



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Análise toxicológica sistemática e fenotipagem de  
CYP2C19: contribuição ao monitoramento terapêutico da  
amitriptilina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

**Rafael Linden**

Orientador:

Prof. Dr. André Arigony Souto

Porto Alegre

Novembro de 2006

## ÍNDICE

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Apresentação do Tema	6
Objetivos	9
Fenotipagem de enzimas metabolizadoras polimórficas e monitoramento terapêutico como uma ferramenta na farmacologia clínica dos antidepressivos tricíclicos, uma revisão	11
Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados	48
Simultaneous determination of omeprazole, hydroxyomeprazole and omeprazole sulphone in human plasma by isocratic HPLC-DAD: application to the phenotyping of CYP2C19 and CYP3A4 in a group of Brazilian volunteers	79
Sensitive and fast method for the simultaneous determination of amitriptyline and its main demethylated and hydroxylated metabolites in human plasma samples using HPLC-DAD: application to the determination of metabolic ratios after single oral dose of amitriptyline	104
Resultados adicionais	131
Discussão	136
Conclusão	142
Referências Bibliográficas	145

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rokus de Zeeuw, da Universidade de Groningen, Holanda, pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Fritz Pragst, do Instituto de Medicina Forense, Hospital Universitário Charité de Berlin, Alemanha, por receber-me em seu laboratório e por dividir comigo sua vasta experiência em análises toxicológicas, em especial na cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao Dr. Kjell Andersson, da Astra Zeneca, Mölndal, Suécia, pela doação de amostras de referência de 5-hidróxi-omeprazol e omeprazol sulfona.

A Kirsten Lundgren, da Lundbeck A/S, Copenhagen, Dinamarca, pela doação de amostras de referência de metabólitos de amitriptilina.

Ao Dr. Mladen Tzvetkov, do Departamento de Farmacologia Clínica da Universidade Georg-August de Göttingen, Alemanha, pela realização das análises de genotipagem.

Ao Centro Universitário Feevale, por propiciar as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

A Adriana da Luz Linden, cujas palavras de incentivo nunca me faltaram, especialmente nos momentos mais difíceis da execução deste estudo.

Ao Prof. Dr. André Arigony Souto, por sua atenção e apoio constante durante o desenvolvimento desta tese.

## RESUMO

O monitoramento terapêutico, compreendido como a determinação de concentrações plasmáticas de fármacos e a aplicação destas determinações à individualização da farmacoterapia, é uma abordagem útil quando da utilização de amitriptilina, considerando que faixas de concentração terapêutica e tóxicas estão propostas. Entretanto, a obtenção de níveis plasmáticos terapêuticos é fortemente impactada pela variabilidade fenotípica do metabolismo. Frequentemente, o genótipo metabolizador não permite prever o fenótipo. Um dos fatores mais comuns de inconsistência entre genótipo e fenótipo é a interação entre fármacos. Considerando que uma parcela significativa dos pacientes não relatam o uso corrente de medicamentos e fitoterápicos aos médicos assistentes, procedimentos de análise toxicológica sistemática podem ser úteis para avaliar a co-administração de fármacos. Neste estudo, foi desenvolvido um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados previamente publicadas, disponível na rede mundial de computadores. Este sistema permite a identificação de substâncias de interesse toxicológico com elevada probabilidade, mesmo com a utilização de métodos analíticos simples e de baixo custo. Também foi desenvolvida e validada uma metodologia para determinação simultânea de omeprazol, 5-hidróxi-omeprazol e omeprazol sulfona em plasma por HPLC-DAD, permitindo a avaliação do fenótipo metabolizador para CYP2C19 e CYP3A4 em um grupo de 38 voluntários saudáveis. Foram identificados três indivíduos considerados metabolizadores pobres para CYP2C19 e um indivíduo com fenótipo metabolizador ultra-rápido. Foi desenvolvido e validado um método por HPLC-DAD para determinação simultânea de amitriptilina, nortriptilina, desmetilnortriptilina, E-10-hidróxi-amitriptilina, Z-10-hidróxi-amitriptilina, E-10-hidróxi-nortriptilina e Z-10-hidróxi-nortriptilina. Posteriormente, 5 voluntários com diferentes fenótipos metabolizadores para CYP2C19 (1 ultra-rápido, 3 extensivos e 1 pobre) receberam uma dose oral de  $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de amitriptilina e forneceram amostras de sangue nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 24 e 48 horas pós-dose. Foram observadas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos e nas razões metabólicas de hidroxilação entre os diferentes fenótipos para CYP2C19. Deste forma, o cálculo do índice metabólico de desmetilação a partir das concentrações de amitriptilina e nortriptilina, determinadas em uma amostra coletada 3 horas após uma dose única ou após a primeira dose oral de amitriptilina, pode ser utilizada para determinar o fenótipo metabolizador para CYP2C19, permitindo um ajuste precoce da posologia.

## ABSTRACT

Therapeutic drug monitoring, understood as the determination of plasma drug concentrations and the application of these determinations to the individualization of pharmacotherapy, is an useful approach in amitriptyline treatment, once therapeutic and toxic concentrations for this drug have been proposed. However, the achievement of therapeutic plasma levels is strongly influenced by the metabolism phenotypic variability. Frequently, the genotype of drug metabolism does not allow to predict the phenotype. One of the most common factor of inconsistency between genotype and phenotype is drug interactions. Considering that a significant amount of patients do not report the current use of drug and herbal medicines to their physicians, systematic toxicological analysis procedures can be useful to evaluate the co-administration of drugs. In this study, a computer system for chromatographic parameter calculation and database retrieval, based on previously published databases, was developed. The system is available in the world wide web, allowing the identification of substances of toxicological interest with high probabilities, even when performing simple and low cost analytical methods. A HPLC-DAD methodology for the simultaneous determination of omeprazole, 5-hydroxy-omeprazole and omeprazole sulphone in plasma samples was developed and validated, allowing the evaluation of the phenotype for CYP2C19 and CYP3A4 in a group of 38 healthy volunteers. Three poor metabolizers and one ultra-fast metabolizer were identified. Additionally, a HPLC-DAD method for the simultaneous determination of amitriptyline, nortriptyline, desmethylnortriptyline, E-10-hydroxy-amitriptyline, Z-10-hydroxy-amitriptyline, E-10-hydroxy-nortriptyline and Z-10-hydroxy-nortriptyline was developed and validated. Five volunteers with different phenotypes for CYP2C19 (1 ultra-fast, 3 extensive and 1 poor) received a single oral dose of  $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  amitriptyline, supplying blood samples at times 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 24 and 48 hours after dosing. Differences in pharmacokinetic parameters and in metabolic ratios were observed between the different phenotypes. The calculation of demethylation metabolic ratio based on amitriptyline and nortriptyline plasma concentrations in a sample collected 3 hours after a single, or a first, oral dose of amitriptyline can be used to determine the metabolic phenotype for CYP2C19, allowing an early posology adjustment.

## APRESENTAÇÃO DO TEMA

O monitoramento terapêutico de fármacos (MTF) compreende a determinação de concentrações plasmáticas de fármacos e metabólitos como instrumento para ajuste posológico, quando existe evidência da correlação entre as concentrações obtidas e os efeitos tóxicos e terapêuticos para a substância monitorada (LINDER & KECK, 1998; MITCHELL, 2000).

Usualmente, o MTF é implementado após o estabelecimento do estado estacionário de concentrações plasmáticas, o que ocorre usualmente após 4 a 5 meias-vidas do fármaco, o que pode representar um período de 3 a 4 semanas para a amitriptilina (BAUMANN, 2004). Entretanto, a ocorrência de efeitos adversos severos ou a falta de efetividade nos primeiros dias da terapia, relacionados à concentrações plasmáticas inesperadas, podem representar um risco potencial ao paciente.

Uma alternativa para o ajuste precoce dos regimes posológicos é a determinação do perfil metabólico do paciente, através de estratégias de genotipagem ou fenotipagem de enzimas metabolizadoras.

A atividade das enzimas do sistema citocromo P450 é influenciada por diversos fatores ambientais, especialmente por interações entre fármacos, as quais muitas vezes não são identificadas. Estudos anteriores demonstraram que a obtenção de um histórico de uso de fármacos através de entrevistas pessoais é usualmente pouco efetiva (AKWAGYRIAM *et al.*, 1996; BERNDT *et al.*, 1993; RIEGER *et al.*, 2004), especialmente quando comparadas com resultados de análises toxicológicas, e que freqüentemente os pacientes utilizam medicamentos e fitoterápicos sem conhecimento dos médicos assistentes. RIEGER *et al.* (2004)

observaram que cerca de 20% dos pacientes admitidos em um hospital geral na Suíça apresentaram resultados toxicológicos positivos para fármacos não relatados em suas entrevistas e/ou históricos, com a maior prevalência de analgésicos, benzodiazepínicos e ranitidina.

Cabe destacar que o uso concomitante de fármacos inibidores ou indutores das enzimas do sistema citocromo P450 é um dos principais motivos para discordância entre o genótipo de *CYPs* e os fenótipos caracterizados por sondas específicas ou por razões metabólicas de fármacos substratos destas enzimas.

A determinação do perfil metabólico de um dado indivíduo através da utilização de fármacos-sonda apresenta algumas limitações na sua aplicabilidade, especialmente para introdução de um novo fármaco na terapia e pelo conseqüente atraso no início do tratamento.

Uma alternativa é a utilização de índices metabólicos de diferentes fármacos usualmente utilizados como forma de identificação dos diferentes fenótipos de metabolização, uma vez que esteja estabelecida sua correlação com os fármacos-sonda já validados.

Uma ampla revisão sobre a fenotipagem de enzimas metabolizadoras polimórficas e monitoramento terapêutico de fármacos na farmacoterapia com antidepressivos tricíclicos é apresentada no artigo publicado na Revista Brasileira de Toxicologia.

Adicionalmente, a realização de análises de triagem toxicológica, prévias ou concomitantes com o tratamento farmacológico, podem ser uma ferramenta útil com o propósito de aumentar a sua efetividade e segurança. Uma forma efetiva de identificar compostos de interesse farmacológico cuja presença em uma dada amostra biológica é insuspeita é a abordagem denominada análise toxicológica

sistemática (ATS). Entretanto, a realização de procedimentos de ATS é limitada pelo complexo manuseio das bases de dados disponíveis e pela disponibilidade de sistemas analíticos de elevado custo.

Desta forma, no escopo desta tese foram desenvolvidas novas metodologias que podem contribuir para o monitoramento terapêutico da amitriptilina. Estas metodologias incluem um sistema informatizado de análise toxicológica sistemática, uma metodologia analítica para fenotipagem simultânea de CYP2C19 e CYP3A4 após dose oral única de omeprazol e uma metodologia analítica para determinação de amitriptilina e seus principais metabólitos desmetilados e hidroxilados, permitindo a obtenção de índices metabólicos de desmetilação e hidroxilação.

## OBJETIVOS

### ***Geral***

Estabelecer novas estratégias para a identificação de compostos de interesse toxicológico e para a caracterização da atividade da enzima CYP2C19 em indivíduos expostos ao fármaco amitriptilina.

### ***Específicos***

1. Desenvolver um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados para aplicação em análise toxicológica sistemática.
2. Avaliar a aplicabilidade do sistema desenvolvido, especialmente com a utilização de metodologias analíticas de baixo custo e fácil execução.
3. Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação simultânea de omeprazol, 5-hidróxi-omeprazol e omeprazol sulfona em amostra de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.
4. Aplicar a metodologia desenvolvida em um grupo de voluntários saudáveis a fim de determinar razões metabólicas relacionadas a atividade das enzimas CYP2C19 e CYP3A4.
5. Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação simultânea de amitriptilina, nortriptilina, desmetilnortriptilina, E-10-hidróxi-amitriptilina, Z-10-hidróxi-amitriptilina, E-10-hidróxi-nortriptilina e Z-10-hidróxi-nortriptilina em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

6. Avaliar razões metabólicas de desmetilação e parâmetros farmacocinéticos em um grupo de voluntários selecionados com base em seu fenótipo metabolizador para CYP2C19 após a administração de uma dose única oral de 1 mg/kg de amitriptilina.
7. Estabelecer correlações entre as razões metabólicas obtidas na hidroxilação do omeprazol e na desmetilação da amitriptilina.

Fenotipagem de enzimas metabolizadoras polimórficas e monitoramento terapêutico como uma ferramenta na farmacologia clínica dos antidepressivos tricíclicos, uma revisão

Rafael Linden<sup>a</sup> e André Arigony Souto<sup>a\*</sup>

a. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PPGBCM/PUCRS)

Autor correspondente: A. A. Souto Av. Ipiranga, 681, Prédio 12, Bloco C, sala 245, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90619-900, e-mail: [arigony@pucrs.br](mailto:arigony@pucrs.br)

*Artigo publicado na Revista Brasileira de Toxicologia, volume 18, número 2, p. 131-142, 2005.*

## RESUMO

O polimorfismo de enzimas metabolizadoras de fármacos está relacionado com a variabilidade interindividual na efetividade da farmacoterapia. Os polimorfismos das enzimas oxidativas do sistema Citocromo P450 estão caracterizados e o seu impacto na atividade destas enzimas é conhecido. Considerando a sua especificidade por determinados substratos, *CYP2D6* e *CYP2C19* são as mais importantes no metabolismo de antidepressivos tricíclicos. Diversos métodos estão disponíveis para classificar um dado indivíduo com respeito à atividade metabólica destas enzimas. Embora a genotipagem seja uma abordagem de utilização crescente, a fenotipagem parece ser mais adequada com uma “foto instantânea” da atividade das *CYPs*. A fenotipagem da *CYP2D6* e da *CYP2C19* é usualmente realizada através da administração de fármacos-sonda, que possuem um certo grau de especificidade para as enzimas testadas. A administração simultânea de um conjunto de fármacos-sondas com especificidade para diferentes enzimas, denominado coquetel de fenotipagem, é amplamente utilizada. Nesta abordagem, os fármacos-sonda são administrados e amostras de sangue ou urina são coletadas em intervalos de tempo padronizados. Após a determinação quantitativa dos fármacos e seus metabólitos, normalmente por cromatografia líquida de alta eficiência, um parâmetro farmacocinético é utilizado para classificar os indivíduos como metabolizadores pobres, extensivos ou ultra-rápidos. Uma das possibilidades mais promissoras da caracterização metabólica individual é a individualização dos regimes de dosagem em farmacoterapia, possibilidade que ainda não foi amplamente explorada na prática clínica.

**Unitermos:** *CYP2D6*, *CYP2C19*, farmacogenética, fenotipagem, monitoramento terapêutico, antidepressivos tricíclicos

## ABSTRACT

Polymorphism in drug metabolizing enzymes is related with interindividual variability in drug therapy effectiveness. The polymorphisms of oxidative enzymes of the P450 cytochrome system have been characterized, and their impact in enzyme activity already known. Considering their substrate specificity, *CYP2D6* and *CYP2C19* are the most important in the tricyclic antidepressant metabolism. Several methods are available in order to classify an individual regarding metabolic activity of these enzymes. Besides genotyping is a fast growing approach, phenotyping seems to be more feasible as a “moment picture” of *CYPs* activity. Phenotyping of *CYP2D6* and *CYP2C19* is usually done by the use of probe drugs, with some degree of specificity for the tested enzyme. To this purpose, the cocktail approach is widely used, which allows the evaluation of several enzymes simultaneously. Usually, the probe drugs are administered and samples of blood or urine are taken at standardized time intervals. After parent drug and metabolite quantitative analysis, usually by high-performance liquid chromatography, a pharmacokinetic parameter is used to classify the individuals as poor, extensive or ultra-fast metabolizers. One of the most promising possibilities of the individual metabolic characterization is customizing drug therapy, which has not been fully exploited until now.

**Key-words:** *CYP2D6*, *CYP2C19*, pharmacogenetics, phenotyping, therapeutic drug monitoring, tricyclic antidepressants

## Introdução

No nascente campo da farmacogenética, cujo objetivo clínico final é propiciar a individualização da farmacoterapia baseada em características gênicas individuais, muita atenção tem sido devotada à genotipagem de alelos responsáveis por diferentes isoformas de enzimas metabolizadoras do sistema citocromo P450 (*CYPs*) (EAP e col., 2004, KIRSCHHEINER e col., 2001, KIRSCHHEINER e col., 2003). A genotipagem dos *CYPs* também tem sido motivo de atenção na toxicologia forense, como ferramenta suplementar para interpretação de achados toxicológicos (LEVO e col., 2003, KOSKI, 2005). Entretanto, existem limitações de ordem prática para a implementação da genotipagem como ferramenta para caracterização da capacidade metabolizadora de fármacos de um dado indivíduo. Frequentemente, um dado genótipo pode corresponder à diferentes fenótipos, face à influência da co-administração de outros fármacos e patologias pré-existentes, dentre outros fatores (BACHMANN, 2002). Estas variações fenotípicas resultam em marcantes diferenças na capacidade metabólica dos indivíduos e, por conseguinte, observa-se uma ampla variabilidade de concentrações plasmáticas em indivíduos submetidos a regimes de dosagem semelhantes. Deve-se considerar que o conhecimento das concentrações plasmáticas é uma das formas mais adequadas para ajustar o regime de dose em farmacoterapia, visto as dificuldades para determinar concentrações de fármacos em seus locais de ação (BAUMANN e col., 2004).

Apesar das suas limitações, a determinação das concentrações plasmáticas de fármacos e seus metabólitos tem sido utilizada como parâmetro para o monitoramento da eficácia e da segurança da farmacoterapia, com destaque para fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes, antipsicóticos, antiretrovirais e

imunossupressores. Esta abordagem, denominada monitoramento terapêutico de fármacos (MTF), está especialmente estabelecida para os antidepressivos tricíclicos (ATC), que a despeito de possuírem adequada eficiência terapêutica, freqüentemente determinam a ocorrência de efeitos tóxicos. Para estes fármacos, faixas de concentrações plasmáticas terapêuticas e tóxicas estão disponíveis na literatura (BAUMANN e col., 2004a, LINDER e KECK, 1998, MÜLLER e col., 2003).

Desta forma, a caracterização fenotípica de enzimas metabolizadoras pode ser utilizada como ferramenta útil na determinação das doses de ATC a serem administradas a um dado indivíduo. Esta caracterização, denominada fenotipagem metabólica, permite classificar os indivíduos como metabolizadores pobres, extensivos ou rápidos (BACHMANN, 2002, TAMMINGA, 2001). Usualmente, indivíduos classificados como metabolizadores pobres deverão receber doses mais baixas do que indivíduos classificados como metabolizadores extensivos ou rápidos. O monitoramento das concentrações plasmáticas ao longo da terapia também apresenta-se como alternativa importante, visto que o fenótipo metabolizador individual pode alterar-se com a co-administração de outros fármacos, entre outros fatores (BACHMANN, 2002).

#### Polimorfismos de enzimas metabolizadoras de fármacos

Polimorfismos de enzimas metabolizadoras de fármacos são causados por mutações em genes que codificam enzimas biotransformadoras específicas, as quais geralmente seguem uma herança autossomal recessiva (MEYER e ZANGER, 1997, TAMMINGA, 2002).

Em 1957 foi sugerido por Motulsky que certas reações adversas à fármacos poderiam estar relacionadas a variações geneticamente determinadas de enzimas metabolizadoras, especialmente no fígado. Atualmente são conhecidos polimorfismos em diversas enzimas metabolizadoras com importância clínica, tais como butirilcolinesterase, metiltransferase, UDP-glicuroniltransferase, sulfotransferase, álcool desidrogenase, CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 (KALOW e col., 1991, TAMMINGA, 2001, VON MOLTKE e col., 1995).

O grupo mais importante de enzimas metabolizadoras de fármacos é o citocromo P450, uma super família de mono-oxigenases contendo heme. O sistema P450 está localizado no retículo endoplasmático liso da célula e é particularmente abundante no fígado. A super família P450 é composta de famílias e sub-famílias de enzimas que são definidas na base da similaridade de suas seqüências de aminoácidos (NELSON e col., 1993). Os membros de uma família são pelo menos 40% idênticos e os membros de uma subfamília possuem pelo menos 55% de similaridade de seqüência. As enzimas P450 são nomeados com a raiz "CYP" seguida por um número (família) e uma letra (sub-família) e outro número denotando a forma individual da P450. Pelo menos 74 famílias CYP, das quais 14 são freqüentes em todos os mamíferos, já foram descritas (2). As enzimas das famílias 1, 2 e 3 estão envolvidas na metabolização de xenobióticos tais como fármacos, outras famílias como a 7, 17, 19, 21 e 27 estão envolvidas no metabolismo de esteróides e do colesterol (NELSON e col., 1993). As principais enzimas metabolizadoras de fármacos da superfamília P450 são apresentadas na tabela 1.

Dentre as diferentes CYPs já caracterizadas, CYP2D6 e a CYP2C19 são especialmente importantes no metabolismo dos ATC.

Tabela 1. Principais enzimas Citocromo P450 metabolizadoras de xenobióticos (KALOW e TANG, 1991; MEYER e ZANGER, 1997; VON MOLTKE e col., 1995).

enzima	tecido	polimorfismo	substrato modelo
CYP1A1	diversos	não	benzopireno
CYP1A2	fígado	não	cafeína, fenacetina
CYP2A6	fígado	sim	cumarina, dietilnitrosamina
CYP2C9	fígado, intestino	sim	tolbutamida, varfarina
CYP2C19	fígado	sim	mefenitoína, omeprazol
CYP2D6	fígado, intestino, rim	sim	dextrometorfano, esparteína, debrisoquina
CYP2E1	fígado, intestino, leucócitos	não	etanol clorzoxazona
CYP3A4	trato gastrointestinal, fígado	sim	testosterona, nifedipina, eritromicina

#### CYP2D6

O polimorfismo do gene *CYP2D6*, também denominado debrisoquina hidroxilase, foi caracterizado a partir de um estudo com voluntários que utilizaram o fármaco anti-hipertensivo debrisoquina, onde um dos indivíduos apresentou uma

resposta anti-hipertensiva extremamente pronunciada, a qual foi associada à ineficácia da 4-hidroilação da debrisoquina (DALY e col., 1996). Analogamente, foram observados efeitos tóxicos severos em indivíduos tratados com esparteína, associada à um defeito no processo de N-oxidação deste fármaco. Estudos familiares com respeito à estas ocorrências demonstraram a existência de herança monogênica autossômica recessiva mendeliana (MAREZ e col., 1997).

