewater treatment.

Keywords: lisdexamfetamine dimesylate, photochemistry, degradation kinetics, environmental fate, QTOF, structure elucidation

8 CAPÍTULO V – ARTIGO 4

Assessment of lisdexamfetamine dimesylate stability and identification of its major degradation product by NMR spectroscopy.

Artigo a ser submetido à publicação.

Assessment of lisdexamfetamine dimesylate stability and identification of its major degradation product by NMR spectroscopy

Graciela Carlos^a, Alvicler Magalhães^b, Ana Cristina Isler^b, Eloisa Comiran^a, Pedro Eduardo Froehlich^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author. Tel./fax: +55 51 33085313
E-mail address: gracielacarlos@ig.com.br (G. Carlos)

Abstract

Lisdexamfetamine dimesylate (LDX), a long-acting prodrug stimulant indicated for the treatment of the attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), was subjected to forced degradation studies by acid and alkaline hydrolysis and the degradation profile was studied. To obtain between 10-30% of degraded product, acid and alkaline conditions were assessed with solutions of 0.01 M, 0.1 M, 0.5 M and 1 M of DCI and NaOD and these solutions were analyzed through NMR spectra ^1H , ^{13}C , HSQC and HMBC. LDX was submitted to acid and alkaline hydrolysis 1 M (4 + 12 h) and this hydrolysis stress condition allowed the identification of one degradation product, a diastereoisomer of LDX: (2*R*)-2,6-diamino-*N*-[(2*S*)-1-phenylpropan-2-yl] hexanamide. Acid and alkaline hydrolysis produced, respectively, 17.75% and 22.91% of the (RS)-isomer of LDX.

Keywords: lisdexamfetamine dimesylate, structure elucidation, NMR, stress testing, degradation products

9 DISCUSSÃO GERAL

O dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) é um pró-fármaco estimulante da classe das anfetaminas, de longa duração e com menor risco de potencial de abuso e é indicado no tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) (MICKLE et al., 2006).

As análises qualitativas e quantitativas do princípio ativo, presente no medicamento, são consideradas análises farmacêuticas fundamentais para garantir a administração do medicamento de uma maneira segura e eficaz. Estas determinações requerem uma alta exatidão, precisão e confiabilidade dos dados durante a produção, avaliação da estabilidade e previsão do prazo de validade (OHANNESIAN e STREETER, 2001). LDX não apresenta monografia nos Códigos Oficiais, logo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a forma farmacêutica cápsula e estudos preliminares da estabilidade através de estudos de degradação forçada visaram fornecer dados não disponíveis na literatura e constituiu-se parte importante dos objetivos gerais deste trabalho.

Para o desenvolvimento de um método analítico confiável é necessária a utilização de substâncias químicas de referência (SQR), por isso o grau de pureza da SQR deve ser elevado e exato (WHO, 2006). Pela dificuldade de obtenção de um padrão farmacopeico ou, neste caso, de uma SQR não compendial, a SQR de LDX foi obtida em nosso laboratório através da purificação da forma farmacêutica.

A caracterização de LDX candidato à SQR foi realizada por IV, RMN de hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C) e de correlação (HMBC e HSQC) e CL-Q-ATV. Estas técnicas permitiram a identificação de LDX na amostra candidata à SQR de forma bastante exata e precisa. O balanço de massas é o método mais comumente empregado para avaliar a pureza das SQR pela USP (WILLIAMS, 2006), também é utilizado pela Farmacopeia Internacional e a Farmacopeia Europeia e é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) em seus guias (LIU e HU, 2007; MA et al., 2009). A pureza de LDX candidato à SQR determinada pelo método de balanço de massas foi de 99,56% e pôde ser considerado satisfatório de acordo com a WHO (2006), pois esta determina um grau de pureza de 99,5% ou superior, calculado como base anidra. Os resultados obtidos na caracterização da amostra

são adequados aos objetivos pretendidos e permitiram o emprego desta amostra de LDX como SQR no desenvolvimento dos métodos analíticos para determinação de LDX na forma farmacêutica e nos estudos preliminares de estabilidade.

A identificação de LDX na forma farmacêutica cápsula foi realizada através das análises por espectroscopia na região do UV e por CLAE acoplada aos detectores UV e DAC, baseando-se na comparação dos resultados obtidos com a SQR.

