

Relação entre Fenótipo de CYP2C19 e Razões Metabólicas de Desmetilação de Amitriptilina em Voluntários Saudáveis

Rafael LINDEN ^{1*}, Ana L. ZIULKOSKI ¹, Maina WINGERT ¹, Paula TONELLO ¹,
Marina V. ANTUNES ¹ & André A. SOUTO ²

¹ Centro Universitário Feevale, Rodovia RS 239, n. 2755, CEP 93352-000,
Novo Hamburgo, RS, Brasil

² Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Avenida Ipiranga, n. 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO. A enzima CYP2C19 é a principal responsável pela metabolização da amitriptilina, com a formação de nortriptilina. Após fenotipagem com omeprazol em um grupo de 38 voluntários saudáveis, 5 voluntários com variados fenótipos (1 metabolizador lento, 1 metabolizador ultra-rápido e 3 metabolizadores rápidos) receberam uma dose oral única de amitriptilina e os níveis plasmáticos de amitriptilina e de seu metabólito principal nortriptilina foram monitorados. As razões de desmetilação de amitriptilina foram marcadamente diferentes entre indivíduos com diferentes fenótipos e correlacionadas com as razões metabólicas obtidas com omeprazol. As concentrações plasmáticas de amitriptilina e nortriptilina obtidas após uma dose oral de amitriptilina podem ser utilizadas para predição da exposição ao fármaco e para o ajuste precoce da posologia.

SUMMARY. "Relation between CYP2C19 Phenotype and Amitriptyline Demethylation Metabolic Ratios in Healthy Volunteers". CYP2C19 is the main responsible enzyme by amitriptyline metabolism, leading to the formation of nortriptyline. After phenotyping with omeprazole in a group of 38 healthy volunteers, 5 volunteers with different phenotypes (1 poor metabolizer, 1 ultra-extensive metabolizer and 3 extensive metabolizer) received a single oral dose of amitriptyline and the plasma levels of both amitriptyline and its main metabolite nortriptyline were monitored. Amitriptyline demethylation ratios were markedly different among individuals with different phenotypes and were correlated with omeprazole hydroxylation ratios. Plasma levels of amitriptyline and nortriptyline obtained after a single oral dose of amitriptyline can be used to prediction of drug exposure and to the early adjustment of the dosage regimen.

INTRODUÇÃO

A disposição cinética de fármacos pode apresentar variações clinicamente importantes entre indivíduos e uma parte desta variabilidade pode ser creditada a diferenças no metabolismo, as quais estão relacionadas a polimorfismos genéticos e a fatores ambientais e individuais diversos. Dentre os genes CYP polimórficos de relevância clínica, destaca-se o *CYP2C19*, com efeitos significantes no metabolismo de fármacos de importância clínica tais como amitriptilina, nortriptilina, diazepam, imipramina, propranolol e inibidores seletivos da recaptação de se-

rotonina ¹. A variabilidade individual na atividade da CYP2C19 está associada principalmente à presença do alelo completamente funcional *CYP2C19*1* e dos alelos nulos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*3*, os quais têm sido descritos como responsáveis por cerca de 87% de todos os metabolizadores lentos (ML) em indivíduos caucásianos e 100% em orientais ^{2,3}. Também, outros alelos relacionados à ausência de atividade de CYP2C19 *in vivo* foram descritos, tais como *CYP2C19*4*, *CYP2C19*5*, *CYP2C19*6*, *CYP2C19*7* e *CYP2C19*8* ⁴. Recentemente, Sim e colaboradores (2006) identificaram o alelo *CYP2C19*17*,

PALAVRAS-CHAVE: CYP2C19, Fenotipagem, Omeprazol, Desmetilação de amitriptilina.

KEY WORDS: CYP2C19, Phenotyping, Omeprazole, Amitriptyline demethylation.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: rafael.linden@feevale.br

o qual está relacionado à atividade aumentada da enzima CYP2C19 ⁵.