Indivíduos com uma variante não funcional do *CYP2D6* apresentam um metabolismo prejudicado de substratos da *CYP2D6* e são denominados metabolizadores pobres (MP). O gene *CYP2D6* está localizado no cromossomo 22 sendo parte do *cluster CYP2D* com dois pseudo-genes (*CYP2D7P* e *CYP2D8P*) e um gene funcional (*CYP2D6*). Ele contém 9 éxons com um total de 4378 pares de bases. Em estudos com grupos grandes de caucasianos, foi estimado que, para o *CYP2D6*, 67% de todos os alelos codificam para enzimas com atividade normal, 4% codificam para enzimas com atividade aumentada e 27% levam à enzimas não-funcionais (GRIESE e col., 1998; MAREZ e col., 1997; SACHSE e col., 1997).

Os alelos não codificantes mais comuns são *CYP2D6\*4* (cerca de 71% dos alelos nulos), *CYP2D6\*5* (cerca de 16% dos alelos nulos), *CYP2D6\*3* (cerca de 3% dos alelos nulos) e *CYP2D6\*6* (cerca de 4% dos alelos nulos), sendo que os demais alelos são raros, apresentando freqüências menores que 1% (SACHSE e col., 1997).

Variante alélicas que codificam para enzimas com atividades diminuída são raras em populações caucasianas, sendo que os alelos mais comuns são *CYP2D6\*9* e *CYP2D6\*10*, cada um correspondendo por cerca de 2% do total de alelos. O fenótipo metabolizador ultra-rápido (*CYP2D6\*2xN*) é causado por múltiplos

genes funcionais *CYP2D6*, determinando que uma quantidade aumentada de *CYP2D6* seja expressa (SACHSE e col., 1997).

Uma combinação homozigótica de alelos não codificantes leva ao fenótipo metabolizador pobre (MP), tipos selvagens heterozigóticos e combinações de alelos com atividade enzimática reduzida levam à uma atividade reduzida da *CYP2D6*. Além disto, a duplicação do gene ou até a sua multiplicação determinam o fenótipo metabolizador ultra-rápido (UR). Indivíduos com atividade enzimática normal são denominados metabolizadores extensivos (ME) (KIVISTÖ e KROEMER, 1997).

As principais variantes alélicas do gene *CYP2D6* são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Variantes alélicas mais comuns do gene *CYP2D6* (DALÉN e col., 1998)

alelo	nome usual	mudanças de nucleotídeos		efeito	atividade
<i>CYP2D6*1</i>	tipo selvagem	nenhum			normal
<i>CYP2D6*2</i>	<i>CYP2D6L</i>	G <sub>1749</sub> C;	C <sub>2938</sub> T; R <sub>296</sub> C; S <sub>486</sub> T		diminuída
		G <sub>4268</sub> C;			
<i>CYP2D6*2Xn</i>		G <sub>1749</sub> C;	C <sub>2938</sub> T; R <sub>296</sub> C; S <sub>486</sub> T		aumentada
		G <sub>4268</sub> C		N genes ativos	
<i>CYP2D6*3</i>	<i>CYP2D6A</i>	A2637 deleção		frameshift	nenhuma
<i>CYP2D6*4</i>	<i>CYP2D6B</i>	C <sub>188</sub> T;	C <sub>1062</sub> A; defeito de splicing		nenhuma
		A <sub>1072</sub> G;	C <sub>1085</sub> G;		
		G <sub>1749</sub> C;	G <sub>1934</sub> A;		
		G <sub>4268</sub> C			
<i>CYP2D6*5</i>	<i>CYP2D6D</i>	CYP2D6 deletado		CYP2D6 deletado	nenhuma
<i>CYP2D6*6</i>	<i>CYP2D6T</i>	T <sub>1795</sub> deletado		frameshift	nenhuma
<i>CYP2D6*7</i>	<i>CYP2D6E</i>	A <sub>3023</sub> C		H <sub>324</sub> P	nenhuma
<i>CYP2D6*8</i>	<i>CYP2D6G</i>	G <sub>1749</sub> C;	G <sub>1846</sub> T; códon de parada		nenhuma
		C <sub>2938</sub> T; G <sub>4268</sub> C			
<i>CYP2D6*9</i>	<i>CYP2D6C</i>	A <sub>2701</sub> -A <sub>2703</sub>	ou K <sub>281</sub> deletado		diminuída
		G <sub>2702</sub> -A <sub>2704</sub>			
		deletado			
<i>CYP2D6*10</i>	<i>CYP2D6J</i>	C <sub>188</sub> T;	G <sub>1749</sub> C; P <sub>34</sub> S; S <sub>486</sub> T		diminuída
		G <sub>4268</sub> C			

Os substratos mais comuns da *CYP2D6* são apresentados na tabela 3 (BERTZ e GRANNEMAN, 1997). Dentre os substratos relacionados predominam os fármacos psicoativos e agentes cardiovasculares.

Tabela 3. Substratos típicos da *CYP2D6* (BERTZ e GRANNEMAN, 1997)

classe	fármaco
narcóticos	hidrocodona, oxycodona, tramadol
antiarrítmicos	flecainida, mexiletina, propafenona
betabloqueadores	metoprolol, propranolol, timolol
agentes gastro-intestinais	ondansetron
antidepressivos tricíclicos	amitriptilina, clomipramina, desipramina, imipramina, nortriptilina, trimipramina
antidepressivos diversos	fluoxetina, citalopram, fluvoxamina, maprotilina, paroxetina, venlafaxina
neurolépticos	clorpromazina, risperidona, flufenazina

## CYP2C19

As diferenças previamente observadas no metabolismo da mefenitoína foram associadas ao gene *CYP2C19* por GOLDSTEIN e col. (1997). Pelo menos sete genes ou pseudogenes da subfamília *CYP2C19* estão localizados no cromossomo 10. Dois alelos nulos no gene *CYP2C19*, especialmente *CYP2C19\*2* e *CYP2C19\*3*, têm sido descritos como responsáveis dos cerca de 87% de todos os MP em

caucasianos e 100% dos MP em orientais (DE MORAIS e col., 1994; GOLDSTEIN e col.,1997).

Além disto, três alelos não codificantes, *CYP2C19\*4*, *CYP2C19\*5* e *CYP2C19\*6*, foram descritos, porém com frequências alélicas inferiores à 1% em caucasianos (GOLDSTEIN e col.,1997). As variantes alélicas mais comuns do gene *CYP2C19* são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Variantes alélicas mais comuns do gene *CYP2C19* (DE MORAIS e col., 1994; GOLDSTEIN e col., 1994).

alelo	nome usual	mudanças de nucleotídeos	efeitos	atividade
<i>CYP2C19*1<sup>A</sup></i>	<i>CYP2C19wt1</i>	nenhuma		normal
<i>CYP2C19*1B</i>	<i>CYP2C19wt2</i>	C <sub>99</sub> T; A <sub>991</sub> G	Ile <sub>331</sub> Val	normal
<i>CYP2C19*2</i>	<i>CYP2C19m1</i>	C <sub>99</sub> T; G <sub>681</sub> A; A <sub>991</sub> G	C <sub>990</sub> T; defeito de splicing	de nenhuma
<i>CYP2C19*3</i>	<i>CYP2C19m2</i>	G <sub>636</sub> A; A <sub>991</sub> G; A <sub>1251</sub> C	códon de parada	de nenhuma
<i>CYP2C19*4</i>	<i>CYP2C19m3</i>	A <sub>1</sub> G; C <sub>99</sub> T; A <sub>991</sub> G	GTG códon de iniciação	nenhuma
<i>CYP2C19*5A</i>	<i>CYP2C19m4</i> <i>CYP2C19<sub>TRP433</sub></i>	C <sub>1297</sub> T	Arg <sub>433</sub> Trp	nenhuma
<i>CYP2C19*5B</i>		C <sub>99</sub> T; A <sub>991</sub> G; C <sub>1297</sub> T	Arg <sub>433</sub> Trp	nenhuma
<i>CYP2C19*6</i>	<i>CYP2C19M5</i>	C <sub>99</sub> T; G <sub>395</sub> A; A <sub>991</sub> G	Arg <sub>132</sub> Gln; Ile <sub>331</sub> Val	nenhuma

A deficiência da *CYP2C19* ocorre com uma prevalência de MP de 2-5% entre europeus, 4-5% entre africanos, 6% em afro-americanos e de 12 a 23% em orientais (GOLDSTEIN e col., 1997).

A *CYP2C19* é responsável pelo metabolismo de diversos fármacos de importância terapêutica, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Substratos típicos da *CYP2C19* (STREETMAN e col., 2000)

classe	fármaco
anticoagulante	varfarina
anticonvulsivante	mefenitoína
antimalárico	proguanil
antidepressivos tricíclicos	amitriptilina, clomipramina, imipramina
antidepressivos diversos	citalopram, moclobemida
agentes gatrointestinais	lansoprozol, omeprazol
ansiolíticos/hipnóticos	diazepam, hexobarbital
imunossupressores	ciclofosfamida

#### Fenotipagem dos genes *CYP2D6* e *CYP2C19*

A individualização da farmacoterapia para o genótipo/fenótipo de um paciente pode auxiliar na obtenção de um efeito terapêutico otimizado, caracterizado por redução significativa dos sintomas com incidência mínima de efeitos adversos. Esforços extensos têm sido direcionados para determinar métodos de genotipagem para mutações específicas no DNA que determinam variações na capacidade metabolizadora individual. Entretanto, a ocorrência de mutações raras, não reconhecidas ou sem caracterização funcional, bem como o custo destes *screenings* genéticos pode ser um fator limitante na genotipagem de grandes populações. Adicionalmente, nem todas as mutações resultam em um efeito substancial no fenótipo (CHRISTENSEN e col., 2003; SHARMA e col., 2003).

Embora muitas *CYPs* apresentem uma sobreposição de especificidade de substratos, para alguns substratos, uma única enzima é exclusiva ou predominante em uma determinada via de seu metabolismo. A fenotipagem fornece uma medida da atividade de uma determinada enzima metabolizadora de fármacos através da administração de um fármaco sonda e da medida posterior de determinados parâmetros farmacocinéticos e leva em consideração não somente fatores genéticos, mas também fatores ambientais e fisiológicos (CHAINUVATI e col., 2003; CHRISTENSEN e col., 2003; SHARMA e col., 2003; STREETMAN e col., 2001).

Um dos problemas associados com a fenotipagem tem sido a sua incapacidade para testar diversas enzimas simultaneamente, visto que, normalmente, um fármaco separado é necessário para cada enzima. Assim, uma abordagem por coquetel, onde um conjunto de fármacos-sonda com especificidade para diferentes enzimas metabolizadoras é administrado simultaneamente, apresenta diversas vantagens. Efeitos tais como a terapia simultânea com fármacos e a existência de doenças hepáticas tem sido avaliados com o uso de diferentes coquetéis. Outra vantagem dos coquetéis é que os fatores ambientais não mudam durante o curto espaço de tempo do experimento. Dentre as limitações da estratégia do coquetel estão as interações mútuas entre os fármacos e a elevada seletividade e sensibilidade requerida dos métodos analíticos para analisar diversos analitos na mesma amostra (CHRISTENSEN e col., 2003; SHARMA e col., 2003).

Uma questão importante são as eventuais interações entre os fármacos. Interações entre fármacos utilizados em fenotipagem foram relatados anteriormente, por exemplo, entre cafeína (*CYP1A2*) e clorzoxazona (*CYP2E1*) e entre dextrometorfano (*CYP2D6*) e cloroguanida (*CYP2C19*). Um problema no desenho de um coquetel é que fármacos usados para avaliar a atividade enzimática oxidativa

*in vivo* freqüentemente não predizem o metabolismo de outros fármacos (isto é, compostos diferentes e seus metabólitos podem ser oxidados por diversos CYPs). Existe uma sobreposição de substratos e seletividades metabólicas para diferentes CYPs. A escolha dos fármacos e seus índices fenotípicos são fatores importantes no desenho de um coquetel (CHAINUVATI e col., 2003; CHRISTENSEN e col., 2003; SHARMA e col., 2003).

Uma limitação de diversos coquetéis propostos é a indisponibilidade de algumas sondas, além dos efeitos adversos causados e o esquema de amostragem (SHARMA e col., 2003). Este tipo de teste deve ser previamente aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa, seguindo as determinações da Resolução 196/96 (Conselho Nacional de Saúde, 1996).

Determinantes genéticos, componentes da dieta, fatores ambientais e o uso concomitante de medicamentos podem induzir ou inibir a atividade de enzimas. A possibilidade de interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre sondas de fenotipagem requer que combinações potenciais sejam validadas cuidadosamente, antes de sua utilização em estudos mais amplos (ZHU e col., 2001).

Diversos coquetéis de fenotipagem já foram propostos, utilizando fármacos seletivos para diferentes enzimas, conforme tabela 6.

Tabela 6. Coquetéis de fenotipagem de enzimas metabolizadoras

enzimas	sondas	pacientes	análise	amostras	duração	referência
CYP1A2 CAYP2E1 CYP2C19 CYP2D6 CYP3A4	cafeína clorzoxazona mefenitoína metoprolol midazolam	14	clae, métodos independentes	3 amostras sangue, urina de 8 horas	8 horas	ZHU e col., 2001
CYP1A2 CYP2C9 CYP2C19 CYP2D6 CYP3A4	cafeína losartan omeprazol debrisoquina quinina	24	clae, métodos independentes	3 amostras de sangue, urina de 8 horas	8 horas	CHRISTENSEN e col., 2003
CYP2D6 CYP2E1 CYP2C9 CYP3A4 CYP1A2 NAT2, XO	metoprolol clorzoxazona tolbutamida dapsona cafeína	10	clae, métodos independentes	1 amostra de urina de 8 horas.	8 horas	SHARMA e col., 2003
CYP1A2, NAT2, XO CYP2D6 CYP2C19 CYP3A	cafeína dextrometorfano omeprazol midazolam (IV) varfarina	12	clae, métodos independentes	12 amostras de sangue, urina de 12 horas	96 horas	CHAINUVATI e col., 2003
CYP2D6 CYP2C19	metoprolol omeprazol	6	clae, métodos independentes	1 amostra de sangue	3 horas	TAMMINGA e col., 2001
CYP1A2 CYP2C9 CTP2C19 CYP2D6 CYP3A4	cafeína flurbiprofeno omeprazol dextrometorfano midazolam	10	clae, diferentes métodos de extração e um método de análise	1 amostra de sangue	2 horas	JERDI e col., 2004
CYP1A2 CYP3A4 CYP2C9 CYP2D6 CYP2E1	cafeína midazolam (IV) tolbutamida debrisoquina clorzoxazona	12	clae, métodos independentes	10 amostras de sangue, 2 amostras de urina de 6 horas	12 horas	BLAKEY e col., 2003

**clae**, cromatografia líquida de alta eficiência

Fenotipagem de *CYP2D6* e *CYP2C19* utilizando metoprolol e omeprazol como sondas

Dentre as diversas sondas de fenotipagem usualmente utilizadas para as *CYP2D6* e *CYP2C19*, as principais envolvidas no metabolismo dos ATC, o metoprolol e o omeprazol são especialmente interessantes por sua ampla disponibilidade e baixa incidência de efeitos adversos, além da adequada

capacidade preditora da atividade das enzimas. (CHAINUVATI e col., 2003; CHRISTENSEN e col., 2003; JERDI e col., 2004; SHARMA e col., 2003; TAMMINGA e col., 2001; ZHU e col., 2001).

O metoprolol é um fármaco antiarrítmico, com ação antagonista dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, e é utilizado para tratamento da hipertensão e da *angina pectoris*. Entretanto, a sua seletividade para receptores  $\beta_1$  é uma propriedade relativa que é perdida em elevadas concentrações plasmáticas (LUZIER e col., 1999).

O metoprolol apresenta características de elevada lipofilia, sendo eliminado quase que exclusivamente na forma de metabólitos. Foi demonstrado que o metabolismo do metoprolol para  $\alpha$ -hidróxi-metoprolol também é dependente da ação do metabolismo polimórfico da *CYP2D6*. Os MP *CYP2D6* apresentam uma área sob a curva de concentração plasmática 6 vezes maior e uma meia-vida de eliminação 3 vezes maior que o ME. A via de  $\alpha$ -hidroxilação responde pelo metabolismo de cerca de 10% da dose ingerida, sendo 65% do metabolismo devido à reação de O-desmetilação (LUZIER e col., 1999).

O metoprolol é administrado como uma mistura racêmica, sendo o (S)-metoprolol responsável pela atividade  $\beta$ -bloqueadora. A *CYP2D6* apresenta uma marcada estéreo-seletividade, com um *clearance* maior para o (R)-metoprolol, o que não ocorre nos MP (LUZIER e col., 1999).

Para estudos de fenotipagem da *CYP2D6*, é administrada uma dose de 100 mg de metoprolol como uma única dose oral e a razão metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol, o indicador fenotípico normalmente empregado, pode ser avaliada em uma coleta de urina de 8 horas após a dose ou em uma única amostra de plasma, coletada 3 horas após a administração (SOHN e col., 1992).

TAMMINGA e col. (2001) encontraram razões metabólicas metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol em torno de 0,0030 para metabolizadores extensivos (ME) e em torno de 1,5 para metabolizadores pobres (MP).

O uso de metoprolol se justifica pelas baixas concentrações de dextrometorfano, a sonda clássica para *CYP2D6*, normalmente encontradas. Esta é uma dificuldade adicional na caracterização de metabolizadores ultra-rápidos ou em pequenas mudanças na atividade da *CYP2D6* (TAMMINGA e col., 2001).

O método analítico mais empregado para quantificação de metoprolol e seus metabólitos em plasma é a CLAE com detecção ultravioleta (CLAE-UV) (SHARMA e col., 2003; TAMMINGA e col., 2001; ZHU e col., 2001).

O omeprazol é um benzoimidazol substituído, ativo na supressão da secreção ácida gástrica. O omeprazol é geralmente eliminado rapidamente do plasma, com uma meia-vida de eliminação de cerca de 0,5-1 hora. Em alguns indivíduos, a meia-vida de eliminação do omeprazol é 3 vezes mais longa e a curva concentração-tempo é 10 vezes maior que os valores médios (TAMMINGA, 2001).

A maior parte de uma dose de omeprazol administrada é metabolizada hepaticamente para 5-hidróxi-omeprazol e omeprazol sulfona. A enzima *CYP2C19* é a responsável pela hidroxilação do omeprazol (BALIAN e col., 1995; STREETMAN e col., 2000; TAMMINGA e col., 2001).

Em estudos de fenotipagem foram utilizadas diversas doses de omeprazol administradas oralmente, na faixa de 10 a 40 mg. Uma vez que a ingestão de alimentos pode retardar a absorção do omeprazol e, conseqüentemente, as concentrações em amostras tomadas em intervalos curtos de tempo, a maioria dos procedimentos de fenotipagem solicita jejum prévio à administração da sonda e durante o período da tomada de amostras (STREETMAN e col., 2000).

Um parâmetro fenotípico usualmente utilizado é o índice de hidroxilação (IH), caracterizado pela razão das concentrações séricas de omeprazol e 5-hidróxi-omeprazol (STREETMAN e col., 2000). Este indicador também é denominado razão metabólica (RM) e usualmente apresenta uma distribuição normal nas amostras avaliadas (TAMMINGA e col., 2001). Este índice usualmente apresenta valores próximos de 0,25 em ME e em torno de 0,9 para MP (CHRISTENSEN e col., 2003).

A concentração de pico normalmente ocorre após 1 hora da administração, com concentrações não detectáveis após 2-6 horas (STRETMANN e col., 2000; TAMMINGA, 2001; TAMMINGA e col., 2001).

As concentrações de omeprazol e 5-hidróxi-omeprazol em plasma são normalmente determinadas por CLAE-UV (CHRISTENSEN e col., 2003; STRETMANN e col., 2000).

## **Discussão**

A genotipagem é clinicamente relevante apenas quando é capaz de prever o fenótipo. Considerando que a atividade das enzimas *CYP* é afetada por diversos fatores, a fenotipagem apresenta-se como a melhor alternativa para prever a atividade de uma dada enzima, através da utilização de sondas validadas (BACHMANN, 2002; EAP e col., 2004; STREETMAN, 2000). A fenotipagem reflete não apenas fatores genéticos, mas uma combinação de efeitos de fatores genéticos, ambientais e endógenos (BACHMANN, 2002; STREETMAN, 2000).

Embora a genotipagem da *CYP2D6* seja capaz de prever o fenótipo, algumas evidências demonstram que a utilidade destas predições é limitada quando aplicada à pacientes durante a terapia. Entre 20 pacientes tratados com fármacos

substratos para *CYP2D6*, não foi possível estabelecer correlação entre genótipo e fenótipo e o fenótipo MP foi encontrado em indivíduos heterozigoticamente mutados e em não mutados (ZELENKOVA e col., 2000). Portanto, quando ocorre o uso concomitante de outros fármacos, estados patológicos e outras variáveis como a exposição ocupacional à xenobióticos, a predição de doses ajustadas para fármacos de índices terapêuticos estreitos é subsidiada mais adequadamente pelo conhecimento do fenótipo do que do genótipo (BACHMANN, 2002).

### Farmacogenética na farmacologia clínica dos ATC

A maioria dos antidepressivos é metabolizada pela enzima polimórfica *CYP2D6*, responsável por reações de hidroxilação, a qual apresenta elevada variabilidade em sua atividade devido à variantes genéticas. Indivíduos portadores de 2 alelos deficientes da *CYP2D6*, denominados metabolizadores pobres, possuem depurações reduzidas em mais de 50%. Esta ocorrência foi relatada para amitriptilina, clomipramina, desipramina, imipramina, nortriptilina, doxepina e trimipramina (DALÉN e col., 1998, KIRSCHHEINER e col., 2003).