O desenvolvimento de métodos analíticos deve ter em consideração a sua aplicabilidade, a qualidade nos dados medidos e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos (RIBEIRO et al., 2008; ZONEN et al., 1999). Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado (RIBANI et al., 2004). Segundo ICH (2005), o objetivo do procedimento de validação é demonstrar que ele é adequado para o uso pretendido.

Um dos objetivos deste estudo foi desenvolver e validar métodos por cromatografia líquida acoplado a detectores ultravioleta, aerosol carregado e espectroscopia de massas para determinação quantitativa de LDX na forma farmacêutica cápsula.

Os três detectores, UV, DAC e EM, foram escolhidos para a validação de LDX cápsula devido às suas diferentes características. O detector UV possui alta sensibilidade, ampla faixa de linearidade, baixo custo, facilidade de utilização e é compatível com a maioria dos solventes utilizados como fase móvel (VERVOORT et al., 2008). O detector DAC apresenta alta sensibilidade, boa precisão e não necessita que o analito apresente cromóforo, pois a resposta independente das características químicas da molécula, sendo considerado um detector universal. (VEHOVEC e OBREZA, 2010). A EM é um método altamente específico e sensível para a determinação quantitativa do fármaco na matéria-prima ou na forma farmacêutica e para confirmação da identidade ou da estrutura do fármaco (WATSON, 2005).

Os métodos, CL-UV, CL-DAC e CL-EM, desenvolvidos e validados para a quantificação de LDX cápsula demonstraram-se específicos, lineares, exatos, precisos e robustos. Os três métodos podem ser considerados indicativos de estabilidade, pois apresentaram a capacidade de determinar o fármaco frente aos produtos de degradação obtidos por estudos de degradação forçada. Através de análise estatística (ANOVA) pode-se verificar que os métodos são intercambiáveis para o objetivo pretendido. O método CL-EM se mostrou mil vezes mais sensível que os métodos CL-UV e CL-DAC e isto se deve ao fato de que a espectroscopia de massas apresenta-se como uma técnica bastante específica, boa seletividade e com um bom limite de detecção com relação às outras técnicas (LAVAGNINI, 2006). A comparação dos resultados das validações para os três métodos propostos pode ser visualizada na tabela 8.

Tabela 8. Resultados comparativos da validação dos métodos por LC-UV, LC-DAC e LC-MS.

Parâmetro	Método		
	LC-UV	LC-DAC	LC-MS
Especificidade	Sim	Sim	Sim
Linearidade	70-130 µg/mL (r = 0,9999)	70-130 µg/mL (r = 0,9997)	70-130 ng/mL (r = 0,9999)
Precisão	0,39%	0,47%	0,10%
Exatidão	100,39 ± 0,39%	100,50 ± 0,93%	101,36 ± 0,50%
Robustez	Sim	Sim	Sim

A avaliação da estabilidade pode ser realizada pelos ensaios de degradação forçada ou stress teste, onde são utilizadas condições mais severas de temperatura, umidade, oxidação e ampla faixa de pH (ICH, 2003; BRASIL, 2013). Os estudos de degradação forçada podem ser úteis para auxiliar na identificação dos produtos de

degradação, estabelecer os mecanismos de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula e ajudar no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (ICH, 2003).

Nos estudos de degradação forçada realizados, as amostras contendo LDX foram submetidas à degradação térmica, oxidativa, fotólise, hidrólise ácida e básica. Avaliando-se os resultados obtidos foi possível verificar que o fármaco LDX é estável à maioria das condições testadas. A degradação do fármaco somente ocorre em condições mais drásticas, quando as condições experimentadas foram acrescidas de calor. Porém, somente o calor não foi suficiente para degradar LDX.

Quando LDX foi submetida à fotólise, LDX se mostrou estável à luz UV-A (352 nm), pois não houve degradação após 24 h de exposição. Sob a incidência da luz UV-C (254 nm) observa-se uma extensão de degradação em torno de 22% após 8 h de exposição e 3 picos de degradação são visualizados, mostrando que LDX é sensível à luz UV-C.