A predição da atividade metabólica individual, no âmbito da farmacogenética clínica, objetiva o ajuste das posologias. Desta forma, indivíduos com atividade metabólica reduzida poderiam utilizar doses menores de fármacos, minimizando potenciais efeitos adversos, enquanto pacientes com atividade aumentada poderiam receber doses mais elevadas, a fim de melhorar a eficácia do tratamento. Estudos anteriores propuseram ajustes de doses para antidepressivos com base no genótipo de *CYP2C19*, nos quais doses mais baixas são recomendadas a indivíduos ML ^{6,7}. A predição da atividade metabólica pode ser realizada pela genotipagem dos genes *CYP* e de outros relacionados ao metabolismo de fármacos, ou por fenotipagem das enzimas estudadas, através da administração de fármacos-sonda, substâncias cujo metabolismo é conhecido, sendo que a extensão da formação dos metabólitos é utilizada para avaliar a atividade metabólica ⁸.

A fenotipagem de CYP2C19 é usualmente realizada utilizando omeprazol como fármaco-sonda, uma vez que a conversão de omeprazol (OME) a hidróxi-omeprazol (HOME) é catalisada majoritariamente por esta enzima, enquanto a conversão de omeprazol a omeprazol sulfona (OMES) é dependente da atividade de CYP3A4 (Fig. 1) ⁹. Os fenótipos são classificados utilizando as razões metabólicas de hidroxilação do omeprazol, calculadas utilizando as concentrações plasmáticas de OME e HOME obtidas 3 h após a administração de uma dose oral de 20 mg de omeprazol ¹⁰. Este indicador é denominado razão metabólica (RM) e usualmente apresenta uma distribuição normal nas populações avaliadas ¹¹.

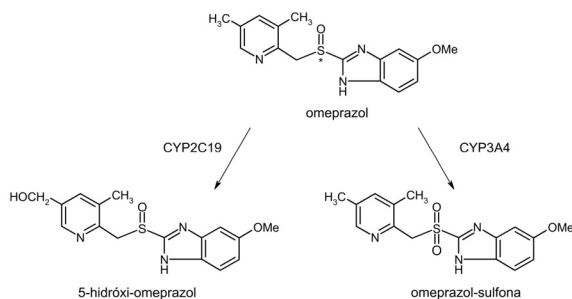


Figura 1. Principais rotas metabólicas do omeprazol. A enzima CYP2C19 catalisa a hidroxilação do omeprazol gerando 5-hidróxi-omeprazol, enquanto a enzima CYP3A4 catalisa a reação de sulfonação do fármaco, gerando omeprazol-sulfona.

Entretanto, a utilização de sondas de fenotipagem determinam a exposição do paciente a um fármaco que não faz parte de sua terapêutica, além de atrasar o início da administração dos novos fármacos. Uma abordagem interessante é determinar a correlação entre as razões metabólicas de fármacos frequentemente utilizados como sondas de fenotipagem e as razões metabólicas de outros fármacos metabolizados pela mesma enzima, empregando as análises rotineiras de monitoramento terapêutico para estabelecer os fenótipos metabolizadores.

Esta alternativa é promissora para o caso da amitriptilina (AT), que mesmo após décadas de introdução no mercado ainda é um antidepressivo amplamente utilizado. As maiores restrições ao uso da AT são a prevalência de efeitos adversos, sendo recomendado o monitoramento das concentrações plasmáticas, com uma janela terapêutica usual de 80 a 200 ng/mL para a soma das concentrações de AT e de seu principal metabólito nortriptilina (NT) ¹². A amitriptilina é metabolizada principalmente por desmetilação, catalizada principalmente pela CYP2C19, formando nortriptilina (NT), e por hidroxilação, levando à formação de E-hidróxi-amitriptilina (EHAT) e Z-hidróxi-amitriptilina (ZHAT), em uma reação mediada pela CYP2D6 (Fig. 2) ¹³. Analogamente, a NT também é desmetilada a nortriptilina (NNT) e hidroxilada a E-hidróxi-nortriptilina (EHNT) e Z-hidróxi-nortriptilina (ZHNT) ¹³.