A *CYP2C19* parece estar envolvida nas reações de desmetilação dos antidepressivos tricíclicos, o que foi demonstrado para amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina e trimipramina. Indivíduos metabolizadores pobres com respeito à *CYP2C19* apresentam áreas sob a curva cerca de duas vezes maiores que os metabolizadores extensivos (KIRSCHHEINER e col., 2003). Embora pareça estar envolvida no metabolismo dos ATC, a *CYP2C9* parece ter uma contribuição pequena.

A correlação entre eficácia terapêutica e concentrações plasmáticas é usualmente pequena para os antidepressivos tricíclicos. Entretanto, os efeitos adversos são geralmente relacionados à quantidade de fármaco presente no plasma. Assim, a capacidade metabólica predita pela genotipagem está mais relacionada com a falha no tratamento, devido à ocorrência de efeitos adversos, do que com a predição da resposta (GRASMÄDER e col., 2004; KIRSCHHEINER e col., 2001; KIRSCHHEINER e col., 2003).

Na tabela 7 são apresentados parâmetros farmacocinéticos de diversos fármacos da classe dos ATC, relacionando-os ao tipo metabolizador com respeito à *CYP2D6*.

Tabela 7. Diferenças nos parâmetros farmacocinéticos de antidepressivos tricíclicos em relação ao tipo metabolizador com respeito a *CYP2D6* (KIRCHHEINER e col., 2001; KIRCHHEINER e col., 2003)

fármaco	parâmetro	dose (mg)	UR	ME	MI	MP	referência
amitriptilina	ASC( $\mu$ M.h)	50(DU)	-	1,9	2,8	4,1	MELLSTRÖM e col., 1986
amitriptilina (+MD)	C <sub>ss</sub> ( $\mu$ M)	150(DM)	-	0,54	-	1,3	BAUMANN e col., 1986
clomipramina	ASC ( $\mu$ M.h)	100(DU)	-	3,2	-	5,7	NIELSEN e col., 1994
clomipramina (+MD)	C <sub>ss</sub> ( $\mu$ M)	150(DM)	-	0,2	-	0,57	NIELSEN e col., 1992
imipramina	ASC ( $\mu$ M.h)	100(DU)	-	2,3	2,6	4,4	BROSEN e col., 1986
imipramina (+MD)	C <sub>ss</sub> ( $\mu$ M)	100(DM)	-	0,38	-	1,8	BROSEN e col., 1986a
nortriptilina	ASC ( $\mu$ M.h)	25(DU)	0,8	1,3	3,6	4,3	DALÉN e col., 1998
desipramina	ASC ( $\mu$ M.h)	25(DU)	-	1,0	-	8,0	STEINER e SPINA, 1987

**Fármaco**, compostos medidos nos diferentes estudos, eventualmente adicionado do metabólito demetilado (MD)

**Parâmetro**, parâmetro farmacocinético calculado (ASC, área sob a curva, C<sub>ss</sub>, concentração plasmática no *steady state*)

**Dose**, dose administrada, em uma única administração (DU, dose única) ou administrações múltiplas (DM, doses múltiplas)

**UR, ME, MI, MP**, metabolizador ultrarrápido (MU), metabolizador extensivo (ME), metabolizador intermediário (MI) e metabolizador pobre (MP)

Além da variabilidade determinada geneticamente na farmacocinética dos ATC, seus efeitos também são afetados pelo polimorfismo dos genes que afetam a farmacodinâmica destes agentes, tais como o transportador de serotonina, receptores de serotonina e triptofano-hidrolase (KIRSCHHEINER e col., 2003).

## Monitoramento terapêutico de antidepressivos tricíclicos

A aplicabilidade dos tratamentos com fármacos antidepressivos é limitada pela elevada taxa de não-adesão, bem como pela considerável variabilidade genética no metabolismo dos fármacos usualmente empregados. Uma das formas de minimizar estas dificuldades tem sido o emprego do monitoramento terapêutico de fármacos (MTF), onde concentrações plasmáticas são usadas como estimativa das concentrações presentes no local de ação e avaliadas com respeito a dados previamente obtidos, relacionados à faixa de concentrações consideradas terapêuticas e/ou tóxicas (LINDER e KECK, 1998, MITCHELL, 2000).

A AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie) indica o monitoramento terapêutico de fármacos nas seguintes situações: suspeita de não adesão ao tratamento; resposta inadequada ao tratamento em doses recomendadas; utilização de fármacos de baixo índice terapêutico; efeitos adversos em doses recomendadas; suspeita de interações com outros fármacos; pacientes com co-morbidades farmacocineticamente relevantes; presença de características genéticas que impactam no metabolismo; problemas terapêuticos decorrentes da mudança de especialidade farmacêutica; recorrência com doses recomendadas; pacientes com características farmacocinéticas especiais (crianças e idosos); programas de farmacovigilância e psiquiatria forense (BAUMANN e col., 2004, BAUMANN e col., 2004a).

Os ATC apresentam concentrações plasmáticas-alvo estabelecidas, as quais são tomadas como referência para o seu monitoramento terapêutico, conforme a tabela 8 (BAUMANN e col., 2004).

Tabela 8. Concentrações plasmáticas-alvo de antidepressivos tricíclicos e seus tempos de meia-vida (BASELT, 2000; BAUMANN e col., 2004a)

fármaco	faixa terapêutica recomendada	tempo de meia-vida
amitriptilina + nortriptilina	80 – 200 ng/mL	9 - 25 horas
clomipramina + norclomipramina	175 – 450 ng/mL	12 – 36 horas
nortriptilina	70 – 170 ng/mL	15 – 90 horas
imipramina + desipramina	175 – 300 ng/mL	20 – 40 horas
desipramina	100 – 300 ng/mL	12 – 54 horas
trimipramina	150 – 350 ng/mL	16 – 39 horas

Desta forma, a combinação do MTF e da genotipagem e/ou fenotipagem poderá facilitar amplamente a identificação e o manejo adequado de indivíduos dispostos a apresentar concentrações excessivamente altas ou baixas de fármacos antidepressivos (MITCHELL, 2000).

Efeitos tóxicos podem ser causados por uma redução da atividade das enzimas CYP450 como resultado do uso simultâneo de outros fármacos, ou seja, pelo fenótipo metabolizador pobre induzido por fármacos. Em qualquer situação, é sempre o metabolizador extensivo que é convertido em um metabolizador pobre fenotípico, uma vez que MP não pode ter sua atividade ainda mais reduzida. Uma das causas não-genéticas mais comuns de redução do metabolismo de ATC é a administração simultânea de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, tais como fluoxetina e paroxetina, os quais são potentes inibidores da

*CYP2D6* (MITCHELL, 2000). Indutores do metabolismo hepático tais como carbamazepina, fenitoína e fenobarbital reduzem as concentrações de ATC (MITCHELL, 2000).

O monitoramento terapêutico de fármacos é usualmente baseado em concentrações plasmáticas de vale (imediatamente antes da administração da dose usual do fármaco) em *steady state*. Portanto, amostras de sangue devem ser colhidas pelo menos 5 meias-vidas do fármaco após modificações de dose e durante a fase de eliminação  $\beta$ -terminal. Para a maioria dos psicofármacos, as meias-vidas estão entre 12 e 36 horas. Na prática clínica, o tempo de amostragem apropriado para a maioria dos psicofármacos é de uma semana após a estabilização da dosagem e imediatamente antes da ingestão da dose da manhã, ou seja, cerca de 12-16 horas após a última administração. É importante informar o horário da administração da última dose para permitir uma interpretação apropriada (BAUMANN e col., 2004, BAUMANN e col., 2004a).

Embora uma relação clara entre o monitoramento terapêutico de antidepressivos tricíclicos e a eficácia do tratamento antidepressivo ainda não tenha sido demonstrada, o MTF diminui o tempo necessário para a obtenção de concentrações plasmáticas na faixa terapêutica e reduz a incidência de efeitos tóxicos. A relação custo-eficácia do MTF para antidepressivos tricíclicos foi avaliada e é considerada vantajosa (MÜLLER e col., 2003).

## **Conclusões**

Atualmente, a medida das concentrações plasmáticas de ATC ainda é a melhor alternativa disponível para estimar as concentrações presentes no cérebro.

Para diversos fármacos têm sido demonstrada uma forte correlação entre o genótipo de enzimas metabolizadoras e os seus níveis plasmáticos (CHARLIER e col., 2002).

Entre os fármacos antidepressivos, a importância do polimorfismo de enzimas metabolizadoras é maior para aqueles que apresentam forte correlação entre as concentrações plasmáticas e a resposta terapêutica, como no caso dos ATC. Desta forma, foram publicados recentemente recomendações de dose para tricíclicos, baseadas no genótipo dos genes *CYP2D6* e *CYP2C19*, conforme a tabela 8 (KIRSCHHEINER e col., 2001; KIRSCHHEINER e col., 2003). Por outro lado, a genotipagem das *CYP3A4* e *CYP3A5* apresenta baixa correlação com a atividade das respectivas enzimas, provavelmente pela suscetibilidade destas isozimas a fatores ambientais (BACHMANN, 2002, EAP e col., 2004, VON MOLTKE e col., 1995).

Entretanto, a concentração efetiva no sangue e possivelmente no cérebro será dependente de outros fatores, além da constituição genética dos pacientes. Entre outros fatores, destacam-se a utilização concomitante de outros fármacos, dieta, hábito de fumar e funções reduzidas de órgãos como fígado e rins. Além disto, deve ser considerada a questão da não-adesão ao tratamento, estimada em cerca de 50% em alguns estudos (EAP e col., 2004).

Desta forma, devido às limitações dos métodos clássicos de fenotipagem de enzimas metabolizadoras e do monitoramento terapêutico de fármacos, as duas abordagens possuem características complementares e seu uso combinado pode contribuir significativamente para a melhoria da farmacoterapia com ATC. O próprio MTF pode ser considerado como um procedimento de fenotipagem, embora a

abordagem mais comum seja a utilização de sondas com especificidade por determinadas enzimas.

Publicações recentes (BAUMANN e col., 2004, BAUMANN e col., 2004a) referem a falta de estudos prospectivos relacionando aspectos farmacogenéticos com o monitoramento terapêutico a fim de determinar a eficácia desta abordagem conjunta na melhoria da eficiência do tratamento, bem como a redução dos efeitos adversos. Também são poucos os estudos correlacionando fenotipagem e eficácia terapêutica de ATC (SPINA e col., 1997). A realização de estudos farmacogenéticos é especialmente recomendada quando: o paciente está sendo tratado com um substrato cujo metabolismo apresenta uma ampla variabilidade intraindividual, demonstrada pelo MTF; um fármaco possui um pequeno índice terapêutico, com elevado risco de toxicidade em metabolizadores lentos e de ineficácia em metabolizadores ultra-rápidos; o paciente apresenta concentrações plasmáticas não usuais e o paciente possui uma doença crônica que requer tratamento de longo prazo.

Uma abordagem promissora é a utilização dos próprios ATC prescritos como preditores do perfil metabolizador. Uma vantagem óbvia desta abordagem seria dispensar a administração de fármacos estranhos à terapêutica dos pacientes, bem como não provocar retardo no início da terapia, o que se reveste de especial importância no tratamento da depressão. Em um estudo recente, VAN DER WEIDE e col. (2005) demonstraram uma correlação significativa entre um índice metabólico obtido para amitriptilina (logaritmo decimal da razão de concentrações plasmáticas de amitriptilina e nortriptilina) com o genótipo para CYP2D6 e CYP2C19, permitindo a caracterização metabólica de um grupo de pacientes sem a administração de uma sonda de fenotipagem clássica e sem reações de genotipagem. Adicionalmente, o

mesmo método analítico empregado para o MTF dos ATC poderia ser utilizado na fenotipagem. Naturalmente, esta nova abordagem deverá ser validada comparativamente à sondas de fenotipagem clássicas.

### **Referências bibliográficas:**

- BACHMANN, K.A. Genotyping and Phenotyping the cytochrome p-450 Enzymes. *American Journal of Therapeutics*, v. 9, n. 4, p. 309-316, 2002.
- BALIAN, J. D., SUKHOVA, N., HARRIS, J. W., HEWETT, J., PICKLE, L., GOLDSTEIN, J. A., WOOSLEY, R. L., FLOCKHART, D. A. The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin metabolism, a population study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 57, p. 662-629, 1995.
- BASELT, R. C. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 5<sup>th</sup>. ed. Foster City, Chemical Toxicology Institute, 2000.
- BAUMANN, P., JONZIER PEREY, M., KOEB, L., KÜPFER, A., TINGUELY, D., SCHOPF, J. Amitriptyline pharmacokinetics and clinical response, II. Metabolic polymorphism assessed by hydroxylation of debrisoquine and mephenytoin. *International Clinical Psychopharmacology*, v. 1, p. 102-112, 1986.
- BAUMANN, P., HIEMKE, C., ULRICH, S., GAERTNER, I., RAO, M. L., ECJERMANN, G., GERLACH, M., KUSS, H.J., LAUX, G., MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B., RIEDERER, P., ZERNIG, G. Therapeutic Monitoring of Psychotropic Drugs, An outline of the AGNP-TDM Expert

- Group Consensus Guideline. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 26, n. 2, p. 167-170, 2004.
- BAUMANN, P., HIEMKE, C., ULRICH, S., GAERTNER, I., RAO, M. L., ECJERMANN, G., GERLACH, M. KUSS, H..J., LAUX, G., MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B., RIEDERER, P., ZERNIG, G. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines, *Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry. Pharmacopsychiatry*, v.37, p. 243-265, 2004a.
- BLAKEY, G. E., LOCKTON, J. A., PERRET, J., NORWOOD, P., RUSSEL, M., AHERNE, Z., PLUME, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamic assessment of a five-probe metabolic cocktail for CYPs 1A2, 3A4, 2C9, 2D6 and 2E1. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57, n. 2, p. 162-169, 2003.
- BERTZ, R.J., GRANNEMAN, G.R. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetics interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 31, p. 210-58, 1997.
- BROSEN, K., KLYSNER, R., GRAM, L.F., OTTON, S.V., BECH, P., BERTILSSON, L. Steady state concentrations of imipramine and its metabolites in relation to the sparteine/debrisoquine polymorphism. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 30, p. 679-684, 1986.
- BROSEN, K., OTTON, S.V., GRAM, L.F. Imipramine demethylation and hydroxylation, impact of the sparteine oxidation phenotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 40, p. 543-549, 1986a.
- CHAINUVATI, S., NAFZIGER, A.N., LEEDER, J.S., GAEDIGK, A., KEARNS, G.L., SELLERS, E., ZHANG, Y., KASHUBA, A. D. M., ROWLAND, E., BERTINO, J. S. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450

- 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5 + 1 cocktail". *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 74, n. 5, p. 437-447, 2003.
- CHARLIER, C., BROLY, F., LHERMITTE, M., PINTO, E., ANSSEAU, M., PLOMTEUX, G. Polymorphisms in the *CYP2D6* Gene, association with Plasma Concentrations of Fluoxetine and Paroxetine. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 25, n.6, p. 738-742, 2003.
- CHRISTENSEN, M., ANDERSSON, K., DALÉM, P., MIRGHANI, R.A., MUIRHEAD, G. J., NORDMARK, A., TYBRING, G., WAHLBERG, A., YASAR, Ü., BERTILSSON, L. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 73, n. 6, p.517-528, 2003.
- Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa em seres humanos. Disponível em, <http://www.conselho.saude.gov.br>. Acesso em 10 de janeiro de 2006.
- DALÉN, P., DAHL, M.L., RUIZ, M.L., NORDIN, J., BERTILSSON, L. 10-hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3 and 13 functional *CYP2D6* genes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 63, p. 444-452, 1998.
- DALY, A.K., BROCKMÖLLER, J., BROLY, F., EICHELBAUM, M., EVANS, W.E., GONZALEZ, F.J., HUANG, J. D., IDLE, J. R., INGELMANN-SUNDBERG, M., ISHIZAKI, T., JACQ-AIGRAIM, E., MEYER, U. A., NEBERT, D. W., STEEN, V. M., WOLF, C. R., ZANGER, U. M. Nomenclature for human *CYP2D6* alleles. *Pharmacogenetics*, v. 6, p. 193-201, 1996.
- DE MORAIS, S. M. F., WIKINSON, G. R., BLAISDELL, J., MEYER, U. A., NAKAMURA, K., GOLDSTEIN, J.A. The major genetic defect responsible

- for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 15419-15422, 1994.
- EAP, C. B., JAQUENOUD SIROT, E., BAUMANN, P. Therapeutic Monitoring of Antidepressants in the Era of Pharmacogenetics Studies. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 26, n. 2, p. 152-155, 2004.
- GOLDSTEIN, J.A., FALETTO, M.B., ROMKES-SPARKS, M., SULLIVAN, T., KITAREEWAN, S., RAUCY, J.L., LASKER, J. M., GHANAYEM, B. I. Evidence that *CYP2C19* is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry*, v. 269, p. 1743-1752, 1994.
- GOLDSTEIN, J.A., ISHIZAKI, T., CHIBA, K., DE MORAIS, S. M. F., BELL, D., KRAHN, P. M; EVANS, D. A. P. Frequencies of defective *CYP2C19* alleles responsible for mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics*, v. 7, p. 59-64, 1997.
- GRASMÄDER, K., VERWOHLT, P.L., RIETSCHHEL, M., DRAGICEVIC, A., MÜLLER, M., HIEMKE, C., FREYMAN, N., ZOBEL, A., MAIER, W., RAO, M. L. Impact of polymorphism of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in a naturalistic clinical setting. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 60, p. 329-336, 2004.
- GRIESE, E.U., ZANGER, U. M., BRUDERMANN, U., GAEDIGK, A., MIKUS, G., MÖRIKE, K., STÜVEN, T., EICHELBAUM, M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of *CYP2D6* in German population. *Pharmacogenetics*, v. 8, p. 15-26, 1998.

- JERDI, M. C., DAALI, Y., OESTREICHER, M. K., CHERKAOUI, S., DAYER, P. A. Simplified analytical method for a phenotyping cocktail of major CYP450 biotransformation routes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, p. 1203-1212, 2004.
- KALOW, W., TANG, B. K. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 50, p. 508-519, 1991.
- KIVISTÖ, K. T., KROEMER, H. K. Use of probe drug as predictors of drug metabolism in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 37, p. 40s-48s, 1997.
- KIRCHHEINER, J., BERTILSSON, L., BRUUS, H., WOLF, A., ROOTS, I., BAUER, M. Individualized Medicine – Implementation of Pharmacogenetic Diagnostics in Antidepressant Drug Treatment of Major Depressive Disorders. *Pharmacopsychiatry*, v. 36, p. s235-s243, 2003.
- KIRCHHEINER, J., BROSEN, K., DAHL, M. L., GRAM, L.F., KASPER, S., ROOTS, I., SJÖQVIST, F., SPINA, E., BROCKMÖLLER, J. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants, a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 104, p. 173-192, 2001.
- KOSKI, A. Interpretation of Postmortem Toxicology Results, Pharmacogenetics and Drug-Alcohol Interaction. Helsinki, Finlândia, 2005. [Tese de doutorado – Instituto de Medicina Forense da University of Helsinki].
- LEVO A., KOSKI, A., OJANPERÄ, I., VUORI, E., SAJANTILA, A. Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid

- drug (tramadol) metabolite ratios in blood. *Forensic Science International*, v. 135, p. 9-15, 2003.
- LINDER, M. W., KECK, P. E. Standards of laboratory practice, antidepressant drug monitoring. *Clinical Chemistry*, v. 44, n. 5, p. 1073-1084, 1998.
- LUZIER, A. B., KILLIAN, A., WILTON, J. H., WILSON, M. F., FORREST, A., KAZIERAD, D. J. Gender-related effects on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 66, p. 594-601, 1999.
- MAREZ, D., LEGRAND, M., SABBAGH, N., LO GUIDICE, J. M., SPIRE, C., LAFITTE, J. J., MEYER, U. A., BROLY, F. Polymorphism of the cytochrome P450 *CYP2D6* gene in an European population, characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*, v. 7, p. 193-202, 1997.
- MELLSTRÖM, B., SÄWE, J., BERTILSSON, L., SJÖQVIST, F. Amitriptyline metabolism, association with debrisoquin hydroxylation in nonsmokers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 39, p. 369-371, 1986.
- MEYER, U. A., ZANGER, U. M. Molecular mechanism of genetic polymorphism of drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 37, p. 269-296, 1997.
- MITCHELL, P. B. (2000). Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 49, p. 303-312, 2000.
- MÜLLER, M. J., DRAGICEVIC, A., FRIC, M., GAERTNER, I., GRASMÄDER, K., HÄRTER, S., HERMANN, E., KUSS, H. J., LAUX, G., OEHL, W., RAO, M. L., ROLLMANN, N., WEIGMANN, H., WEBER-LABONTE, M., HIEMKE, C.

- Therapeutic Drug Monitoring of Tricyclic Antidepressants, How Does it Work under Clinical Conditions? *Pharmacopsychiatry*, v. 36, p. 98-104, 2003.
- NELSON, D. R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D. J., GUENGERICH, P., ESTABROOK, R. W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F. J., COON, M. J., GUNSALUS, I. C., GOTOH, O., OKUDA, K., NEBERT, D. W. The P450 superfamily, update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biology*, v. 12, p. 1-51, 1993.
- NIELSEN, K. K., BROSEN, K., HANSEN, M. G., GRAM, L. F. Single-dose kinetics of clomipramine, relationship to the sparteine and S-mephenytoin oxidation polymorphisms. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 55, p. 518-527, 1994.
- NIELSEN, K. K., BROSEN, K., GRAM, L. F. Steady state plasma levels of clomipramine and its metabolites, impact of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 43, p. 405-411, 1992.
- SACHSE, C., BROCKMÖLLER, J., BAUER, S., ROOTS, I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population, allele frequencies and phenotypic consequences. *American Journal of Human Genetics*, v. 60, p. 284-295, 1997.
- SHARMA, A., PILOTE, S., BÉLANGER, P. M., ARSENAULT, M., HAMELIN, B. A. A. Convenient five-drug cocktail for the assessment of major drug metabolizing enzymes, a pilot study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 58, n. 3, p. 288-297, 2003.