Produtos farmacêuticos são considerados uma classe emergente de contaminantes aquáticos que têm sido cada vez mais detectados em amostras de campo, como em efluentes líquidos, em águas de superfície, água do mar, água subterrânea e água potável (BOREEN et al., 2003; KÜMMERER, 2010). A principal preocupação em relação a produtos farmacêuticos como poluentes é a sua toxicidade potencial em ecossistemas aquáticos, principalmente porque seus efeitos não são conhecidos (CHRISTENSEN, 1998; JONES et al., 2001; TERNES, 1998). As fontes, ocorrência, destino, os efeitos e os riscos de produtos farmacêuticos no ambiente são questões de importância crescente (KNAPP et al., 2005; KÜMMERER, 2010). Degradação fotoquímica pode ser considerada a principal via de degradação desses compostos nas águas de superfície e pode ser um fator central na determinação do destino ambiental de fármacos e assim, reduzir o seu potencial de impacto na saúde humana e na vida aquática (SIRTORI, 2010).

Para compreender o destino do fármaco LDX como contaminante, a realização da cinética de fotodegradação foi escolhida para obter conhecimento dos

mecanismos pelos quais este composto é degradado, incluindo a velocidade à qual é transformado, bem como as estruturas dos produtos produzidos.

O estudo da cinética de fotodegradação do fármaco foi realizado em solução aquosa porque solventes orgânicos, principalmente metanol são foto catalisadores e podem aumentar a extensão da degradação em função da produção de radicais metoxi (ALSANTE et al, 2007; PAZ, 2006).

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que LDX apresenta cinética de primeira ordem nas condições empregadas. Os primeiros sinais de degradação ocorrem após 2 h de exposição à luz UV-C, com uma extensão da degradação em torno de 5% e após 48 h de exposição, 68% de LDX foi degradado, quando as amostras foram analisadas por CL-DAC e 62% quando analisadas por CL-Q-ATV.

A espectroscopia de massas é uma ferramenta fundamental na determinação da pureza do fármaco, na identificação de impurezas, tais como subprodutos gerados na síntese ou produtos da degradação forçada (ANTONOVICH & KELLER, 2002; GILLESPIE & WINGER, 2011). Um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo analisador de tempo de voo (CL-Q-ATV) foi utilizado para obter informações sobre a fórmula molecular dos produtos de degradação de LDX. Dentre os produtos de degradação formados, dois foram identificados (DP-01 e DP-02). O primeiro produto de degradação (PD-01) apresentou íon molecular de m/z 280.2021, com uma fórmula molecular definida como $C_{15}H_{26}N_3O_2$ e o segundo produto de degradação (PD-02) apresentou íon molecular de m/z 282.2185, com uma fórmula molecular definida como $C_{15}H_{28}N_3O_2$. PD-01 e PD-02 apresentaram concentrações muito menores do que a extensão de degradação observada em LDX, sugerindo que, ou eles são produtos intermediários da reação de decomposição ou de processos mais complexos ou há formação de produtos de degradação com íons moleculares com m/z inferior a 100, limite de varredura de massa utilizada.

LDX foi submetida à hidrólise ácida e alcalina em diferentes condições para avaliação da especificidade dos métodos cromatográficos LC-UV, LC-CAD e LC-MS,

a fim de determinar se eram métodos indicativos de estabilidade. Ácido fórmico e hidróxido de amônio foram utilizados, em vez do convencional ácido clorídrico e hidróxido de sódio porque os detectores DAC e MS exigem tampões voláteis na fase móvel. A degradação foi verificada apenas após utilização de calor como catalisador da reação. Após submeter LDX à condição de 1 M de ácido fórmico e 1 M de hidróxido de amônio, em banho de silicone à 100 °C, sob refluxo, por 3 horas foi observado 5% de degradação, mas não foram observados produtos de degradação.