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre as razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol e as razões de desmetilação da ami-

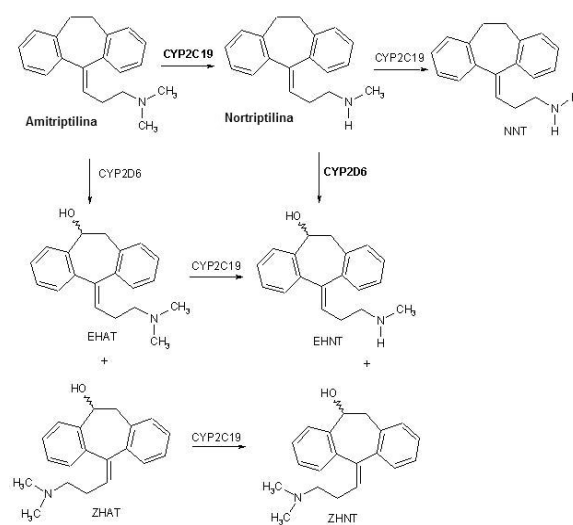


Figura 2. Rotas metabólicas principais da amitriptilina. As vias majoritárias estão marcadas em negro.

triptilina em um grupo de voluntários saudáveis, a fim de avaliar a viabilidade do uso dos dados usualmente obtidos no monitoramento terapêutico da amitriptilina como indicadores do fenótipo de CYP2C19.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de voluntários e coleta das amostras para o estudo de fenotipagem de CYP2C19

O protocolo de amostragem foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (registro CEP 05/02852) e um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos voluntários participantes do estudo. Trinta e oito voluntários (30 mulheres e 8 homens) caucasianos participaram do estudo, todos com idade superior a 18 anos, sem histórico de doenças hepáticas, renais ou de hipersensibilidade a fármacos e que não estivessem fazendo uso de medicamentos ou fitoterápicos nas duas semanas anteriores à coleta das amostras. Os principais dados biodemográficos dos voluntários foram: peso médio de 64,3 kg (faixa de 51 a 93 kg), índice de massa corporal médio de 23,1 (faixa de 19,9 a 31,1) e idade média de 27,4 anos (faixa de 21 a 43 anos). 15 voluntárias utilizaram contraceptivos hormonais durante a realização do estudo. Os voluntários foram orientados a permanecer em jejum oito h antes da coleta das amostras. Foram coletadas amostras de sangue venoso, em tubos à vácuo contendo EDTA como anticoagulante, antes e após a administração oral do fármaco-sonda omeprazol.

Fenotipagem de CYP2C19

Os voluntários receberam doses orais únicas de 20 mg de omeprazol, juntamente com 200 mL de água. Foram coletadas amostras de sangue 3 h após a administração de omeprazol. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g e o plasma foi separado para microtubos de polipropileno e mantido a -20 °C até a análise cromatográfica. A partir da determinação das concentrações plasmáticas de omeprazol e 5-hidróxi-omeprazol, foram calculadas as razões metabólicas de hidroxilação, definidas como [OME]/[HOME]. Foram considerados metabolizadores lentos (ML) os indivíduos com razões metabólicas maiores que 4,0; metabolizadores ultra-rápidos (UR) aqueles com razões metabólicas inferiores a 0,12; e metabolizadores rápidos (MR) aqueles com valores intermediários ¹⁴.