- SOHN, D-R., KUSAKA, M., SHIN, S-G., JANG, I-J., CHIBA, K., ISHIZAKI, T. Utility of a one-point (3 hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two East Asian populations. *Therapeutic Drug monitoring*, v. 14, p. 184-189, 1992.
- SPINA, R., GITTO, C., AVENOSO, A., CAMPO, G. M., CAPUTI, A. P., PERUCCA, E. Relationship between plasma desipramine levels, *CYP2D6* phenotype and clinical response to desipramine, a prospective study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 51, p. 395-398, 1997.
- STEINER, E.; SPINA, E. Differences in the inhibitory effect of cimetidine on desipramine metabolism between rapid and slow debrisoquine hydroxylators. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 42, p. 278-282, 1987.
- STREETMANN, D. S., BERTINO, J. S., NAFZIGER, A. N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults, a review of in-vivo Cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, v. 10, p. 187-216, 2000.
- TAMMINGA, W. J. *Polymorphic drug metabolising enzymes, assessment of activities by phenotyping and genotyping in clinical pharmacology*. Groningen, Holanda, 2001. [Tese de doutorado – Rijkuniversiteit Groningen].
- TAMMINGA, W. J., WEMER, J., OOSTERHUIS, B., BRAKENHOFF, J. P. G., GERRITS, M. G. F., DE ZEEUW, R, A., DE LEIJ, L. F. M. H., JONKMAN, J. H. G. An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on *CYP2D6* and *CYP2C19*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57, p. 143-146, 2001.

- VAN DER WEIDE, J., STEIJNS, L. S. W. Cytochrome P450 enzyme system, genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Annals Clinical Biochemistry*, v. 26, p. 722-729, 1999.
- VAN DE WEIDE, J., VAN BAALEN-BENEDEK, E. H., KOOSTRA-ROS, J. E. Metabolic ratios of psychotropics as indication of Cytochrome P450 2D6/2C19 genotype. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 27, n. 4, p. 478-483, 2005.
- VON MOLTKE, L.L., GREENBLATT, D. J., SCHMIDER, J., HARMATZ, J. S., SHADER, R. I. Metabolism of drugs by Cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 29 (Suppl. I), p. 33-44, 1995.
- ZELENKOVA, O., HADASOVA, E., CESKOVA, E. Effects of psychopharmacotherapy on phenotypic expression of Cytochrome P450 D6 in patients genotyped for CYP2D6 mutations. *Human Psychopharmacology Clinical and Experimental*, v. 15, p. 303-305, 2000.
- ZHU, B., OU-YANG, D. S., CHEN, X. P., HUANG, S. L., TAN, Z. R., HE, N., ZHOU, H. H. Assesment of Cytochrome P450 activity by a five drug cocktail approach. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 70, n. 5, p. 455-461, 2001.

**Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados**

Rafael Linden\* e Sander Sartori

Curso de Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário Feevale, Rodovia RS 239, n. 2755, Novo Hamburgo, RS, CEP 93352-000, Brasil

Estefânio Kellermann

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

André Arigony Souto

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Prédio 12, Bloco C, Sala 243, Porto Alegre, RS, CEP 90619-900, Brasil

[rafael.linden@feevale.br](mailto:rafael.linden@feevale.br)

*Artigo aceito para publicação em Química Nova em 09/05/2006.*

*Publicado na web em 31/10/2006.*

## **Substance identification in systematic toxicological analysis using a computer system for chromatographic parameter calculation and database retrieval**

### **Abstract**

Besides the availability of large databases of chromatographic data obtained in several standardized systems, one major task in systematic toxicological analysis is how to handle the experimental data and retrieve the large available databases in a meaningful and productive way. To achieve this purpose, our group proposed an Internet based tool using previously published STA databases, which interlaboratorial reproducibility has already been evaluated. The developed software has the capacity to calculate corrected chromatographic parameters, after the input of data obtained with standard mixtures of calibrators, and retrieve the databases, currently incorporating TLC, color reactions, GC and HPLC data. At the end of the process, a list with candidate substances and their similarity indexes are presented.

**Keywords:** systematic toxicological analysis, database retrieval, chromatography

## Introdução

A identificação de substâncias de interesse toxicológico em amostras biológicas representa um desafio significativo, considerando a grande e crescente quantidade de substâncias potencialmente presentes, bem como a complexidade das matrizes e, freqüentemente, a disponibilidade de quantidades limitadas de amostra. Esse problema torna-se especialmente complexo quando se tem pouca ou nenhuma informação sobre o histórico do paciente ou da amostra, situação comum na toxicologia clínica e forense. Desta forma, este tipo de análise requer uma abordagem concisa e planejada, denominada Análise Toxicológica Sistemática (ATS)<sup>1,2</sup>.

A ATS pode ser definida como a busca químico-analítica em diferentes matrizes (sangue, plasma, tecidos) por substâncias potencialmente tóxicas, cuja presença é incerta e sua identidade é desconhecida<sup>1,2,3,4</sup>. O objetivo final da ATS é a exclusão de todas as substâncias potencialmente contidas na amostra, com a exceção das efetivamente presentes. Ou seja, a identificação positiva ocorre quando os dados analíticos são compatíveis com uma determinada substância e incompatíveis com todas as demais substâncias possivelmente presentes na amostra, tais como metabólitos, compostos endógenos e demais interferentes<sup>5</sup>.

A ATS possui três fases, a saber: a) preparação da amostra, isolamento e concentração dos analitos; b) detecção e diferenciação, e c) identificação<sup>1,2</sup>.

A identificação de substâncias em ATS é realizada através da comparação do seu comportamento em um determinado sistema analítico, estritamente padronizado, com dados presentes em bases de dados cuja reprodutibilidade interlaboratorial é conhecida. Considerando o grande número de analitos que

potencialmente devem ser identificados em uma análise de triagem toxicológica (fármacos e metabólitos, praguicidas, produtos químicos de uso industrial e outros), que pode chegar a vários milhares de substâncias, é improvável que laboratórios individuais criem e mantenham bases de dados suficientemente amplas<sup>1,2,5,6</sup>. Desta forma, a disponibilidade de bases de dados aplicáveis interlaboratorialmente é fundamental em análise toxicológica sistemática.

Apesar da disponibilidade de métodos analíticos modernos de elevada sensibilidade e especificidade, tais como a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em tandem (CL-EM/EM)<sup>7,8</sup> e espectrometria de massas por tempo de voo (CL-TDV)<sup>9</sup>, a maior parte dos laboratórios de toxicologia analítica ainda utilizam métodos clássicos como a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) com detectores não-espectrométricos, como os de ionização em chama (DIC) e nitrogênio-fósforo (DNP), e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção de radiação ultravioleta (CLAE-UV)<sup>2,5,6</sup>.

Considerando a necessidade da existência de sistemas de ATS robustos associados a amplas bases de dados de comportamento analítico, o comitê de análise toxicológica sistemática da *International Association of Forensic Toxicologists* (TIAFT) fomentou estudos de padronização de diversas metodologias para utilização interlaboratorial em ATS, bem como a geração de amplas bases de dados. Como resultado deste trabalho foram publicadas bases de dados com métodos e dados analíticos utilizando CCD e CG<sup>3,4</sup>. Posteriormente, diversos autores propuseram metodologias de ATS utilizando CLAE, especialmente com detectores de arranjo de diodos (DAD)<sup>10-22</sup>.

Na identificação toxicológica baseada em bases de dados, deve-se levar em consideração que somente compostos cujos dados estejam inseridos na base em

utilização poderão ser identificados. Também, considerando o grau de especificidade de cada método, bem como a existência de variabilidades interlaboratoriais, representadas pelos desvios-padrões interlaboratoriais de cada sistema analítico, é necessária a associação de dados obtidos em diferentes sistemas para uma identificação efetiva. Também deve se considerar que o número de sistemas necessários para identificação inequívoca aumenta com o número de substâncias presentes na população tomada em consideração<sup>1,2</sup>.

Apesar da existência de sistemas altamente reproduzíveis do ponto de vista interlaboratorial, o manuseio dos dados obtidos é problemático. Embora a base teórica da identificação de compostos através da busca em bases de dados esteja estabelecida<sup>1,2,3,4,36</sup>, sua implementação prática apresenta dificuldades. Especialmente, a busca manual em diferentes listas de substâncias-candidato, quando vários métodos são associados à uma mesma amostra, não é produtiva.

Com o propósito de permitir a utilização dos sistemas padronizados de ATS já existentes foi proposto um sistema informatizado, acessível através da internet, para cálculo de parâmetros cromatográficos, busca em base de dados e cálculo de índices de similaridade em análise toxicológica sistemática. Cabe destacar que atualmente não está disponível outro sistema com estas características.

### **Avaliação estatística dos sistemas empregados em ATS**

Um método de identificação em ATS pode ser avaliado por diferentes parâmetros estatísticos, como o poder discriminante (PD) e o comprimento médio da lista (CML)<sup>3,23,24</sup>.

O poder discriminante (PD) é definido como a probabilidade de que duas substâncias selecionadas aleatoriamente possam ser separadas pelo sistema empregado. Se os parâmetros de retenção estão dentro de uma determinada janela de busca, eles são considerados indiscriminados ou agrupados e o conjunto de agrupamentos para todas as substâncias no sistema é denominado M. O número de agrupamentos possíveis é  $N(N-1)/2$ , onde N é o número total de substâncias no sistema. Então, a probabilidade de dois fármacos selecionados aleatoriamente estarem agrupados é  $2M/N(N-1)^{3,23,24}$ . O poder discriminante é expresso pela equação 1.

$$PD = 1 - \left( \frac{2M}{N(N-1)} \right)$$

equação 1

No cálculo de PD, assume-se que os dados obtidos em um procedimento laboratorial para uma determinada substância apresentam flutuações inter-dias e inter-laboratórios e que estas flutuações seguem um determinado padrão. Assume-se, também, que o parâmetro de retenção avaliado segue uma distribuição normal com referência ao valor médio listado na base de dados previamente construída e que possui um desvio-padrão determinado, dependente daquele sistema. Quanto maior a diferença entre o valor do parâmetro avaliado com aquele da base de dados, menor será a probabilidade de identificação positiva. Após uma normalização de tal forma que a soma das probabilidades seja 1, as substâncias podem ser ordenadas em uma ordem decrescente de probabilidade<sup>3</sup>.

O conceito do comprimento médio da lista (CML) foi apresentado em 1983 por SCHEPERS e colaboradores<sup>23</sup>. Nesta abordagem estatística, é estabelecido o número de substâncias que são qualificáveis para um determinado parâmetro em um dado sistema. O número de substâncias qualificadas é chamado de comprimento da lista. O CML também pode ser determinado para combinações de sistemas. O ótimo é obtido quando obtém-se um CML de 1. Para o cálculo do CML, assume-se que os valores numéricos de qualquer parâmetro de identificação, medidos diversas vezes, seguem uma distribuição normal. Quando um certo limite de probabilidade é estabelecido, todos os padrões que se qualificam formam uma lista. Quanto menor esta lista, mais poderoso é o sistema de identificação<sup>23,24</sup>. A partir da média dos valores de comprimento de lista, calcula-se o CML segundo a equação 2.

$$CML = \frac{\sum_{i=1}^n CL_i}{n}$$

equação 2

Onde: CL é o comprimento da lista para cada composto e n é o número de compostos da base de dados.

Quanto menor o CML, mais adequado para ATS é o sistema avaliado. O cálculo pode ser realizado para sistemas individuais bem como para combinação de sistemas, incluindo modos de detecção. O sistema analítico ideal possui um CML de 1, que significa que todas as substâncias de uma população são identificadas inequivocamente<sup>2</sup>.

## Detecção e diferenciação por cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada é uma técnica popular para identificação de substâncias em toxicologia analítica devido à sua velocidade, confiabilidade e baixo custo. Além de permitir a separação dos compostos, através da variação tanto da fase estacionária quanto da fase móvel, a facilidade de aplicação de diferentes reagentes cromogênicos proporciona a obtenção de dados adicionais.

O parâmetro de identificação usual em CCD é o fator de retardamento ( $R_f$ ), o qual é freqüentemente expresso multiplicado por 100 ( $hR_f$ ). Os valores de  $hR_f$  são influenciados por diversos fatores tais como temperatura e umidade ambiental, tamanho da placa, saturação da cuba cromatográfica e quantidade de amostra aplicada. Com o propósito de minimizar a influência das condições ambientais nos valores do parâmetro de identificação em CCD, as bases de dados empregadas utilizam o  $hR_f$  corrigido ( $hR_{fc}$ ), parâmetro de identificação proposto inicialmente por Galanos e Kapoulas<sup>25</sup>. Diferentemente do fator de retardamento relativo ( $hR_{rel}$ ), o  $hR_{fc}$  é calculado tomando duas substâncias como referências. Os valores de  $hR_{fc}$  tem se mostrado extremamente estáveis interlaboratorialmente, mesmo em condições climáticas muito diversas<sup>3,26,27,28,29</sup>.

O  $hR_{fc}$  é obtido ao analisar uma amostra da substância desconhecida, em qualquer um dos sistemas de CCD propostos, juntamente com o conjunto adequado de marcadores. A partir dos valores obtidos de  $R_f$  para a substância desconhecida e para os marcadores e dos valores tabelados de  $hR_{fc}$  para os marcadores, pode se calcular o valor de  $hR_{fc}$  do desconhecido, conforme a equação 3<sup>1,2,3</sup>. A TIAFT publicou uma base de dados para 10 sistemas de CCD, apresentados na tabela 1<sup>1,2,3</sup>.

Tabela 1. Sistemas padronizados para ATS por cromatografia em camada delgada

Sistema	Eluente	Adsorvente	Marcadores	hR <sub>f</sub> c	Janela de busca
CCD 1	Clorofórmio:Acetona (80 + 20)	Sílica	Paracetamol Clonazepan Secobarbital Metil-fenobarbital	15 35 55 70	7
CCD 2	Acetato de Etila	Sílica	Sulfatiazol Fenacetina Salicilamida Secobarbital	20 38 55 68	8
CCD 3	Clorofórmio:Metanol (90 + 10)	Sílica	Hidroclorotiazida Sulfafurazol Fenacetina Prazepan	11 33 52 72	8
CCD 4	Acetato de Etila:Metanol:Amônia (85 + 10 + 5)	Sílica	Atenolol Codeína Carbamazepina Diazepam	22 35 56 76	8
CCD 5	Metanol	Sílica	Codeína Trimipramina Hidroxizina Diazepam	20 36 56 82	9
CCD 6	Metanol:n-butanol (60 + 40); NaBr 0,1 M	Sílica	Codeína Difenilhidramina Quinina Diazepam	22 48 65 85	9
CCD 7	Metanol:Amônia (100 + 1,5)	Sílica impregnada c/ KOH 0,1 M e seca	Atropina Codeína Cloroprotixeno Diazepam	18 33 56 75	8
CCD 8	Ciclohexano:tolueno:dietilamina (75 + 15 + 10)	Sílica impregnada c/ KOH 0,1 M e seca	Codeína Desipramina Prazepan Trimipramina	6 20 36 62	11
CCD 9	Clorofórmio:Metanol (90 + 10)	Sílica impregnada c/ KOH 0,1 M e seca	Desipramina Fisostigmina Trimipramina Lidocaína	11 36 54 71	11
CCD 10	Acetona	Sílica impregnada c/ KOH 0,1 M e seca	Amitriptilina Procaína Papaverina Cinarizina	15 30 47 65	9

Em um enfoque probabilístico, todas as substâncias presentes na base de dados com valor do parâmetro de identificação dentro de uma faixa ao redor do valor de  $hR_{fc}$  da substância desconhecida são potenciais candidatos, com probabilidades menores à medida que o valor tabelado se afasta do  $hR_{fc}$  do composto desconhecido. Usualmente, leva-se em consideração todas as substâncias na faixa que compreende três vezes o valor do desvio-padrão interlaboratorial associado às medidas do sistema analítico utilizado, denominada janela de busca<sup>5</sup>.

$$hR_{fc}(X) = hR_{fc}(A) + \frac{[hR_{fc}(B) - hR_{fc}(A)]}{[hR_f(B) - hR_f(A)]} \bullet [hR_f(X) - hR_f(A)]$$

equação 3

Onde: X refere-se à substância desconhecida e A e B, aos padrões que eluem imediatamente antes e depois do desconhecido e  $hR_f$  é o fator de retardamento.

Uma forma de aumentar a capacidade de identificação em CCD é a utilização de um sistema de identificação com alguma capacidade discriminante. Uma alternativa simples é a utilização de reações de cor, devidamente codificadas. Nesta abordagem, as placas cromatográficas são submetidas à reações de cor seqüenciais com registro das cores obtidas em cada estágio, as quais são comparadas com aquelas presentes na base de dados. Assim, além do valor de  $hR_{fc}$ , as substâncias também podem ser classificadas com base nas cores obtidas. As cores obtidas após o processo de revelação são classificadas em 10 códigos, a saber: 0 para branca, 1 para amarela, 2 para laranja, 3 para marrom, 4 para vermelha, 5 para violeta, 6 para preta, 7 para azul, 8 para azul-esverdeada e 9 para

verde. Esta metodologia permite ampliar substancialmente o poder de identificação em CCD<sup>30</sup>.

A seqüência de reações de cor propostas por HEGGE e colaboradores<sup>30</sup> é: a) expor à vapores de formaldeído 37% e imergir ou borrifar com reagente de Mandelin (metavanadato de amônio 0,1% em ácido sulfúrico concentrado); b) imergir em água; c) observar sob radiação UV com comprimento de onda de 366 nm e d) imergir ou borrifar com reagente de Dragendorff (subnitrato de bismuto, iodo e iodeto de potássio em meio ácido). Esta seqüência de revelação deve detectar compostos com grande diversidade funcional como alcalóides, anfetaminas, opiáceos e outros de interesse toxicológico. Após cada estágio da seqüência de revelação, as cores são classificadas em uma escala de 0 a 9.

### **Detecção e diferenciação por cromatografia gasosa**

A cromatografia gasosa tem sido amplamente empregada em triagem toxicológica por sua elevada capacidade de separação e reprodutibilidade. O parâmetro de identificação deve ser um valor relativamente independente das condições cromatográficas, exceto da natureza da fase estacionária e da própria substância. O parâmetro mais reprodutível interlaboratorialmente, e portanto mais adequado para utilização em bases de dados, é o índice de retenção linear ( $I^T$ ), segundo Kovats<sup>1,4</sup>.

No caso da análise toxicológica sistemática por CG, são obtidas curvas com valores de  $I^T$  tabelados dos fármacos utilizados como referência contra seus tempos de retenção obtidos no sistema padronizado, empregando-se temperatura programada e colunas capilares. Sob essas condições, obtém-se um gráfico quase

linear, sendo o  $I^T$  de uma substância desconhecida determinado por interpolação linear entre duas substâncias de referência adjacentes ou através da equação 4<sup>4,31</sup>.

$$I^T = (t_x - t_0) \cdot \frac{(I^T_{n+1} - I^T_n)}{(t_{n+1} - t_n)} + I^T_n$$

equação 4

Onde:  $t_x$  é o tempo de retenção da substância X,  $t_0$  é o tempo de retenção de uma substância não-retida pela coluna cromatográfica,  $t_n$  e  $t_{n+1}$  são os tempos de retenção dos marcadores que eluem antes e depois do analito, e  $I^T_n$  e  $I^T_{n+1}$  são os índices de retenção lineares dos marcadores que eluem antes e depois do analito

A TIAFT também publicou uma base de dados de índices de retenção de mais de 4000 substâncias, obtidas em colunas capilares com fase estacionária de dimetilsilicone.<sup>4</sup> Para a utilização dos dados desta base é importante reproduzir fielmente a metodologia empregada, especialmente com respeito à programação de temperatura. As condições cromatográficas recomendadas utilizam coluna dimetilsilicone com 10-15 metros de comprimento com 0,32 ou 0,53 mm de diâmetro interno e programação de temperatura variando entre 135°C e 312°C<sup>4,31</sup>. Para o cálculo dos índices de retenção linear são utilizadas misturas contendo 10-15 fármacos, denominados marcadores de retenção, com tempos de retenção dispersos ao longo do tempo de duração da análise<sup>4</sup>.

Adicionalmente, também foi gerada uma biblioteca de índices de retenção de solventes e outras substâncias voláteis em um sistema padronizado de CG, por MACHATA<sup>32</sup>.

Os valores de  $I^T$  calculados para as substâncias desconhecidas empregando-se as misturas de drogas sugeridas são comparados com os valores de  $I^T$  tabelados utilizando-se uma janela de busca de aproximadamente 20-25 unidades de  $I^T$  <sup>2,4</sup>.

### **Detecção e diferenciação por cromatografia líquida de alta eficiência**

Através da CLAE é possível analisar compostos distribuídos em uma ampla faixa de polaridade, massa molecular e labilidade térmica. A compatibilidade da fase móvel com as matrizes biológicas aquosas faz a preparação da amostra mais simples, rápida e, por consequência, facilmente automatizável. Por outro lado, a resolução da CLAE é geralmente baixa quando comparada com a CG e por isso o poder de identificação da CLAE, utilizando somente parâmetros de retenção, é considerado levemente inferior à associação de análises, em paralelo, por CG e espectroscopia UV. Contudo, a baixa seletividade do UV pode ser útilmente explorada em ATS para a detecção de metabólitos, que freqüentemente mantêm características espectrais semelhantes aos compostos originais<sup>10,33,34</sup>. A utilização de CLAE em fase reversa e eluição por gradiente é a estratégia mais freqüentemente adotada em ATS, possibilitando a separação de um grande número de compostos com diferentes características físico-químicas, em um único desenvolvimento cromatográfico<sup>34</sup>. Entretanto, a eluição isocrática tem suas vantagens visto que o comportamento de retenção é mais reprodutível e o *background* devido à contribuição espectral da fase móvel é constante ao longo da corrida, otimizando o processo de quantificação. Assim, abordagens alternativas à eluição por gradiente têm sido adotadas, com a utilização de combinações de

sistemas isocráticos para permitir a identificação de substâncias de características físico-químicas bastante diversas<sup>10, 33, 34</sup>.