Os testes de estresse de LDX foram também avaliados utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio, porém as amostras foram analisadas por RMN. Após estudos de degradação forçada, a OMS recomenda obter uma extensão da degradação do fármaco na faixa de 10-30%, a fim de não formar produtos secundários (WHO, 2005). Com vistas ao exposto acima, LDX foi submetido a diferentes condições de degradação até que a extensão de degradação recomendada pela OMS fosse alcançada. As condições ácida e alcalina foram avaliadas usando 0,01 M; 0,1 M; 0,5 M e 1 M de DCI e NaOD. Após análise das amostras por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC foi possível identificar um PD, um diastereoisômero de LDX: dimetanosulfonato de (2R)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-metil-2-feniletil] hexanamida. O PD apresenta uma mudança na estereoquímica do centro quiral do carbono 5 de S para R. Esta mudança na estereoquímica é uma reação típica de aminoácidos em meio aquoso e é catalisada pela presença de ácido ou base (CLAYDEN et al., 2012). Esta reação é justificada na molécula de LDX, que é formada pela união de *d*-anfetamina e um aminoácido, L-lisina, pois a mudança na estereoquímica de LDX ocorre na parte da molécula formada pelo aminoácido.

10 CONCLUSÕES

- A caracterização de LDX candidato à SQR foi realizada por IV, RMN de hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C) e de correlação (HMBC e HSQC) e CL-Q-ATV. E a pureza foi determinada pelo método de balanço de massas. Os resultados obtidos para a amostra de LDX candidato à SQR são adequados aos objetivos pretendidos e permitiram o emprego de LDX como SQR;
- Os métodos propostos utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta e CL-UV e CL-CAD mostraram-se adequados para a identificação de LDX cápsula, podendo ser empregados no controle de qualidade da matéria-prima e das cápsulas deste fármaco;
- Os métodos de doseamento por CL-UV, CL-DAC e CL-EM demonstraram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, sendo adequados para a identificação e quantificação de LDX cápsula. A especificidade frente a produtos de degradação demonstrou que os métodos podem ser usados como indicativo de estabilidade;
- ANOVA demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os teores médios encontrados pelos três métodos (CL-UV, CL-DAC e CL-EM), sendo caracterizada a equivalência dos mesmos;
- O estudo preliminar da estabilidade de LDX SQR, para análise da especificidade dos métodos por CL-UV, CL-DAC e CL-EM, demonstrou que este fármaco é estável na maioria das condições experimentais testadas. LDX degrada somente em condições drásticas, ou seja, quando as condições experimentadas são acrescidas de calor;
- LDX é estável quando exposta à luz UV-A (352 nm). Frente à radiação UV-C (254 nm) LDX SQR apresenta redução no teor e há formação de produtos de degradação;

CONCLUSÕES

- As reações de fotodegradação de LDX apresentam cinética de primeira ordem, onde a velocidade da reação de fotodegradação é dependente da concentração da substância;
- Foram identificados dois produtos de degradação após exposição da solução amostra de LDX à luz UV 254 nm por CL-Q-ATV;
- Após LDX ser exposto à hidrólise ácida e alcalina e analisado por RMN, uma extensão de degradação de 17,75% e 22,91%, respectivamente, foi obtida e um produto de degradação majoritário foi identificado, o diastereoisômero de LDX: (2R)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-metil-2-feniletil] hexanamida.

AAP (American Academy of Pediatrics). ADHD: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. **Pediatrics**, v.128, n. 5, 2011.

AAP (American Academy of Pediatrics). Clinical practice guideline: Diagnosis and evaluation of the child with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatrics**. v.105, p.1158-1170, 2000.

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

ANTONOVICH, R.S.; KELLER, P.R. Applicability of mass spectrometry to detect coeluting impurities in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 97, p. 159–171, 2002.

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 Study. **Clinical Therapeutics**. v. 32, n. 2, p. 252-264, 2010.

BOREEN, A.L.; ARNOLD, W.A.; MCNEILL, K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. **Aquatic Sciences**, v. 65, p. 320–341, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344 de 12 de maio de 1998. Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 3.018 de 01 de julho de 2010. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 jul. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 36 de 03 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. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 ago. 2011.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Brasília, 23 dez. 2013.

CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Química orgânica. 2 ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2012.

CHRISTENSEN, F.M. Pharmaceuticals in the Environment – A Human Risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 212-221, 1998.

DIEHL, A.; CORDEIRO, D.C.; LARANJEIRA, R. e cols. (Orgs.). Dependência Química: Prevenção, tratamento e políticas públicas. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

FARAONE S.V.; SERGEANT J.; GILLBERG C.; BIEDERMAN J. The worldwide prevalence of ADHD: Is it an American condition? **World Psychiatry**. v.2, n.2, p. 104-113, 2003.