Determinação de omeprazol e hidróxi-omeprazol em plasma

As concentrações plasmáticas de omeprazol e hidroxioimeprazol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme Linden *et al.* ¹⁰. Suscintamente, adicionou-se tampão Tris pH 9,5 e padrão interno sulpirida (PI) à 1 mL de plasma, seguido de extração com acetato de etila. Posteriormente, OME, HOME e PI foram separados utilizando uma coluna Shim-Pack RP-18e (150 x 4,6 mm, d.p. 5 µm), com acetonitrila-tampão fosfato pH 7,6 (24:76, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL/min e tempo total da corrida cromatográfica de 15 min. Os tempos de retenção foram 2,7 min para o PI; 4,1 min para HOME e 11,6 min para OME. A detecção (UV a 302 nm) foi linear na faixa de 25 a 1000 ng/mL. O método foi validado de acordo com o *Conference Report on Bioanalytical Validation* ¹⁵ e apresentou precisão e exatidão adequadas, com limite de quantificação de 25 ng/mL para ambos os analitos. O equipamento utilizado foi proveniente da Shimadzu (Kioto, Japão).

Estudo farmacocinético com amitriptilina

O protocolo do estudo farmacocinético com amitriptilina foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Universitário Feevale e um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos voluntários. Foram selecionados 5 voluntários do estudo de fenotipagem de CYP2C19 com omeprazol, sendo 3 metabolizadores rápidos (razão de hidroxilação de omeprazol de 0,90; 1,25 e 2,41), um metabolizador ultra-rápido (razão de hidroxilação de omeprazol de 0,05) e um metabolizador lento (razão de hidroxilação de omeprazol de 9,83). Este estudo foi realizado quatro semanas após a fenotipagem, mantendo as mesmas orientações quanto ao uso de medicamentos e outras substâncias. AT foi administrada em uma dose única oral de 1 mg/kg, após um período de jejum de 8 h. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 24 e 48 h após a administração. Após a coleta, o plasma foi imediatamente separado do sangue e transferido para tubos de polipropileno e congelado a -20 °C até a análise. Os voluntários foram recomendados para não comer ou beber no período de até 3 h após a administração de AT.

Determinação de amitriptilina e nortriptilina em plasma

As concentrações plasmáticas de amitriptilina e nortriptilina foram determinadas por cromato-

grafia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme Linden *et al.*¹⁶. Suscintamente, adicionou-se tampão Tris pH 9,5 e padrão interno clomipramina (PI) à 1 mL de plasma, seguido de extração com hexano:isoprano (95:5) e re-extração para ácido fosfórico 0,1 % (v/v). A separação cromatográfica de AMI e NOR foi realizada utilizando uma coluna Lichrospher RP-100 8ec (250 x 4,0 mm, d.p. 5 µm), com acetonitrila-tampão fosfato pH 2,3 (37:63, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL/min e tempo total da corrida cromatográfica de 25 min. Os tempos médios de retenção foram 2,7 min para o PI; 4,1 min para NT e 11,6 min para AT. A detecção (UV a 210 nm) foi linear na faixa de 5 a 500 ng/mL. O método foi validado de acordo com as recomendações do *Conference Report on Bioanalytical Validation*¹⁵, apresentando precisão e exatidão adequadas, com limite de quantificação de 5 ng/mL para ambos os analitos. O equipamento utilizado foi proveniente da Shimadzu (Kioto, Japão).

Análises dos dados farmacocinéticos e análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de AT e NT foram determinados por métodos não-compartimentais¹⁷. A constante de eliminação (K_{el}) foi estimada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados empregando os dados da curva concentração-tempo na região terminal log-linear das curvas. O tempo de meia-vida foi calculado empregando a equação $t_{1/2} = 0,693/K_{el}$. A área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até a última concentração plasmática mensurável no tempo t (ASC_{0-t}) foi calculada através do método trapezoidal. A concentração plasmática de pico ($C_{máx}$) e o tempo para a concentração de pico ($T_{máx}$) foram obtidas diretamente das curvas concentração-tempo. As razões metabólicas de desmetilação de amitriptilina foram calculadas como $[AT]/[NT]$. Estas razões metabólicas foram correlacionadas com as razões metabólicas de hidroxilação do omeprazol por regressão linear simples utilizando o programa Microsoft Excel®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 demonstra os fenótipos previstos pela RM [OME]/[HOME] para os 38 voluntários. Através da fenotipagem com omeprazol foi possível estimar a presença de 3 ML (7,9%), 34 MR (89,5%) e 1 UR (2,5%). As frequências de fenótipos foram semelhantes àquelas encontradas em estudos anteriores com populações caucasianas³.