Com a utilização de detectores de arranjo de diodos (DAD), a estratégia mais comum é utilizar os dados de retenção como um pré-filtro de possíveis candidatos, submetendo os compostos que eluem em uma determinada janela de tempo a uma busca em biblioteca espectral. As rotinas de comparação espectral normalmente são precedidas da avaliação da pureza espectral dos picos<sup>10,33, 34, 35</sup>.

Uma alternativa para gerar dados comparáveis interlaboratorialmente em CLAE é a utilização de índices de retenção linear<sup>11,12</sup>. O conceito de índices de retenção, primeiramente desenvolvido para sistemas de CG, também foi aplicado em CLAE. Diversas séries homólogas de compostos foram avaliadas como escalas de índices de retenção para CLAE-UV, especialmente alcan-2-onas, alquilarilcetonas e 1-nitroalcanos. A escala de 1-nitroalcanos demonstrou algumas vantagens. Os homólogos menores, ao contrário das alquilarilcetonas, têm fatores de retenção similares a fármacos polares, são menos reativos e possuem maior absorvância que as alcan-2-onas. A variabilidade dos  $I^T$ , em condições de gradiente, é muito menor que outros parâmetros de retenção. Assim, o conceito de índices de retenção corrigidos foi introduzido e aplicado inicialmente para uma escala de alquilarilcetonas, e posteriormente para a escala de 1-nitroalcanos<sup>11</sup>. Nesta abordagem, assume-se que as diferenças nos valores de  $I^T$  obtidos pelas mesmas substâncias em diferentes colunas pode ser normalizado pelo escalonamento dos resultados usando padrões de fármacos de referência com índices de retenção conhecidos. Duas escalas são utilizadas, uma para compostos ácidos e neutros e outra para compostos básicos. Assume-se que a reprodutibilidade destes  $I^T$  é constante em toda a faixa, permitindo o cálculo de índices de similaridade<sup>2,11, 12, 31</sup>.

Analogamente ao procedimento utilizado em CG, são empregadas misturas contendo 6 a 8 fármacos como marcadores de retenção. A janela de busca usual é de cerca de 8 unidades de  $\bar{I}^T$ <sup>11,12</sup>.

Também foram publicados diversos trabalhos utilizando bases de dados de retenção cromatográfica em CLAE baseadas em tempo de retenção relativo (r). O r é definido como a razão entre o tempo de retenção ajustado de um composto e o tempo de retenção ajustado de uma substância de referência, nas mesmas condições analíticas<sup>10</sup>.

BOGUSZ e WU<sup>11</sup> e PRAGST e colaboradores<sup>10</sup> publicaram abrangentes bases de dados de  $\bar{I}^T$  e r, respectivamente, para análise toxicológica por CLAE. BOGUSZ e WU<sup>11</sup> recomendaram um sistema de CLAE com eluição por gradiente utilizando diferentes proporções de acetonitrila e tampão fosfato trietilamônio pH 3,0, em colunas de fase reversa, a partir do qual foi gerada uma coleção com cerca de 800 índices de retenção. PRAGST e colaboradores<sup>10</sup> empregaram uma fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato pH 3,0 (37:63 v/v) com fase estacionária octilsilica. Desta forma, foi desenvolvida uma biblioteca de tempos de retenção relativos bem como de espectros de ultravioleta na faixa de 195 a 380 nm para mais de 2600 compostos.

### **Identificação dos analitos**

Após a etapa de obtenção de dados analíticos, que compreende a preparação da amostra, seleção dos sistemas analíticos apropriados e a realização das análises, procede-se o tratamento dos dados. Este tratamento se inicia pelo cálculo

dos parâmetros de identificação corrigidos, tais como  $hR_{fc}$ ,  $\bar{I}^T$  ou  $r$ . Considerando que estes parâmetros são comparáveis interlaboratorialmente, é possível realizar a busca nas bases de dados. Utilizando um enfoque probabilístico, todas as substâncias presentes na base de dados que se encontrem dentro da janela de erro qualificam-se para ser identificadas como o desconhecido, apenas com probabilidades diferentes, seguindo uma distribuição normal. Para cada uma das substâncias inseridas na faixa da janela de erro, a probabilidade é calculada pela equação 5<sup>1,2,37</sup>. O valor obtido, multiplicado por 100, é denominado índice de similaridade (IS).

$$P(x_{ij}) = \frac{1}{s \cdot \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left[ \frac{(x_{ij} - x_j)}{s} \right]^2}$$

equação 5

Onde:  $x_{ij}$  é o valor do parâmetro de identificação determinado para o composto desconhecido,  $x_j$  é o valor da substância presente na base de dados com a qual está sendo feita a comparação e  $s$  é o desvio-padrão interlaboratorial do parâmetro de identificação.

Quando apenas um sistema analítico é utilizado, um grande número de substâncias se qualificarão, não permitindo uma identificação satisfatória. Alternativamente, com a utilização de múltiplos sistemas analíticos, somente compostos presentes simultaneamente nas diversas listas de substâncias-candidato apresentarão valores de IS elevados. Este fato é demonstrado na simulação apresentada na tabela 1.

Um caso particular ocorre na CCD associada à reações de cores padronizadas. A similaridade com relação aos códigos de cores é dada pela distância entre as cores, considerando uma distribuição “circular”. Neste caso, o  $IS_{CCD}$  é obtido pela equação 6, com pesos diferentes para os índices de similaridade obtidos pela comparação de  $hR_{fc}$  e códigos de cores (CC)<sup>37</sup>.

$$IS_{CCD} = \sqrt[3]{IS_{RF} \cdot \sqrt[2]{IS_{CC1} \cdot IS_{CC2} \cdot IS_{CC3} \cdot IS_{CC4}}}$$

equação 6

Onde:  $IS_{RF}$  é o índice de similaridade obtido utilizando  $hR_{fc}$  e  $IS_{CC}$  são os índices de similaridade utilizando os códigos de cores na seqüência de reações de cor padronizadas

O índice de similaridade final é obtido através da média geométrica dos índices de similaridade obtidos para cada sistema analítico. Na equação 10 é apresentado o cálculo do índice de similaridade associando dados obtidos por CCD, CG e CLAE.

$$IS = \sqrt[3]{IS_{CCD} \cdot IS_{CG} \cdot IS_{CLAE}}$$

equação 10

Onde:  $IS_{CCD}$  é o índice de similaridade obtido através do sistema padronizado de CCD,  $IS_{CG}$  é o índice de similaridade obtido através do sistema padronizado de CG e  $IS_{CLAE}$  é o índice de similaridade obtido através do sistema padronizado de CLAE

## **Apresentação do sistema informatizado para análise toxicológica sistemática**

Com o propósito de permitir a realização de procedimentos de análise toxicológica sistemática de forma eficiente e produtiva, foi desenvolvido um Sistema de Análise Toxicológica Sistemática (SATS) acessível através da internet ([www.feevale.br/toxicologia/ats](http://www.feevale.br/toxicologia/ats)) que permite o cálculo dos parâmetros de retenção cromatográfica ajustados em sistemas de CCD, CG e CLAE e a busca produtiva em bases de dados de comportamento cromatográfico. Este sistema incorpora bases de dados previamente publicadas que incluem 10 sistemas de CCD (nomeados CCD 1 a CCD 10)<sup>3</sup>, 1 sistema de reações de cor codificadas (nomeado CC)<sup>3</sup>, 1 sistema de CG (nomeado CG 1 – IR)<sup>4</sup> e 2 sistemas de CLAE (nomeados CLAE 1 – IR e CLAE 2 – TRR)<sup>10, 11</sup>.

O SATS foi desenhado e construído para a plataforma Windows (Windows Server, SQL Server, Internet Information Services e Active Server Pages - ASP). A construção do sistema seguiu modelos de desenvolvimento consolidados onde o banco de dados apresenta-se no formato cliente/servidor (SQL Server). O processamento utiliza procedimentos armazenados no banco de dados e o ASP implementa a interface e parte do processamento.

O uso do SATS é gratuito, permitindo a geração de uma senha individual após o cadastramento do usuário na opção *login/novo*, na barra de opções superior. Usuários cadastrados também podem realizar busca sobre os dados armazenados no sistema sobre uma dada substância utilizando a opção *busca* na barra de opções superior, bem como consultar os resultados de suas análises anteriores.

Para o processamento dos dados de uma análise, o usuário deve selecionar *inicia análise* na barra de opções superior. Após o cadastramento da análise, são apresentados os sistemas analíticos disponíveis para seleção (figura 1). Selecionando a opção *avançar* são apresentadas as telas de entrada de dados para cada sistema analítico previamente selecionado, onde são inseridos os dados obtidos para os marcadores e para os desconhecidos. O usuário também pode modificar os valores das janelas de busca. A figura 2 apresenta a tela de entrada de dados para o sistema CCD 4, e a figura 4 apresenta a tela de entrada de dados para o sistema CLAE 2 – TRR. Após a conclusão da entrada dos dados e a seleção da opção *finaliza*, é apresentada uma lista de substâncias candidato com seus respectivos índices de similaridade, conforme a figura 5. Utilizando o nome de usuário [visitante@feevale.br](mailto:visitante@feevale.br) e a senha 1234 é possível visualizar um exemplo de análise utilizando o sistema. Para tanto, é necessário selecionar a opção *lista análise* na barra de opções e a opção *acessar* ao lado da identificação das análises cadastradas.



**Sistema de Análise Toxicológica Sistemática Feevale**

Apresentação   Sistemas   Busca   Inicia Análise   Lista Análise   Administração   Contato   Login

---

**Identificação da Análise**

**Caso**  
(18) exemplo sats

**Analista**  
Rafael Linden

**Histórico**  
exemplo sats

**Seleção Sistema Padronizado**

<input type="checkbox"/>	CCD 1	Eluente: clorofórmio:acetona (80:20)	Substâncias 341
<input type="checkbox"/>	CCD 2	Eluente: acetato de etila	Substâncias 556
<input type="checkbox"/>	CCD 3	Eluente: clorofórmio:metanol (90:10)	Substâncias 363
<input checked="" type="checkbox"/>	CCD 4	Eluente: acetato de etila: metanol: amônia concentrada (85:10:5)	Substâncias 1399
<input checked="" type="checkbox"/>	CCD 5	Eluente: metanol	Substâncias 1291
<input type="checkbox"/>	CCD 6	Eluente: metanol: n-butanol (60:40) ; 0,1 M NaBr	Substâncias 535
<input type="checkbox"/>	CCD 7	Eluente: metanol: amônia concentrada (100:1,5)	Substâncias 907
<input type="checkbox"/>	CCD 8	Eluente: ciclohexano: tolueno: dietilamina (75:15:10))	Substâncias 1117
<input type="checkbox"/>	CCD 9	Eluente: clorofórmio: metanol (90:10)	Substâncias 817
<input type="checkbox"/>	CCD10	Eluente: acetona	Substâncias 814

**Seleção Sistema Padronizado**

<input type="checkbox"/>	CLAE 1 - IR	Coluna: Superspher® 100 RP-18, com diâmetro de partícula 4µm, fully end capped, 125 x 4 mm. Eluente: Eluição por gradiente com uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato trietilamônio (25 mM, pH 3,0). O gradiente foi: 0-70% acetonitrila em 30 minutos e 5 minutos em 70% de acetonitrila.	Substâncias 865
<input checked="" type="checkbox"/>	CLAE 2 - TRR	Coluna: Lichrospher® 100 RP-8, com diâmetro de partícula 5µm,fully end capped, 250 x 4 mm. Eluente: Eluição isocrática utilizando uma mistura de acetonitrila (37%) e tampão fosfato pH 2,3 (67%).	Substâncias 2644

Figura 1. Tela de seleção dos sistemas analíticos disponíveis no sistema

O SATS realiza as seguintes operações com os dados fornecidos pelo usuário:

- a) Cálculo de parâmetros de retenção corrigidos para substâncias desconhecidas para cada um dos sistemas analíticos ( $hR_{fc}$ ,  $I^T$  e  $r$ ), a partir da inserção dos dados obtidos na utilização dos sistemas padronizados. O usuário deve informar os valores obtidos para os marcadores e as substâncias desconhecidas, em cada sistema empregado, conforme apresentado na figura 2 para o sistema de CCD 4 e na figura 3 para o sistema CLAE 2 - TRR. O usuário pode modificar os marcadores, selecionando substâncias que estejam disponíveis em seu laboratório, e a janela de erro, que corresponde ao desvio-padrão interlaboratorial do parâmetro de retenção multiplicado por três. Nos sistemas de CCD, o sistema também permite a inserção dos códigos de cores, selecionados em uma palheta.
- b) Cálculo do IS para cada sistema analítico, utilizando a equação 5.
- c) Diferentes combinações entre os sinais analíticos encontrados. Por exemplo, se forem empregados três sistemas analíticos, com duas substâncias desconhecidas em cada sistema, existem 8 combinações de manchas e/ou picos que devem ser levadas em consideração.
- d) Associações entre os IS obtidos em cada sistema analítico, calculando o IS resultante da associação dos diferentes métodos utilizando as equações 6 e 7.
- e) Apresentação da listagem de substâncias-candidato, para cada combinação possível, ordenadas por IS (figura 5). Na tela de apresentação dos resultados também são apresentados o número de sistemas analíticos nos quais estão inseridos dados de cada substância candidato e o número de registro da substância no *Chemical Abstracts Service*.
- f) Definição de IS% mínimos para apresentação dos resultados. Os valores de corte podem ser selecionados entre 5, 25, 45 e 65%.

f) Definição de combinações de referência, permitindo o reprocessamento dos dados e a apresentação somente de combinações compatíveis com a referência.

**Sistema de Análise Toxicológica Sistemática Feevale**

Apresentação   Sistemas   Busca   Inicia Análise   Lista Análise   Administração   Contato   Login

**Sistema Analítico:** CCD  
**Sistema Padronizado:** CCD 4  
 Eluente: acetato de etila: metanol: amônia concentrada (85:10:5)

**Janela de Busca:** 10  
 Atualiza

**Marcadores**

Substância	hRf medido	hRfc tabelado
01 Atenolol( 22.00)	23	22
02 Codeine( 35.00)	36	35
03 Carbamazepine( 56.00)	55	56
04 Diazepam / Ketazolam M / Medazepam M( 76.00)	77	76

Atualiza

**Desconhecidos**

Informe dados da substância desconhecida	hRf medido	Cor Medida 1	Cor Medida 2	Cor Medida 3	Cor Medida 4	hRfc calculado
		ñ medido	ñ medido	ñ medido	ñ medido	Inserir
Desconhecido #1	42	3	3	3	3	41.63
Excluir Desconhecido #2	68	3	3	4	3	67.82

Avançar   Atualiza

Figura 2. Tela de entrada de dados no sistema, referente ao sistema CCD 4

## Simulação da utilização do SATS

Na tabela 2 são apresentados os dados obtidos na utilização do SATS, com dados tabelados do antidepressivo tricíclico imipramina (figura 3), utilizando diferentes sistemas analíticos padronizados.

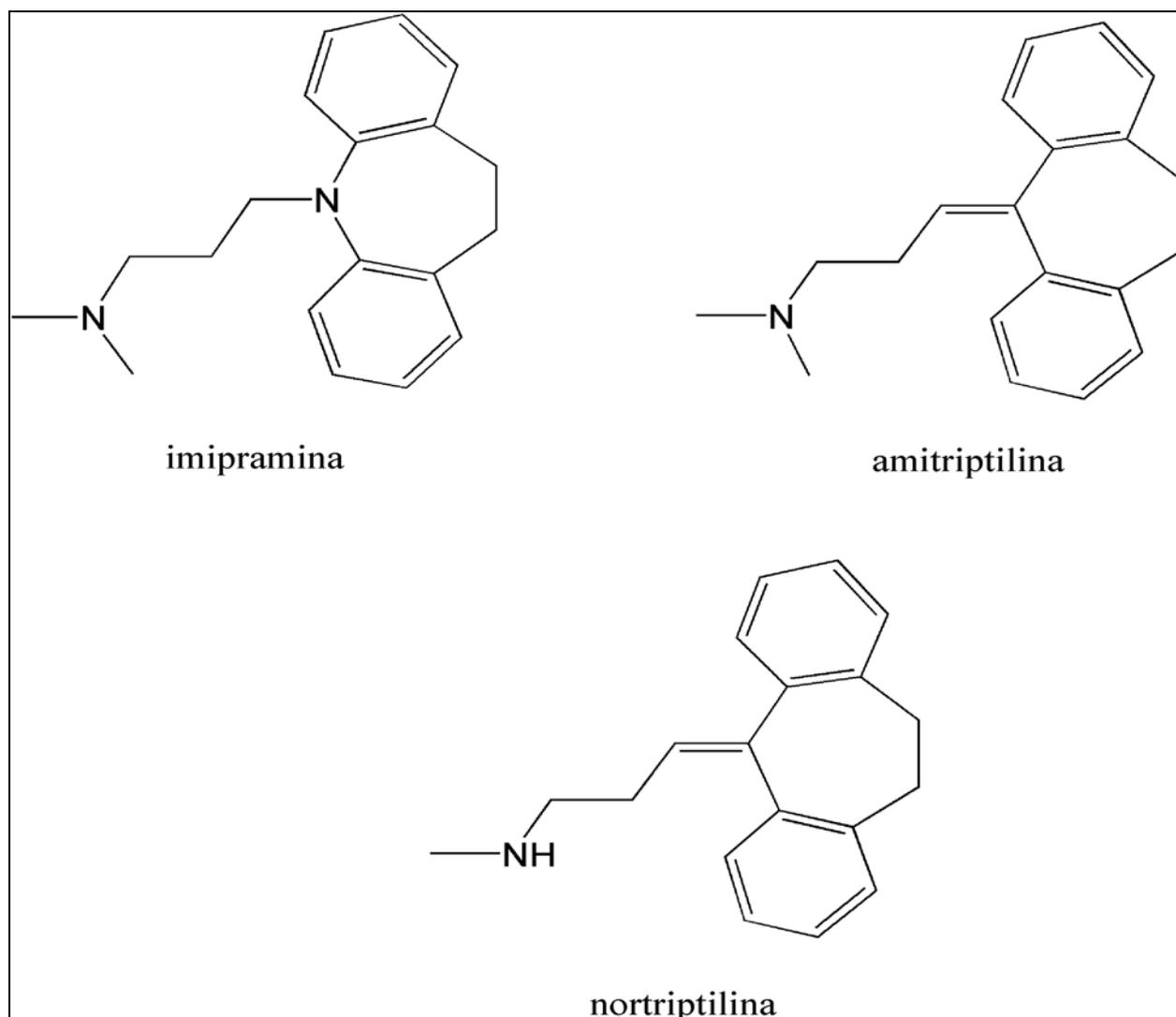


Figura 3. Estruturas químicas dos antidepressivos tricíclicos imipramina, amitriptilina e nortriptilina

Quando apenas o sistema CCD 4 é utilizado, mais de 50 compostos presentes na base de dados se qualificam como a substância desconhecida com similaridades superiores à 65%. Ao associar-se o sistema CCD 5, aos dados previamente obtidos, apenas 6 substâncias se qualificam com IS superiores à 65%. Com a adição do sistema CCD 7, apenas 2 substâncias apresentam IS superior à 65% e a adição dos códigos de cores permitiu diferenciar a imipramina de todas as outras substâncias presentes na base de dados. Também, pode-se observar que a combinação de dois métodos instrumentais, CLAE 2 - TRR e CG 1 -IR, apresenta resultados muito similares à associação de três sistemas de CCD com reações de cor seqüenciais na placa cromatográfica.

Tabela 2. Resultados obtidos no SATS, utilizando dados tabelados do antidepressivo tricíclico imipramina

Sistemas analíticos empregados	Candidatos apresentados pelo SATS		
	IS > 5 %	IS > 45 %	IS > 65 %
CCD 4	>50	>50	>50
CCD 4 + CCD 5	>50	10	6
CCD 4 + CCD 5 + CCD 7	>50	5	2
CCD 4 + CCD 5 + CCD 7 + CC	27	1	1
CCD4 + CC + CG 1 -IR	14	2	1
CCD4 + CC + CLAE 2 - TRR	27	2	1
CLAE 2 – TRR + CG 1 -IR	27	1	1
CCD 4 + CC + CLAE 2 – TRR + CG 1 -IR	10	1	1

## **Utilização do SATS para triagem toxicológica em uma amostra de plasma humano**

Uma amostra de plasma adicionada com os antidepressivos tricíclicos amitriptilina e nortriptilina (figura 3), com concentrações de 5 µg/mL, foi submetida à extração em meio alcalino (pH 9,0) com uma mistura de hexano:acetato de etila (7:3). O extrato orgânico foi levado à secura e posteriormente submetido à análise toxicológica sistemática utilizando os sistemas padronizados CCD 4 e CCD 5 (com reações de cor seqüenciais) e CLAE 2- TRR.

Após a seleção dos sistemas analíticos padronizados, o usuário deve informar os valores obtidos com os marcadores em cada sistema. Também, é possível alterar os marcadores do sistema, bem como as janelas de erro. No sistema CCD 4 foram obtidas manchas com  $hR_{fc}$  42 e 68, com códigos de cor 3-3-3-3 e 3-3-4-3, respectivamente. No sistema CCD5, obteve-se  $hR_{fc}$  86 e 28, com códigos de cor 3-3-3-3 e 3-3-4-3, respectivamente. No sistema CLAE 2 – TRR foram obtidos picos com tempos de retenção de 12,3 e 14,5 minutos. A partir da entrada destes dados e dos dados dos marcadores, o SATS calculou os parâmetros de retenção corrigidos ( $hR_{fc}$  e  $r$ ). Na figura 2, é apresentada a entrada de dados para o sistema CCD 4. De forma análoga, foram lançados os dados do sistema CCD 5. A figura 4 apresenta a interface para entrada de dados do sistema CLAE 2 – TRR.