FDA - Food and Drugs Administration. Orange Book: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/tempai.cfm>>. Acesso em 25/01/2014.

GILLESPIE, T.A.; WINGER, B.E. Mass spectrometry for small molecule pharmaceutical product development: a review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 479- 490, 2011.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. Trends in Analytical Chemistry, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

HEALTH CANADA. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd_smd_2010_vyvanse_120534-eng.php> Acesso em 25/01/2014.

ICH – International Conference on Harmonization. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2) International Conference on Harmonisation, Harmonised Tripartite Guideline, Geneva, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

JAIN, D.; BASNIWAL, P.K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11-35, 2013.

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. 410–418, 2009.

JASINSKI, D.R.; KRISHNAN, S. Abuse liability and safety of oral lisdexamfetamine dimesylate in individuals with a history of stimulant abuse. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 419–427, 2009a.

JONES, O.A.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J.N. Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. **Environmental Technology**, v. 22, n. 12, p. 1383-94, 2001.

KNAPP, C.W.; CARDOZA, L.A.; HAWES, J.N.; WELLINGTON, E.M.H.; LARIVE, C.K.; GRAHAM, D.W. Fate and Effects of Enrofloxacin in Aquatic Systems under Different Light Conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 23, p. 9140–9146, 2005.

KÜMMERER, K. Pharmaceuticals in the Environment, **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 57-75, 2010.

LAVAGNINI, I.; MAGNO, F.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. **Quantitative Applications of Mass Spectrometry**. Chichester: Wiley, 2006.

LIU, S.; HU, C. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods. **Analytica Chimica Acta**, n. 602, p. 114–121, 2007.

MA, K.; WANG, H.; ZHAO, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, p. 227–233, 2009.

REFERÊNCIAS

MICKLE, T.; KRISHNAN, S.; BISHOP, B.; LAUDERBACK, C.; MONCRIEF, J.S.; OBERLENDER, R.O.; PICCARIELLO, T. inventors, New River Pharmaceuticals, Inc., assignee. Abuse-resistant amphetamine compounds. **US patent** 7,105,486. 2006.

NSW Government - Health, Australia. Drugs of Addiction (Schedule 8). Disponível em: <http://www.health.nsw.gov.au/pharmaceutical/Documents/drugsofaddiction-sch8.pdf>> Acesso em 25/01/2014.

OHANNESIAN, L.; STREETER, A. (Editors). **Handbook of Pharmaceutical Analysis, Series: Drugs and the Pharmaceutical Sciences**. Hardcover: CRC Press, 1st ed., 2001, 608 p.

PAZ, Y. Preferential photodegradation – why and how? **Comptes Rendus Chimie**, v. 9, n. 5-6, p. 774–787, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROHDE L.A.; BIEDERMAN, J.; BUSNELLO E. A.; ZIMMERMANN, H., SCHMITZ, M.; MARTINS, S.; TRAMONTINA, S. ADHD in a School Sample of Brazilian Adolescents: A Study of Prevalence, Comorbid Conditions, and Impairments. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 6, p. 716-722, 1999.

SIRTORI, C. Evaluación analítica de procesos de transformación biológica, fotoquímica y fotocatalítica de fármacos en água. Directores: Dr. D. Sixto Malato Rodríguez y Dra. Dña. Ana Agüera López. 2010, 304 f. Tese – (Doctorado en Ciencias Químicas) - Departamento de Hidrogeología y Química Analítica, Universidad de Almería, Almería, España, 2010.

TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1549–1556, 2010.

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.

VERVOORT, N.; DAEMEN, D.; TÖRÖK, G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, p. 92–100, 2008.

WILLIAMS, R.L. Official USP Reference Standards: Metrology concepts, overview, and scientific issues and opportunities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 40, p. 3–15, 2006.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2^a ed. Edinburgh:Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WHO Technical Report Series – 929 - WHO EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS - Thirty-ninth Report - World Health Organization – Geneva, 2005.

WHO (World Health Organization). General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances. WHO Technical Report Series, n. 943, Part A, 2006, 65 p.

ZOONEN, P. VAN; HOOGERBRUGGE, R.; GORT, S.M.; WIEL, H.J. VAN DE; KLOOSTER, H.A. VAN. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 584–593, 1999.