Naturalmente, o tamanho reduzido da amostra utilizada neste estudo limita a comparação com estudos mais amplos. Não houve relato de nenhum efeito adverso ou desconforto por parte dos voluntários.

A partir dos resultados da fenotipagem com omeprazol, 5 voluntários representando os fenótipos ML, MR e UR participaram de uma segunda fase do estudo, recebendo doses orais únicas de AT. Os voluntários não apresentaram efeitos adversos, com exceção de marcada sedação, especialmente no período de 2 a 4 h após a ingestão.

Voluntário	Gênero	[OME]/ [HOME]	Fenótipo determinado
1	M	0,05	UR
2	F	0,54	MR
3	F	0,61	MR
4	F	0,80	MR
5	F	0,80	MR
6	M	0,90	MR
7	F	0,90	MR
8	F	1,10	MR
9	F	1,17	MR
10	F	1,22	MR
11	F	1,24	MR
12	M	1,24	MR
13	F	1,25	MR
14	M	1,25	MR
15	M	1,30	MR
16	F	1,34	MR
17	F	1,40	MR
18	F	1,51	MR
19	M	1,55	MR
20	F	1,64	MR
21	M	1,65	MR
22	F	1,69	MR
23	F	1,70	MR
24	F	1,72	MR
25	F	1,97	MR
26	M	2,06	MR
27	F	2,12	MR
28	F	2,12	MR
29	F	2,27	MR
30	F	2,41	MR
31	F	2,45	MR
32	F	2,77	MR
33	F	2,83	MR
34	F	3,03	MR
35	F	3,97	MR
36	F	5,44	ML
37	F	6,62	ML
38	F	9,83	ML

Tabela 1. Fenotipagem de *CYP2C19* nos voluntários participantes do estudo. **OME**, omeprazol; **HOME**, 5-hidróxi-omeprazol; **M**, masculino; **F**, feminino; **UR**, metabolizadores ultra-rápidos; **MR**, metabolizadores rápidos; **ML**, metabolizadores lentos.

Voluntário	Fenótipo CYP2C19	Amitriptilina			Nortriptilina		
		C _{máx} (ng/ml)	t _{1/2} (h)	ASC (ng/ml/h)	C _{máx} (ng/ml)	t _{1/2} (h)	ASC (ng/ml/h)
1	MR	67,7	13,5	960,7	28,4	49,7	941,8
2	MR	87,1	9,9	843,9	32,4	67,2	788,1
3	MR	51,3	6,3	395,3	23,9	10,6	233,0
4	ML	162,8	11,8	1246,9	8,5	n.d.	n.d.
5	UR	28,0	4,9	139,4	32,3	33,5	530,6

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração de amitriptilina. n.d.: não determinado.

Voluntário	[OME]/[HOME] (t = 3 h)	Fenótipo CYP2C19	[AT]/[NT] (t = 3 h)	[AT]/[NT] (t = 4 h)
1	0,90	MR	2,44	2,00
2	1,25	MR	2,32	2,11
3	2,41	MR	1,64	2,29
4	9,83	ML	19,24	12,52
5	0,05	UR	0,87	0,49

Tabela 3. Relação entre as razões metabólicas de hidroxilação de OME e razões metabólicas de desmetilação de AT nos voluntários (n = 5). MR: metabolizador rápido; ML: metabolizador lento; UR: metabolizador ultra-rápido.