**Sistema de Análise Toxicológica Sistemática Feevale**

Apresentação   Sistemas   Busca   Inicia Análise   Lista Análise   Administração   Contato   Login

**Sistema Analítico:** CLAE

**Sistema Padronizado:** CLAE 2 - TRR  
 Coluna: Lichrospher® 100 RP-8, com diâmetro de partícula 5µm, fully end capped, 250 x 4 mm.  
 Eluente: Eluição isocrática utilizando uma mistura de acetonitrila (37%) e tampão fosfato pH 2,3 (67%).

Janela de Busca: 0.2

**Marcadores**

Substância	Tempo de Retenção medido	Tempo de Retenção Relativo tabelado
01 Histamine( 0.00)	1.75	0
02 Methylphenyl)-5-phenylhydantoin,5-(( 1.00)	11.8	1

**Desconhecidos**

Informe dados da substância desconhecida	Tempo de Retenção medido	Tempo de Retenção Relativo calculado
	<input type="text"/>	<input type="button" value="Inserir"/>
Desconhecido #1	14.5	1.23
<input type="button" value="Excluir Desconhecido #2"/>	12.3	1.04

Figura 4. Tela de entrada de dados no sistema, referente ao sistema CLAE 2 - TRR

Após processamento dos dados, foi obtida uma lista de candidatos conforme a figura 5. O SATS oferece a opção de modificar a porcentagem mínima para apresentação da relação de substâncias-candidato. Neste caso, foi utilizada uma porcentagem de corte de 45 %. Nesta análise, considerando a existência de dois compostos, existem 8 combinações de resultados possíveis. Os compostos amitriptilina e nortriptilina apresentaram índices de similaridade elevados (91,4 e 59,7%, respectivamente), com valores marcadamente superiores aos demais candidatos. Cabe salientar que as duas combinações são compatíveis.



## Sistema de Análise Toxicológica Sistemática Feevale

Apresentação   Sistemas   Busca   Inicia Análise   Lista Análise   Administração   Contato   Login

45% ▾ **Percentual de Corte das Substâncias Candidatas**

**Substâncias - Combinação#8**

Selecionar Somente Esta Combinação (e demais compatíveis)

Composição:  
 Desconhecido #2 do Sistema CCD 4  
 Desconhecido #2 do Sistema CCD 5  
 Desconhecido #1 do Sistema CLAE 2 - TRR

Sistemas	CasNr	Descricao	IS(%)
3	50-48-6	Amitriptyline	91.399934

1 Candidata(s) Encontrado(s)

**Substâncias - Combinação#3**

Selecionar Somente Esta Combinação (e demais compatíveis)

Composição:  
 Desconhecido #1 do Sistema CCD 4  
 Desconhecido #1 do Sistema CCD 5  
 Desconhecido #2 do Sistema CLAE 2 - TRR

Sistemas	CasNr	Descricao	IS(%)
3	72-69-5	Amitriptyline M (Nortriptyline)	59.664285

1 Candidata(s) Encontrado(s)

**Substâncias - Combinação#1**

Selecionar Somente Esta Combinação (e demais compatíveis)

Composição:  
 Desconhecido #1 do Sistema CCD 4  
 Desconhecido #1 do Sistema CCD 5  
 Desconhecido #1 do Sistema CLAE 2 - TRR

Nenhum Registro Encontrado

Figura 5. Tela com resultados finais da análise, apresentado as combinações possíveis e seus índices de similaridade

## **Conclusões**

A triagem toxicológica é uma das atividades fundamentais de qualquer laboratório de toxicologia clínica e forense. Uma das formas mais racionais para realização de triagens que compreendam um grande número de substâncias é a análise toxicológica sistemática. Entretanto, apesar da fundamentação científica da ATS, a sua aplicabilidade é limitada pela dificuldade associada ao tratamento dos dados obtidos e à busca simultânea em diversas bases de dados. Desta forma, a disponibilidade de um sistema informatizado para ATS representa uma alternativa valiosa para os toxicologistas analíticos. O sistema proposto, baseado em um enfoque probabilístico, permitiu identificar compostos de forma adequada, utilizando sistemas analíticos padronizados. Uma limitação natural é o universo restrito de compostos presentes na base de dados agregada ao sistema. O SATS possui propósitos educacionais, permitindo simulações variadas. Este sistema está acessível em [www.feevale.br/toxicologia/ats](http://www.feevale.br/toxicologia/ats), de forma gratuita. Uma característica vantajosa do SATS é permitir a identificação de um grande número de compostos utilizando métodos analíticos simples, mesmo com uma disponibilidade limitada de padrões analíticos. Entretanto, a efetividade deste sistema está associada à utilização de métodos estritamente padronizados, incluindo fases móveis e estacionárias e a realização de calibrações constantes.

## **Agradecimento**

Os autores agradecem as valiosas sugestões do Prof. Dr. Rokus de Zeeuw, do University Center for Pharmacy, Groningen State University, Groningen, Holanda.

## Referências

1. De Zeeuw, R. A. *J. Chromatogr. B.* **1997**, 689, 71.
2. De Zeeuw, R. A.; Hartstra, J.; Franke, J. P. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 674, 3.
3. De Zeeuw, R. A.; Franke, J. P.; Degel, F.; Machbert, G.; Schütz, H.; Wijsbeek, J. *Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems*; 2<sup>a</sup> ed., VCH Verlagsgemeinschaft: Weinheim, 1992.
4. De Zeeuw, R. A.; Franke, J. P.; Maurer, H. H.; Pflieger, K. *Gas Chromatographic Retention Indices of Toxicologically Relevant Substances on Packed or Capillary Columns with Dimethylsilicone Stationary Phases*; 3<sup>a</sup> ed., VCH Verlagsgemeinschaft: Weinheim, 1992.
5. De Zeeuw, R. A. *J. Chromatogr. B.* **2004**, 811, 3.
6. Hartstra, J.; Franke, J. P.; De Zeeuw, R. A. *J. Chromatogr. B.* **2000**, 739, 125.
7. Herrin, G.; McCurdy, H. H.; Wall, W. H. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, 29, 599.
8. Mueller, C. A.; Weinmann, W.; Dresen, S.; Schreiber, A.; Gergov, M. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2005**, 19, 1332.
9. Ojanpera, I.; Pelander, A.; Laks, S.; Gergov, M.; Vuori, E.; Witt, M. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, 29, 34
10. Pragst, F.; Herzler, M.; Herre, S.; Erxleben, B-T; Rothe, M. *UV Spectra of Toxic Compounds. Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons*. Dr. Dieter Helm: Heppenheim, 2001.
11. Bogusz, M., Wu, M. *J. Anal. Toxicol.* **1991**, 15, 188.
12. Bogusz, M., Erkens, M. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 674, 97.

13. Boukhabza, A.; Lugnier, A. A. J.; Kintz, P.; Mangin, P. *J. Anal. Toxicol.* **1991**, *15*, 319.
14. Drummer, O. H.; Kotsos, A.; McIntyre, I. M. *J. Anal. Toxicol.* **1993**, *17*, 225.
15. Elliot, S. P.; Hale, K. A. *J. Chromatogr. B.* **1994**, *694*, 99.
16. Elliot, S. P.; Hale, K. A. *J. Anal. Toxicol.* **1998**, *22*, 279.
17. Gaillard, Y.; Pépin, G. *J. Chromatogr. B.* **1997**, *763*, 149.
18. Hill, D. W.; Kind, A. J. *J. Anal. Toxicol.* **1994**, *18*, 233.
19. Lambert, W. E.; Meyer, E.; De Leenheer, A. P. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, *19*, 73.
20. Lambert, W. E.; Meyer, E.; Xue-Ping, Y.; De Leenheer, A. P. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, *19*, 35.
21. Lambert, W. E.; Van Bocxlaer, J. F.; De Leenheer, A. P. *J. Chromatogr. B.* **1997**, *689*, 45.
22. Logan, B. K.; Stafford, D. T.; Tebbet, I. R.; Moore, C. M. *J. Anal. Toxicol.* **1990**, *14*, 144.
23. Schepers, P. G. A. M.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. *J. Anal. Toxicol.* **1983**, *7*, 272.
24. Maier, R. D.; Bogusz, M. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, *19*, 79.
25. Galanos, D. S.; Kapoulas, V. M. *J. Chromatogr.* **1964**, *13*, 128.
26. Bogusz, M.; Klys, M.; Wijsbeek, J.; Franke, J. P.; De Zeeuw, R. A. *J. Anal. Toxicol.* **1984**, *8*, 149.
27. Bogusz, M.; Franke, J. P.; Wijsbeek, J.; De Zeeuw, R. A. *J. Anal. Toxicol.* **1986**, *10*, 245.
28. De Zeeuw, R. A.; Franke, J. P.; Van Halem, M.; Schaapman, S.; Logawa, E.; Siregar, C. J. P. *J. Chromatogr. A.* **1994**, *664*, 263.

29. De Zeeuw, R. A.; Franke, J. P.; Dik, E.; Dollen, W. T.; Kam, B. L. *J. Forensic Sci.* **1992**, *37*, 984.
30. Hegge, H. F. S.; Franke, J. P.; De Zeeuw, R. A. *J. Forensic Sci.* **1991**, *36*, 1094.
31. Cantos, M.; Hikichi, N. *Rev. Bras. Toxicol.* **1999**, *12*, 79.
32. Machata, G. *Gas Chromatographic Retention Indices of Solvents and other Volatile Substances for use in Toxicological Analysis*. VCH Verlagsgemeinschaft: Weinheim, 1992.
33. Drummer, O. H. *J. Chromatogr. B.* **1999**, *733*, 27.
34. Poletini, A. *J. Chromatogr. B.* **1999**, *733*, 47.
35. Tracqui, A.; Kintz, P.; Mangin, P. *J. Forensic Sci.* **1995**, *40*, 254.
36. Külpmann, W. R. (ed). *Klinisch-toxicologische Analytik*. Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2002.
37. Hartstra, J. *Tese de Doutorado*, Groningen State University, Holanda, 1997.

Simultaneous determination of omeprazole, hydroxyomeprazole and omeprazole sulphone in human plasma by isocratic HPLC-DAD: application to the phenotyping of CYP2C19 and CYP3A4 in a group of Brazilian volunteers

Rafael Linden<sup>\*a,b</sup>

Ana Luiza Ziulkoski<sup>a</sup>

Maína Wingert<sup>a</sup>

Paula Tonello<sup>a</sup>

André Arigony Souto<sup>b</sup>

- a. Centro Universitário Feevale, Rodovia RS 239, 2755, Novo Hamburgo, RS, 93352-000, Brazil
- b. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil

Corresponding author: [rafael.linden@feevale.br](mailto:rafael.linden@feevale.br) (R. Linden)

*Artigo submetido ao Journal of the Brazilian Chemical Society em 22/10/2006.*

## Resumo

Foi desenvolvido um método simples para a determinação simultânea de omeprazol (OME), 5-hidróxi-omeprazol (HOME) e omeprazol sulfona (OMES) através de CLAE-DAD, utilizando coluna de fase reversa e eluição isocrática. O método proposto foi utilizado para avaliar polimorfismos genéticos de CYP2C19 e CYP3A4 utilizando omeprazol como fármaco sonda em um grupo de voluntários brasileiros. OME, HOME e OMES foram extraídos de amostras de plasma com tampão Tris pH 9,5 (0,2 M) e acetato de etila. A separação em CLAE foi obtida utilizando uma coluna Shim-Pack RP-18e (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm). A fase móvel empregada foi acetonitrila-tampão fosfato pH 7,6 (24:76, v/v) e o tempo total da corrida foi de 15 minutos. Os tempos de retenção foram 2,7 minutos para o padrão interno (sulpirida), 4,1 minutos para HOME, 11,6 minutos para OME e 12,6 minutos para OMES. A detecção dos analitos (UV a 302 nm) foi linear na faixa de 25 a 1000 ng.ml<sup>-1</sup>. As recuperações absolutas estiveram na faixa de 64,3 a 73,2% para todos os analitos. Um grupo de 38 voluntários sadios brasileiros foram fenotipados com o método, após a ingestão de uma dose oral única de 20 mg de omeprazol. O método apresentou precisão e exatidão adequadas, com limite de quantificação de 21 a 25 ng.ml<sup>-1</sup> para OME e seus metabólitos, o que permite a identificação de metabolizadores ultra-rápidos tanto para CYP2C19 como para CYP3A4 e aproveita as vantagens inerentes a identificação seletiva oferecida pelos detectores de arranjo de diodos.

## **Abstract**

A simple HPLC-DAD method using a reverse phase column and isocratic elution for the simultaneous determination of omeprazole (OME), 5-hydroxy-omeprazole (HOME) and omeprazole sulphone (OMES) was developed. The proposed method was used to study CYP2C19 and CYP3A4 genetic polymorphisms using OME as the probe drug in a group of Brazilian volunteers. OME, HOME and OMES were extracted from plasma samples with Tris buffer pH 9.5 (0.2 M) and ethyl acetate. HPLC separation was achieved using a Shim-Pack RP-18e (150 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m) column. The mobile phase was acetonitrile-phosphate buffer pH 7.6 (24:76) and total run time was 15 minutes. Retention times were 2.7 minutes for internal standard (sulpiride), 4.1 minutes for HOME, 11.6 minutes for OME and 12.6 minutes for OMES. Detection (UV at 302 nm) of analytes was linear in the range from 25 to 1000 ng. ml<sup>-1</sup>. Extraction recoveries were in the range of 64.3 to 73.2% for all analytes. A group of 38 Brazilian healthy volunteers were phenotyped with the method, after a single oral dose of 20 mg omeprazole. The method presents adequate accuracy and precision, with limit of quantification of 21 to 25 ng.ml<sup>-1</sup> for omeprazole and metabolites, which permits the identification of ultra-rapid metabolizers for both CYP2C19 and CYP3A4 and takes advantage of the selective identification offered by diode-array detectors.

**Key words:** omeprazole, phenotyping, CYP2C19, CYP3A4, HPLC-DAD

## 1. Introduction

Omeprazole (OME), a substituted  $\alpha$ -pyridylmethylsulfinyl benzimidazole, is a gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase inhibitor. OME has been widely used as a potent inhibitor of gastric acid secretion for the treatment of peptic ulcer, refractory gastroesophageal reflux disease and Zollinger–Ellison syndrome<sup>1</sup>. OME undergoes extensive hepatic metabolism by the cytochrome P450 system, especially by the isoforms CYP2C19 and CYP3A4. Its main metabolites are 5-hydroxyomeprazole (HOME) and omeprazole sulfone (OMES)<sup>1-4</sup>. It is well established that CYP2C19 is the major enzyme in the formation of HOME, and CYP3A4 is mainly involved in the production of OMES (figure 1)<sup>5</sup>. Omeprazole is administered as a racemic mixture and presents enantioselective metabolism, with the (*R*)-(+)-omeprazole being mainly hydroxylated by CYP2C19 and (*S*)-(–)-omeprazole being preferentially metabolized to the sulfone by the CYP3A4<sup>6-8</sup>. OME is rapidly removed from plasma, with an estimated half-life of about 2 hours<sup>1</sup>.

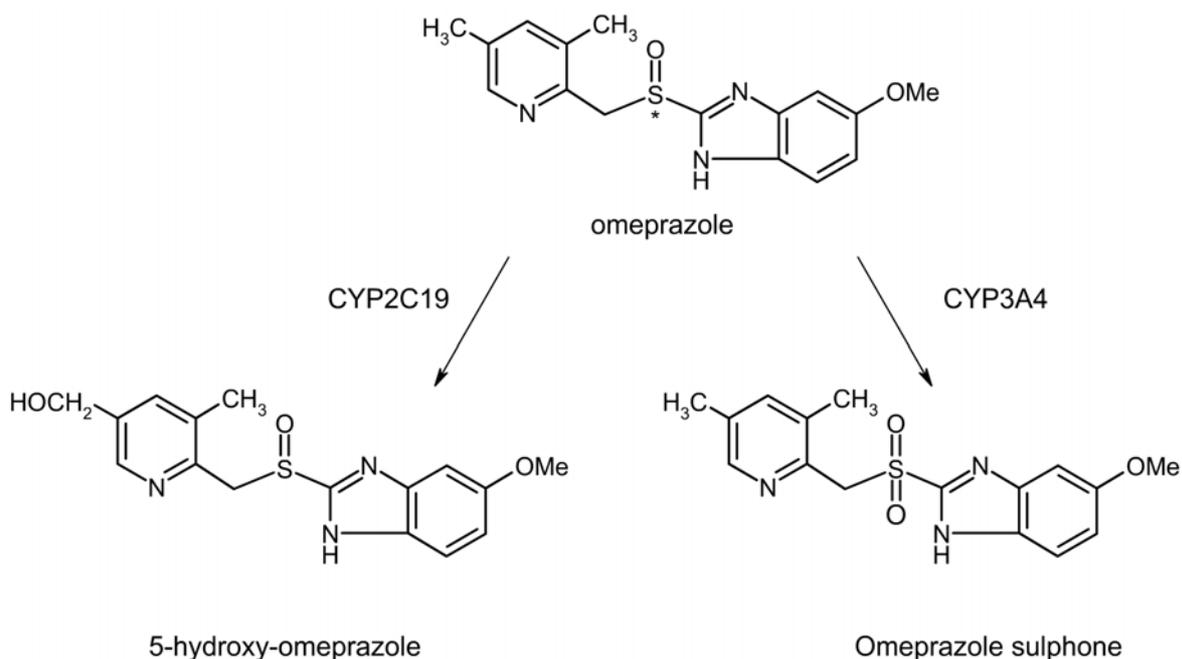


Figure 1. Chemical structures of omeprazole, 5-hydroxy-omeprazole and omeprazole sulphone, showing main metabolic pathways

OME hydroxylation is well correlated with S-mephenytoin 4-hydroxylation, which has been widely used as a phenotypic evaluation of *CYP2C19* polymorphism<sup>9</sup>. This genetic polymorphism shows a cosegregation with the oxidative metabolism of several clinically important drugs such as amitriptyline, nortriptyline, diazepam, imipramine, omeprazole, propranolol, and selective serotonin reuptake inhibitors<sup>5</sup>.

Several studies had used OME as a phenotyping probe for *CYP2C19* and *CYP3A4*<sup>10-14</sup>. Three major phenotypes have been reported: poor metabolizer (PM), extensive metabolizer (EM) and ultra rapid metabolizer (UM). These phenotypes can be classified using metabolic ratios of omeprazole after oral administration. Usually, an oral dose of 20 to 40 mg of omeprazole is orally administered and a blood sample is collected after 3 hours and metabolic ratios are calculated based on HOME, OME and OMES plasma concentrations<sup>13-15</sup>.

Knowledge of an individual phenotype for metabolizing enzymes can be useful in the adjustment of dosage regimen in pharmacotherapy. Van der Weide and coworkers<sup>16</sup> have observed consistent relationship between metabolic ratios for amitriptyline with *CYP2C19* genotype. Kirchheiner and coworkers<sup>17</sup> have recently published dose recommendations for antidepressant drug based on *CYP2C19* and *CYP2D6* genotypes. It was expected that PM would require lower doses of drugs, having increased risk of toxicity under standard dose regimens, and UM would need increased doses, once standard posology can lead to poor clinical response. Considering the high correlation of metabolic ratios for omeprazole and the *CYP2C19* and *CYP3A4* genotypes, the use of metabolic phenotypes to dose adjustment can also be further explored.

Several high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods either with tandem mass spectrometry or photometric detection systems have been described to determine OME, HOME and OMES in biological fluids, but none of them used diode array detectors (DAD)<sup>14,18-25</sup>. The use of DAD allows comparison of ultraviolet absorption spectra of sample peaks with reference spectra on a computer library and the determination of spectral purity of the peaks, greatly improving the specificity of the analysis<sup>26-27</sup>. Besides the great improvement in specificity brought to HPLC analyses by DAD, only Duboc and coworkers<sup>23</sup> used a HPLC-DAD for OME determination in human plasma samples. To date, there is no report of an HPLC-DAD method for simultaneous quantification of OME, HOME and OMES in human plasma samples.

The aim of the present work is to develop a simple HPLC-DAD method for simultaneous OME, HOME and OMES determination in human plasma, using liquid-liquid extraction with a non halogenated solvent and isocratic elution, and allowing

rapid processing of a high number of samples. An additional purpose of this work is to apply the developed method in the phenotype determination for CYP2C19 and CYP3A4 in a group of Brazilian volunteers.

## **2. Experimental**

### *2.1. Chemicals*

Omeprazole (99 %) was purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Omeprazole sulphone (98 %) and 5-hydroxy-omeprazole (95 %) were supplied by Astra Zeneca (Möln dal, Sweden). Sulpiride (99 %) was obtained from Purifarma Química e Farmacêutica (São Paulo, Brazil). HPLC grade acetonitrile, methanol and all other chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Water was obtained by distillation and deionization and purified additionally with an Elga Purelab Ultra SC system purchased from Analítica (São Paulo, Brazil). Phosphate buffer pH 7.6 was prepared dissolving 0.73 g of monobasic sodium phosphate and 4.47 g of anhydrous dibasic sodium phosphate in 1000 ml of water. Final pH was adjusted with phosphoric acid 85% (v/v). Before mobile phase preparation, phosphate buffer was filtered through a 0.45 µm cellulose acetate membrane (Sartorius, Germany). Tris buffer pH 9.5 (0.2 M) was prepared dissolving 23.4 g of tris-hydroxy-methyl-aminometane in 1000 ml of water. Generic 20 mg omeprazole capsules were obtained from Medley S/A Indústria Farmacêutica (São Paulo, Brazil).

### *2.2. Equipment*

The chromatographic apparatus consisted of a binary pump LC-10AT, an on line degasser DGU-14, a column oven CTO 10AS, an automatic injector SIL-10AF and a

diode array detector SPDM10A. The system was controlled by the software Class VP 6.13 SP2. The complete system was from Shimadzu (Kyoto, Japan).

### *2.3. Chromatographic conditions*

The separation was performed on a Shim-Pack RP-18e (150 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ) column with a guard column Shim-Pack G-ODS (10 x 4.0 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ), both from Shimadzu (Kyoto, Japan). The integration wavelength was set at 302 nm, with diode array spectral acquisition in the range of 200 to 380 nm. The mobile phase consisted of phosphate buffer pH 7.6 and acetonitrile (76:24, v/v) at a flow rate of 1.2 ml.min<sup>-1</sup>. The column was kept at 30 °C during the analyses. The mobile phase was prepared daily and degassed by ultrasonication before use. The mobile phase was not allowed to recirculate during the analyses.

### *2.4. Standard solutions*

Stock solutions of HOME, OME and OMES were prepared in methanol at the concentration of 0.5 mg.ml<sup>-1</sup>. Working solutions of HOME, OME and OME were prepared from stock solutions by dilution with methanol in order to obtain concentrations of 50, 25, 12.5, 6.5, 2.5 and 1.25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . The stock solution of sulpiride (internal standard) was prepared in methanol at a concentration of 2 mg.ml<sup>-1</sup>. The working solution of sulpiride (20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) was obtained by dilution of the stock solution with methanol. The standard solutions were stored at – 20 °C.

### *2.5. Sample preparation*

To 1000  $\mu\text{l}$  of plasma in a glass-stoppered 10-ml centrifuge tube were added 50  $\mu\text{l}$  of sulpiride as internal standard (2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ), 500  $\mu\text{l}$  of Tris buffer pH 9.5 and 6 ml of ethyl

acetate. After mixing (15 minutes), the mixture was centrifuged for 15 minutes at 3500 g and then maintained at – 20 °C for 40 min. Then, 5 ml of the upper organic layer were transferred to clean evaporation tubes and concentrated to dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen. The dried extract was recovered with 100 µl of mobile phase and 20 µl were injected into the liquid chromatograph.

### *2.6. Biological samples*

Blank plasma used to obtain the calibration samples was obtained from a local blood bank. These samples were tested previously with the proposed method in order to avoid interferences. Blank plasma for specificity testing was obtained from healthy volunteers. All blank plasma samples were stored at – 20 °C, being thawed just before use. Patient samples were obtained as detailed in the section *pharmacogenetic analysis*. Concentrated samples were diluted with blank plasma in order to obtain values within the calibration curve range.

### *2.7. Stability*

The stability of HOME, OME and OMES was assessed for spiked plasma samples stored at –20 °C and +4 °C for one month, with weekly analysis. Stability was also tested at room temperature for 24 hours at the chromatograph autosampler. The stability of stock solutions stored at above mentioned temperatures was determined by injecting appropriate dilutions of stocks in methanol at different days and comparing their peak areas with fresh stock prepared on the day of analysis. Samples were considered stable if the assay values were within the acceptable limits of accuracy and precision.

### *2.8. Plasma calibration curves and quantitation*

To 940  $\mu\text{l}$  of blank plasma, 20  $\mu\text{l}$  of working standards of each of the three analytes were added, yielding final concentrations of HOME, OME and OMES of 25, 50, 125, 250, 500, and 1000  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . To this mixture, 50  $\mu\text{l}$  of internal standard working solution were added to yield a IS concentration of 1000  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Calibration samples were prepared for analysis as described above. Calibration curves were constructed by plotting peak area ratio ( $y$ ) of HOME, OME and OMES to the internal standard versus HOME, OME and OMES concentrations ( $x$ ). A linear regression was used for quantitation, with a weighting factor of  $1/\text{concentration}^2$ .

### *2.9. Selectivity and specificity*

Control human plasma, obtained from 6 healthy volunteers, was assessed by the procedure as described above and compared with respective plasma samples to evaluate selectivity of the method. Reference samples of metoprolol and hydroxy-metoprolol were also analyzed with the method, once they can be co-administered with omeprazole in cocktails for simultaneous phenotyping of CYP2C19, CYP3A4 and CYP2D6. In all runs, peaks related to OME, HOME and OMES were evaluated with respect to their spectral purity.

### *2.10. Precision and accuracy*

The precision and accuracy of the method were examined by adding known amounts of OME, HOME and OMES to blank plasma, yielding final concentrations of 50, 200, 600 and 900  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  of each analyte. For intra-day precision and accuracy, six replicate quality control samples at each concentration were assayed on the same day. The inter-day precision and accuracy were evaluated on six different days, with

three samples being assayed each day. Precision was evaluated as percentage relative standard deviation (R.S.D. %) and accuracy was evaluated as percentage of the spiked concentration.

#### *2.11. Limit of quantitation and recovery*

The Limit of Quantitation (LOQ) was calculated by the analyte concentration which produces a peak with area correspondent to 10 times the baseline noise.

#### *2.12. Recovery*

The absolute recovery for plasma at four different concentrations of OME, HOME and OMES (50, 200, 600 and 900 ng.ml<sup>-1</sup>) was determined. Known amounts of analytes were added to drug-free plasma and submitted to the analysis procedure previously described. The absolute recovery was calculated by comparing the peak areas for extracted HOME, OME and OMES from spiked plasma and a standard solution of the analytes in methanol containing internal standard with the same initial concentration (six samples for each concentration level).

#### *2.13. Pharmacogenetic analysis*

The pharmacogenetic study protocol was approved by the Ethics Committees of Centro Universitário Feevale and of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, and a written informed consent was obtained from the volunteers. Subjects were excluded if they had renal or hepatic insufficiency, were under any drug or herbal treatment, had the presence of any factor affecting OME pharmacokinetics or had a reported allergy to drugs. Before inclusion on the study, hepatic and renal function of all volunteers were evaluated by biochemical assays. Individual with

altered hepatic or renal function were excluded from the study. Special instructions were given to all subjects regarding the avoidance of coffee, alcohol, and herbal products 48 hours before the OME administration. OME was administered in a single dose of 20 mg to the volunteers after an 8 hours fasting. Blood samples were collected 3 hours after OME administration. Plasma was immediately separated and transferred to polypropylene tubes and frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assayed. Plasma concentrations of OME, HOME and OMES were determined and metabolic ratios were calculated as  $\log_{10} [\text{OME}]/[\text{HOME}]$  and  $\log_{10} [\text{OME}]/[\text{OMES}]$  for the phenotypic classification for CYP2C19 and CYP3A4, respectively. Thirty-eight individuals participated in the study.

### **3. Results and discussion**

Under the chromatographic conditions described, HOME, OME and OMES and the internal standard peaks were well resolved. Endogenous plasma components did not give any interfering peaks. Separation was performed on a common reversed-phase column, with isocratic elution. Several binary mobile phase compositions of phosphate buffer pH 7.6 and acetonitrile were tested, with phosphate buffer proportions ranging from 85 to 70%. The mobile phase composed of phosphate buffer pH 7.6 and acetonitrile in the ratio of 74:26 (v/v) was the best compromise between resolution of internal standard, HOME, OME and OMES and analysis time. Increased proportion of acetonitrile did not allow the separation of internal standard and HOME from early eluting matrix constituents and increased percentage of phosphate buffer led to unacceptable high retention times. The

resolution and peak shapes obtained made the use of an ion-pairing agent unnecessary. Fig. 2 shows a typical chromatogram of blank plasma.

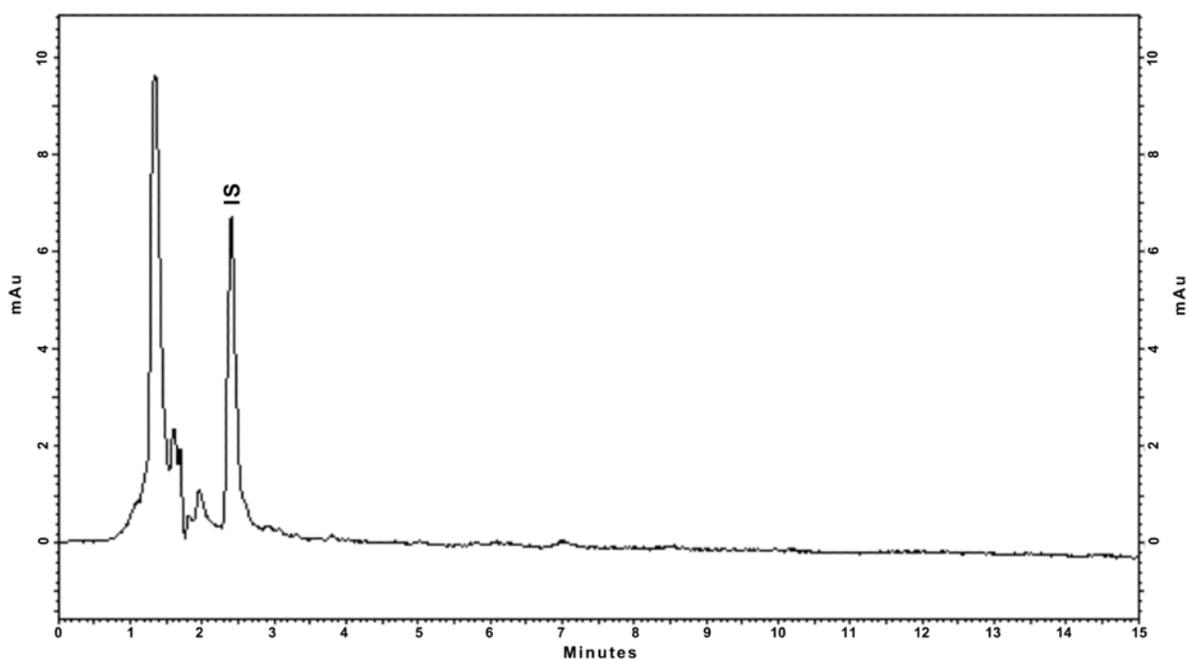


Figure 2. Chromatogram of a blank plasma sample.

The average retention times of sulphiride, HOME, OME and OMES were 2.7, 4.1, 11.6 and 12.6 minutes, respectively. In all validation runs, the peaks were checked for spectral purity, without identification of any endogenous interferents. The retention times of hydroxymetoprolol and metoprolol were also tested, once metoprolol can be co-administered with OME to simultaneously phenotype CYP2C19, CYP3A4 and CYP2D6. Hydroxy-metoprolol and metoprolol had average retention times of 1.9 and 5.4 minutes, respectively, showing no interference with internal standard, HOME, OME and OMES. A typical chromatogram of a calibration plasma sample is shown in figure 3.

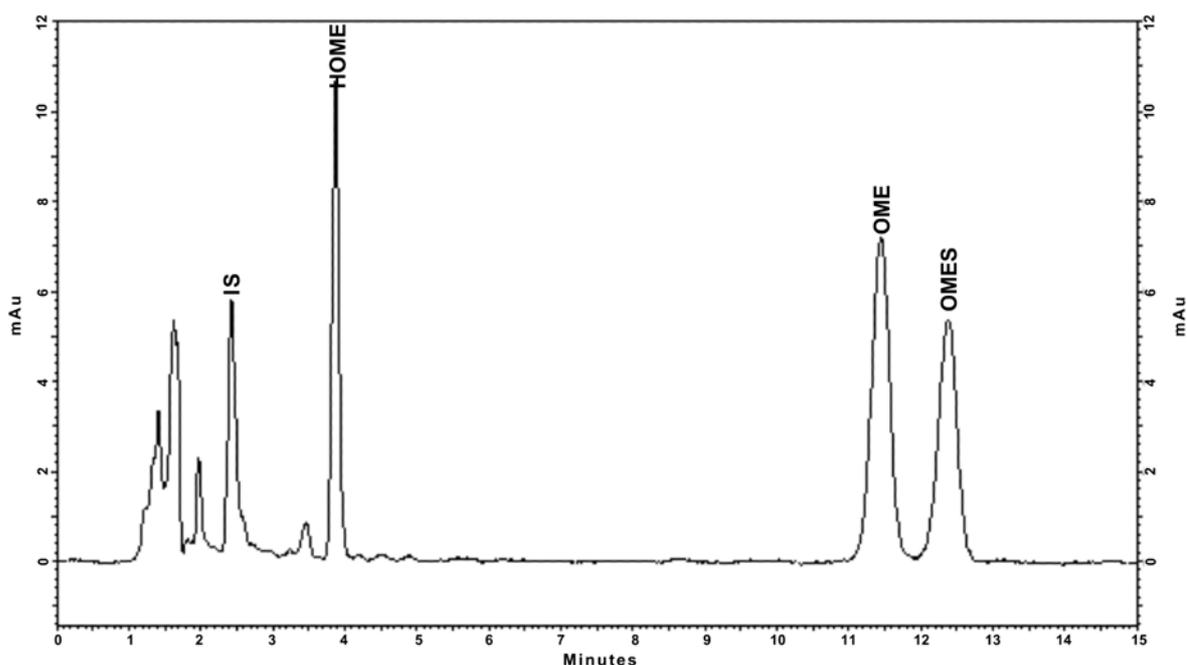


Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample spiked with 500 ng.ml<sup>-1</sup> of HOME, OME and OMES.

Several sample preparation methods have been used for analysis of OME and its metabolites in biological samples, including protein precipitation, liquid-liquid and solid phase extraction<sup>14, 20-23</sup>. For studies where large number of samples must be processed, solid phase extraction still remains as an expensive alternative. We tested protein precipitation with diluted perchloric acid, with unacceptable recoveries. González *et al.*<sup>14</sup> used liquid-liquid extraction with a mixture containing halogenated solvent. Ethyl acetate was chosen as an alternative solvent due its moderate polarity and favorable safety characteristics. After homogeneization, the samples were kept for 40 minutes in a freezer in order to facilitate the organic phase separation, forming a solid aqueous phase and increasing ethyl acetate viscosity.

Fortified samples were found to be stable for at least one month at – 20 °C, after four freeze and thaw cycles, with HOME, OME and OMES concentration values

found to be  $97.2 \pm 6.7$  % of the initial values. At room temperature (20 – 30 °C) no significant difference in concentrations was found after 24 hours.

The calibration curve for the determination of HOME, OME and OMES in plasma was linear over the range 25–1000 ng/ml. The determination coefficients ( $r^2$ ) for calibration curves were either equal to or better than 0.995 (table 1).

Table 1. Assay linearity and regression analysis

Substance	Parameter	Coefficient	Standard error	$r^2$
OME	Slope	0.0059	0,0002	0.9953
	Intercept	-0,2380	0.1247	
OME	Slope	0,0043	0,0000	0.9989
	Intercept	0,0052	0,0401	
HOME	Slope	0,0038	0,0000	0.9984
	Intercept	-0,0285	0,0346	

In order to determine the absolute recovery of HOME, OME and OMES, known amounts of HOME, OMES and OME were added to drug-free plasma in concentrations ranging from 50 to 900 ng.ml<sup>-1</sup> (50, 200, 600 and 900 ng.ml<sup>-1</sup>). Internal standard was added and the absolute recovery was calculated by comparing the peak areas for extracted HOME, OME and OMES from spiked plasma with a standard solution of the same analytes in methanol containing internal standard with the same initial concentration. The average recoveries were  $64.3 \pm 7.5\%$  for HOME,  $73.2 \pm 6.3\%$  for OME and  $71.2 \pm 5.9\%$  for OMES (table 2). The obtained recoveries were acceptable for CYP2C19 and CYP3A4 phenotyping under the applied

procedure, allowing the identification of OME and its metabolites even in ultra-fast metabolizers. The limits of quantification, calculated as 10 times the signal to noise ratio, were 25 ng.ml<sup>-1</sup>, 24 ng.ml<sup>-1</sup> and 21 ng.ml<sup>-1</sup> for HOME, OME and OMES, respectively. The analysis of 6 independent blank plasma samples did not presented any interfering peaks at the eluting times of IS, HOME, OME and OMES. In all processed samples, the use of a diode array detector allowed the verification of the spectral purity of all peaks related to the analytes, as well as the comparison of the obtained spectra with those in the equipment library. No interferences were detected in the performed analysis.

Table 2. Recovery data for extraction of HOME, OME and OMES in human plasma (n = 6)

Spiked concentration (ng.ml <sup>-1</sup> )	Recovery % (mean ± S.D.)		
	HOME	OME	OMES
50	62.1 ± 9.5	68.8 ± 8.1	69.7 ± 7.3
200	67.1 ± 5.4	73.3 ± 4.6	68.2 ± 6.4
600	61.5 ± 8.1	75.5 ± 7.2	72.9 ± 5.7
900	66.7 ± 7.0	75.2 ± 5.3	74.0 ± 4.2

The precision was assessed of the method by repeated analysis of plasma specimens containing known concentrations of HOME, OME and OMES. As shown in table 3, intra-day R.S.D. % were in the range of 3.1 to 7.3 % and inter-day R.S.D. % were in the range of 4.4 to 7.9. Accuracy was in the range of 96.3 to 101.4 %. Both precision and accuracy are acceptable for a bio analytical method.

Table 3. Precision and accuracy for the determination of HOME, OME and OMES in human plasma

Spiked concentration (ng.ml <sup>-1</sup> )	Intra-day R.S.D % (n = 6)	Intra-day R.S.D % (n = 18)	Accuracy (%) (n = 18)
HOME			
50	7.2	7.9	96.3
200	5.6	6.6	100.9
600	4.8	5.6	95.9
900	3.1	4.0	100.2
OME			
50	7.3	7.8	95.2
200	4.6	5.7	99.3
600	5.4	5.9	101.4
900	3.3	4.4	98.3
OMES			
50	6.1	6.8	97.6
200	5.3	7.1	97.5
600	4.7	5.8	99.5
900	4.5	6.2	101.8

A group of 38 healthy Brazilian volunteers were phenotyped after an oral dose of 20 mg omeprazole. A chromatogram of a calibration plasma sample is presented in figure 3. Figure 4 presents a chromatogram obtained from a volunteer presenting an ultra-rapid (UM) phenotype for CYP2C19.

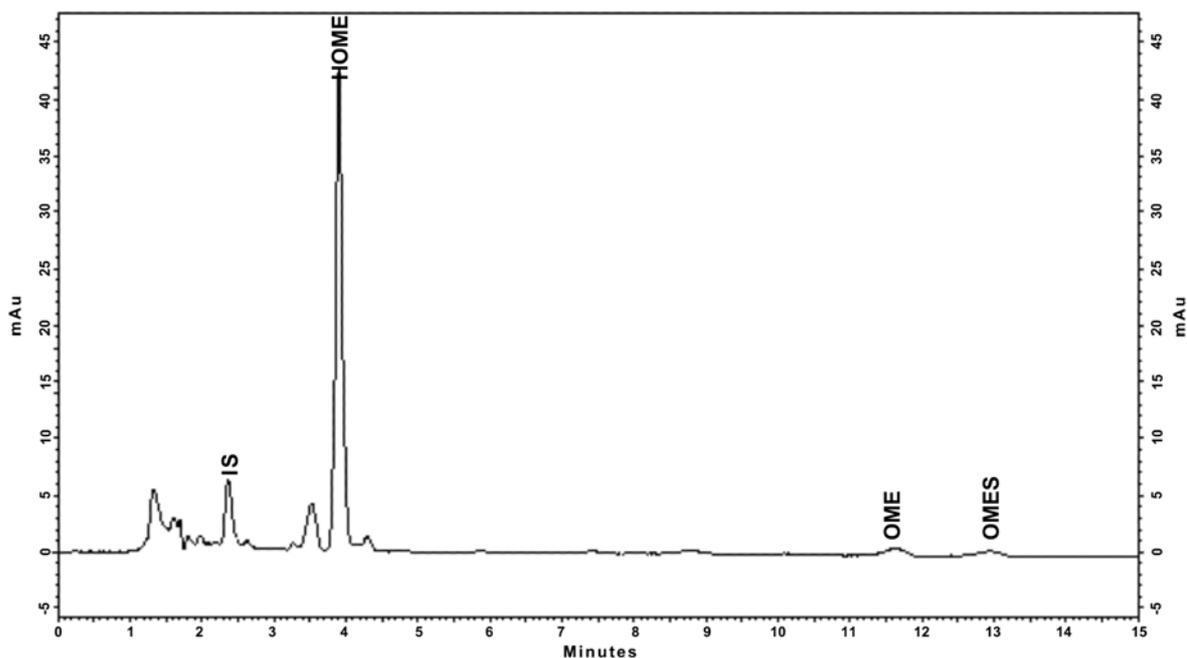


Figure 4. Chromatogram of a plasma sample of an ultra-rapid metabolizer for CYP2C19, 3 h after administration of 20 mg omeprazole.

Omeprazole was well tolerated by all subjects, without any report of adverse reactions. No secondary effects were reported in any volunteer. Mean concentrations of hydroxyomeprazole, omeprazole and omeprazole sulfone were  $225 \text{ ng.ml}^{-1}$  (range 79-2103),  $287 \text{ ng.ml}^{-1}$  (range 52-750) and  $509 \text{ ng.ml}^{-1}$  (range 33-9917), respectively. The wide dispersion of the results can be credited to the very extreme values of ultra-rapid metabolizers for CYP2C19 and CYP3A4. All subjects presented detectable amounts of HOME, OME and OMES.

The frequency of the different metabolic ratios for CYP2C19 and CYP3A4 are presented in figures 5 and 6.