A maior concentração observada de AT foi 162,8 ng/mL, apresentada pelo voluntário ML. Por outro lado, a menor concentração de AT foi apresentada pelo voluntário UR, com 28,0 ng/mL. A maior concentração observada de NT foi 32,4 ng/mL. Entretanto, os valores de C_{máx} para NT não apresentaram diferenças tão marcantes como para AT, com exceção do voluntário ML com um C_{máx} para NT de 8,5 ng/mL. Os tempos de meia-vida de AT e NT apresentaram consideráveis variações entre os indivíduos. O metabolizador UR para CYP2C19 apresentou a menor meia-vida para AT (4,9 h). O voluntário

ML para CYP2C19 apresentou meia-vida para AT similar aos voluntários MR. O voluntário ML apresentou a maior ASC, corroborando a hipótese de uma maior exposição à AT para indivíduos com atividade reduzida de CYP2C19. Entretanto, os valores similares de t_{1/2} observados entre voluntários com fenótipos ML, MR e UR pode ser devido a atividades variáveis de outras vias metabólicas da AT, especialmente da CYP2D6, a qual também possui diversos polimorfismos já descritos (Tabela 2) ⁸.

As razões metabólicas de desmetilação de AT foram calculadas nos tempos onde as concentrações máximas foram determinadas, nos tempos 3 e 4 h após a administração do fármaco (Tabela 3). Estas razões metabólicas foram comparadas com as razões de hidroxilação de omeprazol, determinadas previamente. Embora a amostra avaliada seja pequena, limitando o alcance das conclusões, houve uma elevada correlação entre as razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol e as razões de desmetilação de amitriptilina, representada por um coeficiente de correlação (*r*) de 0,9796, no tempo 3 h após a administração (Fig. 3). O voluntário ML, classificado com o emprego do fármaco-sonda OME, 3 h após a administração de AT apresentou razão de desmetilação ([AT]/[NT]) 9,03 vezes superior que a média dos voluntários MR. Além disto, no mesmo ponto de tempo, o voluntário UR apresentou razão de desmetilação de AT duas vezes menor que os MR. Desta forma, fi-

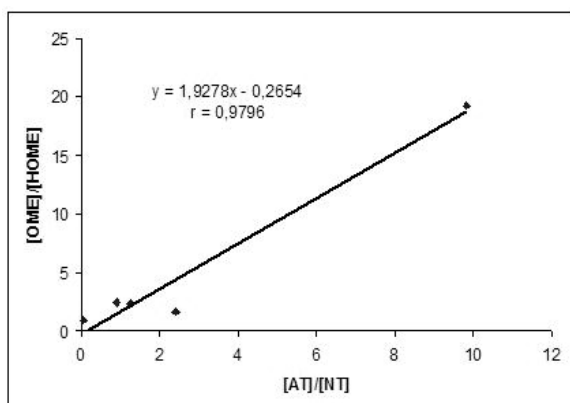


Figura 3. Relação entre as razões metabólicas de hidroxilação de OME ([OME]/[HOME]) e razões metabólicas de desmetilação de AT ([AT]/[NT]) obtidas 3 h após a administração do fármaco (n=5).

cam evidenciadas as marcantes diferenças na desmetilação de AT entre indivíduos com diferentes fenótipos de CYP2C19.

Van der Weide *et al.*¹⁸ usaram anteriormente as razões de desmetilação de AT para predizer o genótipo de CYP2C19. Entretanto, esta determinação ocorreu após o estabelecimento do estado estacionário, cerca de 3 a 4 semanas após o início da terapia com AT. Nosso estudo mostra que é possível a identificação de modificações do metabolismo sem o uso de fármacos-sonda clássicos, como o omeprazol, evitando o risco associado à introdução de um novo fármaco na terapêutica e o retardo no início do tratamento. Para tanto, uma amostra de sangue colhida 3 h após a primeira administração de AT pode permitir a classificação do fenótipo metabolizador de CYP2C19 e o conseqüente ajuste das doses subseqüentes, sem a necessidade de procedimentos de fenotipagem ou genotipagem usuais.

CONCLUSÕES

Empregando omeprazol como fármaco-sonda de fenotipagem para CYP2C19 em 38 voluntários, foram identificados 3 metabolizadores lentos (7,9%), 34 metabolizadores rápidos (89,5%) e 1 um metabolizador ultra-rápido (2,5%). Voluntários com diferentes fenótipos, após a ingestão de uma dose oral única de amitriptilina, apresentaram razões de desmetilação de amitriptilina marcadamente diferentes e correlacionadas com as razões metabólicas obtidas com omeprazol. As concentrações plasmáticas de amitriptilina e nortriptilina obtidas após uma dose oral de amitriptilina podem ser utilizadas para predição da exposição ao fármaco e para o ajuste precoce da posologia.

Agradecimentos. À Astra Zeneca (Möln dal, Suécia) pelo fornecimento de amostras de referência de omeprazol e hidróxi-omeprazol. À Lundbeck A/S (Copenhague, Dinamarca) pelo fornecimento de amostras de referência de amitriptilina e nortriptilina. Ao Centro Universitário Feevale, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Linden, R. (2006) *Análise toxicológica sistemática e fenotipagem de CYP2C19: contribuição ao monitoramento terapêutico da amitriptilina*. Tese de Doutorado. Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- De Moraes, S.M.F., GR. Wikinson, J. Blaisdell, U.A. Meyer, K. Nakamura & J.A. Goldstein (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 15419-22.
- Goldstein, J.A., T. Ishizaki, K. Chiba, S.M.F. De Moraes, D. Bell, P.M. Krahn & D.A.P. Evans (1997) *Pharmacogenetics* **34**: 59-64.
- Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee. CYP2C19 Allele Nomenclature. Disponível em: <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>> Acesso em: 10 abril 2008.
- Sim, S.C., C. Risinger, M.L. Dahl, E. Aklillu, M. Christensen, L. Bertilsson & M. Ingelmann-Sundberg (2006) *Clin. Pharmacol. Ther.* **79**: 103-13.
- Kirchheiner, J., K. Broesen, M.L. Dahl, L.F. Gram, S. Kasper, I. Roots, F. Sjöqvist, E. Spina & J. Brockmüller (2001) *Acta Psychiatr. Scand.* **104**: 173-92.
- Kirchheiner, J., L. Bertilsson, H. Bruus, A. Wolf, I. Roots & M. Bauer (2003) *Pharmacopsychiatry* **36**: s235-43.
- Linden, R. & A.A. Souto (2005) *Rev. Bras. Toxicol.* **18**: 131-42.
- Streetmann, D.S., J.S. Bertino & A.N. Nafziger (2000) *Pharmacogenetics* **10**: 187-216.
- Linden, R., A.L. Ziulkoski, M. Wingert, P. Tonello & A.A. Souto (2007) *J. Braz. Chem. Soc.* **18**: 733-40.
- Tamminga, W. J., J. Wemer, B. Oosterhuis, J.P.G. Brakenhoff, M.G.F. Gerrits, R.A. de Zeeuw, L.F.M.H De Leij & J.H.G Jonkman (2001) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**: 143-6.
- Ulrich, S. & Läuter J. (2002) *Clin. Pharmacokinet.* **41**: 853-76.
- Breyer-Pfaff, U. (2004) *Drug Metab. Rev.* **36**: 723-46.
- González H.M., E.M. Romero, A.A. Peregrina, T.J. Chavez, E. Escobar-Islas, F. Lozano & C.J. Hoyo-Vadillo (2003) *Clin. Pharmacol.* **43**: 1211-5.
- Shah, V. P., K.K. Midha, J. W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R. N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan & A. Yacobi (2000) *Pharm. Res.* **17**: 1551-7.
- Winter, E. (2005) *Basic clinical pharmacokinetics*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Linden, R., M. Antunes, A. L. Ziulkoski, M. Wingert, P. Tonello, M. Tzvetkov & A.A. Souto (2008) *J. Braz. Chem. Soc.* **19**: 35-41.
- Van der Weide, J., E.H. Van Baalen-Benedek & J.E. Koostra-Ros (2005) *Ther. Drug Monit.* **27**: 478-83.