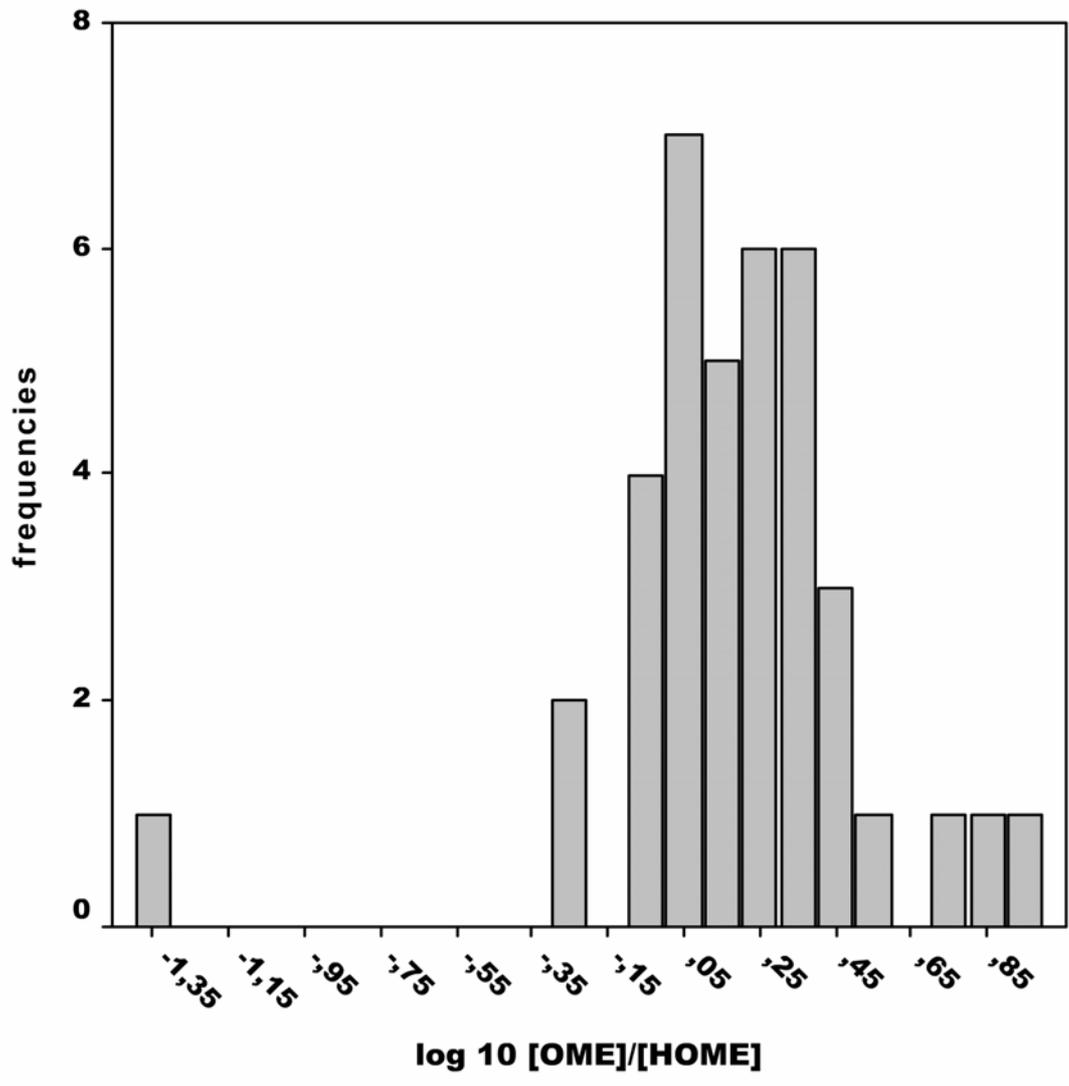


Figure 5. Frequency distribution of CYP2C19 metabolic ratios, described as log<sub>10</sub> [OME]/[HOME]

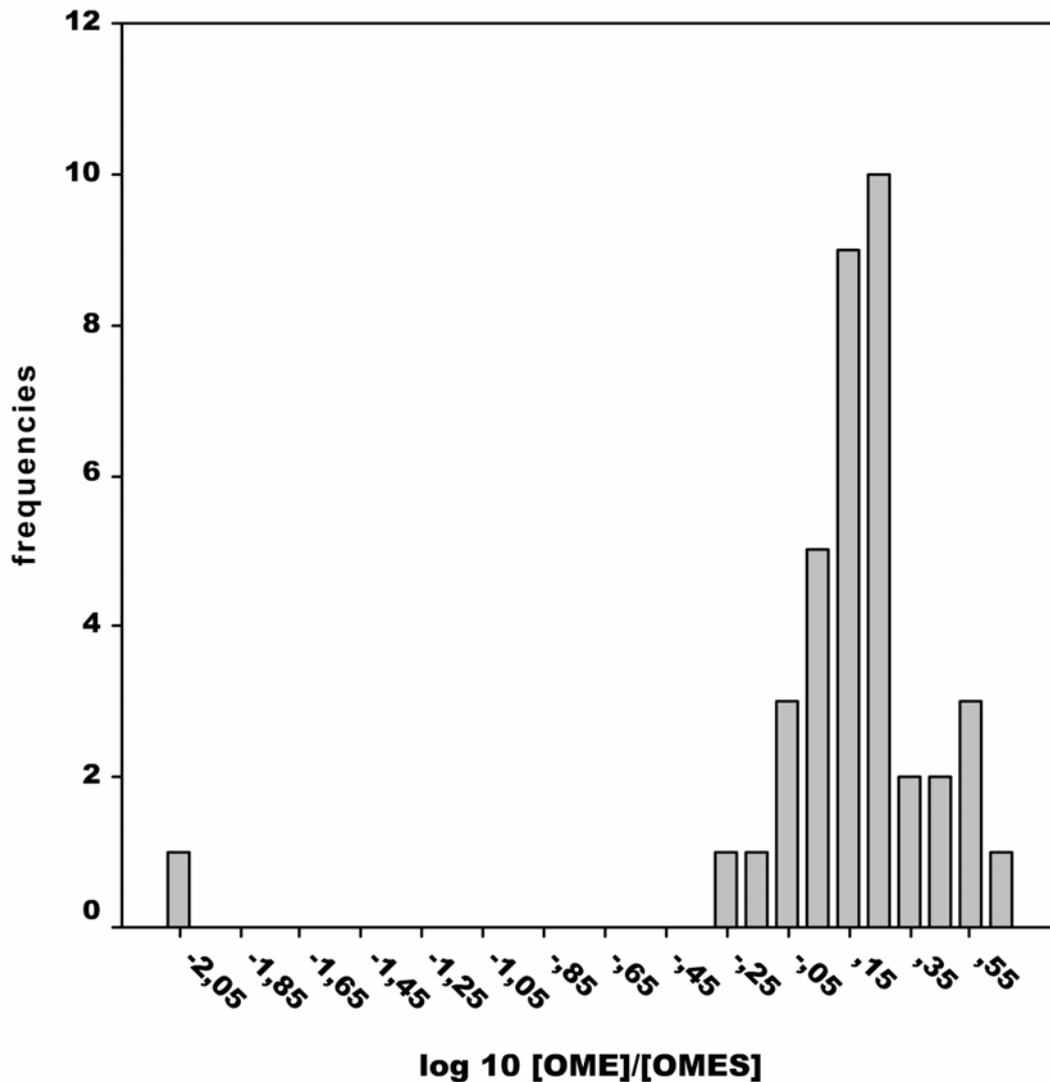


Figure 6. Frequency distribution of CYPC3A4 metabolic ratios, described as  $\log_{10}$  [OME]/[OMES]

The antimode for the frequency of the metabolic ratios, calculated as  $\log_{10}$  [OME]/[HOME], is usually used to classify individuals as PM, EM or UM. Between PM and EM for CYP2C19, this value has been found to vary considerably among different populations, being 0.84 in Korean<sup>24</sup>, 0.60 in West Mexicans<sup>15</sup> and 1.16 in South Indians<sup>25</sup>. The prevalence of PMs in the South Indian population is 14%<sup>27</sup>, being 12-23% in Orientals and 1% in Caucasians<sup>28</sup>. Considering the small population

tested in our study, it is not possible to determine the antimode in Brazilian population. Besides that, we found individuals with markedly different metabolic activities for both CYP2C19 and CYP3A4, which denotes the wide diversity of metabolic profiles that may be considered in clinical pharmacology.

One subject presented the ultra-rapid phenotype for CYP2C19, particularly with very high levels of hydroxyomeprazole ( $2103 \text{ ng.ml}^{-1}$ ). In addition, one subject presented the ultra-rapid phenotype for CYP3A4, with a surprisingly elevated concentration of OMES in the order of  $9917 \text{ ng.ml}^{-1}$ . We found one individual with metabolic ratios with respect to CYP2C19 of 0.99, denoting OME concentrations about 10 times higher than HOME. EM had average OME concentrations about 1.5 times higher than HOME concentrations.

Individuals with elevated metabolic ratios are much prone to having adverse reactions when submitted to standard doses of drugs which are substrates for the specific enzyme tested. These individuals would require much lower doses of these drugs. In addition, we found two individuals with very low metabolic ratios denoting a very fast metabolism. These patients would require higher doses to achieve plasma therapeutic concentrations of drug metabolized by CYP2C19 and CYP3A4.

Considering the cost associated with genotyping procedures, an interesting alternative could be the establishment of correlations of metabolic indexes of usual drugs with those from probe drugs as omeprazole. This approach, already evaluated for the demethylation of amitriptyline by Van der Weide *et al.*<sup>16</sup>, can permit dose adjustments based on usual therapeutic drug monitoring procedures.

#### **4. Conclusions**

A rapid and simple HPLC method using diode array detector has been described for analysis of omeprazole, hydroxyomeprazole and omeprazole sulphone in human plasma. Using reversed-phase column, the chromatographic elution step was undertaken in a short time with adequate resolution. Sample preparation involved liquid-liquid extraction with a single component solvent. To the best of our knowledge, this is the first reported HPLC-DAD method for simultaneous determination of HOME, OME and OMES. The use of diode array detection provided high specificity. Moreover, due to low LOQ, good accuracy and precision this method is suitable for pharmacogenetics studies, allowing the identification of PM, EM and UM with regards to CYP2C19 and CYP3A4. Despite the small population of phenotyped individuals, a wide variability in the metabolic ratios for CYP2C19 and CYP3A4 was observed, which has important consequences on dose adjustment for drugs that are substrates for these CYP enzymes.

#### **Acknowledgement**

The authors are grateful to Astra Zeneca (Mölndal, Sweden) for the kind donation of reference samples of omeprazole sulphone and 5-hydroxy-omeprazole.

## References

- [1] Hardman, J.G.; Limberd (Eds). L.E.; In *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY, **2001**.
- [2] Clissold, S.P.; Campoli-Richards, D.M. ; *Drugs*. **1986**, 32, 15.
- [3] Howden, C.W.; *Clin. Pharmacokinet*. **1991**, 20, 38.
- [4] Renberg, L.; Simonsson, R.; Hoffman, K.J.; *Drug Metab. Dispos*. **1989**, 17, 69.
- [5] Streetmann, D.S.; Bertino, J.S.; Nafziger, A.N.; *Pharmacogenetics*. **2000**,10,187.
- [6] Tybring, G.; Böttiger, Y.; Widén, J.; Bertilsson, L.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1997**, 62, 129.
- [7] Böttiger, Y.; Tybring, G.; Götharson, E.; Bertilsson, L.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1997**, 67, 384.
- [8] Kanazawa, H.; Okada, A.; Higaki, M.; Yakota, H.; Mashige, F.; Nakahara, K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 30, 1817.
- [9] Kubota, T.; Chiba, K.; Ishizaki, T. ; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1996**, 60, 661.
- [10] Chainuvati, S.; Nafziger , A.N.; Leeder, J.S.; Gaedick, A.; Kearns, G.L.; Sellers, E.; Zhang, Y.; Kashuba, A.D.M.; Rowland, E.; Bertino, J.S.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 74, 437.
- [11] Christensen, M.; Andersson, K.; Dalém, P.; Mirghani, R.A.; Muirhead, G.J.; Nordmark, A.; Tybring, G.; Wahlberg, A.; Yasar, Ü.; Bertilsson, L.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 73, 517.
- [12] Jerdi, M.C.; Daali, Y.; Oestreicher, M.K.; Cherkaoui, S.; Dayer, P.A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 35, 1203.
- [13] Tamminga, W.J.; Wemer, J. ; Oosterhuis, B. ; Brakenhoff, J.P.G.; Gerrits, M.G.F.; Zeeuw, R.A.; Leij, L.F.M.H.; Jonkman, J.H.G.;*Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, 57, 146.

- [14] González, H.M.; Romero, E.M.; Chavez, T.J.; Peregrina, A.A.; Quezada, V.; Hoyo-Vadillo C.; *J. Chromatog.r B.* **2002**, 780, 459.
- [15] González, H.M.; Romero, E.M.; Peregrina A.A.; Chavez, T.J.; Escobar-Islas, E.; Lozano, F.; Hoyo-Vadillo, C.; *J. Clin. Pharmacol.* **2003**, 43, 1211.
- [16] Van der Weide, J.; van Baalen-Benedek, E.H.; Koostra-Ros, J.E.; *Ther. Drug Monit.* **2005**, 27, 478.
- [17] Kirchheiner, J.; Bertilsson, L.; Bruus, H.; Wolf, A.; Roots, I.; Bauer, M.; *Pharmacopsychiatry.* **2006**, 36, 235.
- [18] Kobayashi, K.; Chiba, K.; Sohn, D.; Kato, Y.; Ishizaki, T.; *J. Chromatogr.* **1992**, 579, 299.
- [19] Lagerström, P.O.; Persson, B.A.; *J. Chromatogr.***1984**, 309, 347.
- [20] Woolf, E.J.; Matuszewski, B.K.; *J. Chromatogr. A.* **1998**, 828, 229.
- [21] Yim, D.S.; Jeong, J.E.; Park, J.Y. ; *J. Chromatogr. B.* **2001**, 754, 487.
- [22] Kanazawa, H.; Okada, A.; Matsushima, Y.; Yokota, H.; Okubo, S.; Mashige, F.; Nakahara, K.; *J. Chromatogr. A.* **2002**, 949, 1.
- [23] Duboc, M.C.; Hamel, C.; Caubet, M.S.; Brazier, J.L.; *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **2001**, 24, 161.
- [24] Shimizu, M.; Uno, T.; Niioka, T.; Yau-Furukori, N.; Takahata, T.; Sugawara, K.; Tateishi, T. *J. Chromatogr. B.* **2006**, 831, 85.
- [25] Hofmann, U.; Schwab, M.; Treiber, G.; Klotz, U. *J. Chromatogr. B.* **2006**, 832, 241.
- [26] Lamba, J.K.; Dhiman, R.K.; Kohli, K.K.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1998**, 63, 422.
- [27] Rosemary, J.; Adithan, C.; Padmaja, N.; Shashindran, C. H.; Gerard, N.; Krishnamoorthy, R.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2005**, 61, 19.

[28] Goldstein, J.A.; Ishizaki, T.; Chiba, K.; Morais, S.M.; Bell, D.; Krahn, P.M.;  
*Pharmacogenetics*. **1997**, *7*, 59.

Sensitive and fast method for the simultaneous determination of amitriptyline and its main demethylated and hydroxylated metabolites in human plasma samples using HPLC-DAD: application to the determination of metabolic ratios after single oral dose of amitriptyline

Rafael Linden<sup>\*a,b</sup>

Marina Venzon Antunes<sup>a</sup>

Ana Luiza Ziulkoski<sup>a</sup>

Maína Wingert<sup>a</sup>

Paula Tonello<sup>a</sup>

André Arigony Souto<sup>b</sup>

a. Centro Universitário Feevale, Rodovia RS 239, 2755, Novo Hamburgo, RS, 93352-000, Brazil

b. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil

\*Corresponding author:

Phone: + 55 51 35868800

Fax: + 55 51 35868923

Email: [rafael.linden@feevale.br](mailto:rafael.linden@feevale.br) (R. Linden)

*Artigo submetido ao Journal of Chromatography B em 23/11/2006.*

## **Abstract**

A HPLC-DAD method was developed for the simultaneous determination of amitriptyline, nortriptyline, E-10-hydroxyamitriptyline, Z-10-hydroxyamitriptyline, E-10-hydroxynortriptyline, Z-10-hydroxynortriptyline and desmethylnortriptyline in human plasma samples. The analytes were separated on an octylsilica reversed-phase column using a mobile phase composed of acetonitrile and phosphate buffer pH 2.3 (37:63, v/v). Clomipramine was used as internal standard. Sample preparation was performed by liquid-liquid extraction with a mixture of n-hexane and isopropyl alcohol (95:5, v/v) at pH 9.5, followed by a back extraction to a small volume of phosphoric acid 0.1% (v/v). Diode-array spectral acquisition was performed between 200 and 380 nm and analytes were quantified at 210 nm. The chromatograms were free of interferences and the extraction yields were in the range of 35.2 to 85.3%, with clean extracts. The method was validated with respect to linearity, precision, accuracy, extraction yield, selectivity and stability. Precision assays showed R.S.D % lower than 9.2 and accuracy in the range of 92.2 to 103.4%. Limit of detection was 5 ng.ml<sup>-1</sup> for all analytes. The method is suitable for therapeutic drug monitoring of patients under amitriptyline treatment, allowing the evaluation of metabolic ratios for CYP2C19 after a single oral dose of AT.

**Key words:** amitriptyline, metabolites, metabolic ratios, phenotyping, CYP2C19, HPLC-DAD

## 1. Introduction

Amitriptyline (AT), even after 40 years of its introduction, still is a leading drug in the treatment of depression, specially in developing countries, mainly due its efficacy and favorable cost characteristics [1,2], and remains as a first choice drug to the treatment of some chronic conditions, as fibromyalgia [3,4].

AT is metabolized mainly by demethylation forming nortriptyline (NT), and by hydroxylation, leading to the formation of E-10-hydroxy (EHAT) and Z-10-hydroxyamitriptyline (ZHAT) (figure 1). The major biotransformation pathway of NT is hydroxylation to E-10-hydroxynortriptyline (EHNT) and Z-10-hydroxynortriptyline (ZHNT), being also demethylated to desmethylnortriptyline (NNT) [5]. The demethylation of AT and NT is mainly catalyzed by CYP2C19, with the participation of other CYP enzyme forms in higher drug concentrations, specially CYP3A4 [6]. The formation of the E-10-hydroxy metabolites is dependent on the activity of CYP2D6, with stereospecificity to the (-)-EHAT and (-)-EHNT metabolites [7].

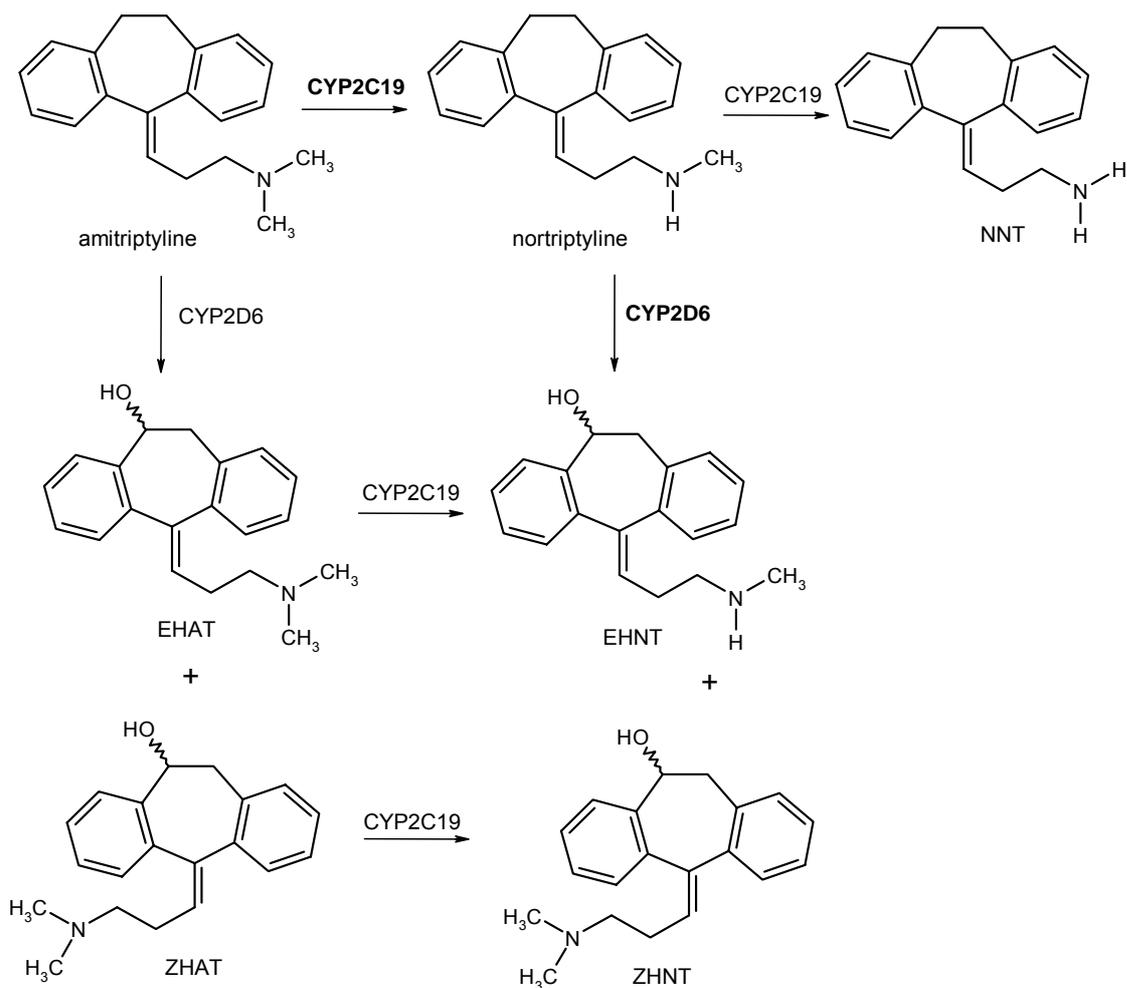


Figure 1. Main metabolic pathways of amitriptyline. Major routes are shown in bold.

Therapeutic drug monitoring (TDM) in AT pharmacotherapy is a common practice and is usually based on the determination of plasma concentrations of AT and NT, once strong evidence shows that better clinical outcomes is more frequent when plasma concentrations of AT + NT in steady state are in the range of 80 to 200 ng.ml<sup>-1</sup>[8]. Besides, significant toxic effects are prevalent when plasma levels are above 300 ng.ml<sup>-1</sup> [9]. Additional information can be obtained through the determination of the hydroxylated metabolites of AT and NT, once these metabolites are correlated with important clinical findings. The hydroxylated metabolites of NT inhibit noradrenaline uptake with similar potency as NT itself, being considered

active as well [10]. A trend to better clinical outcome in the treatment of depression was observed with higher EHAT and EHNT plasma concentrations [11] and some earlier reports associated the occurrence of severe cardiovascular toxicity to high plasma levels of EHNT and ZHNT after intake of therapeutic doses of NT [12,13].

Some authors proposed AT dose adjustments based on predicted phenotypes after genotyping of *CYP2D6* and *CYP2C19* [14]. A recent report showed correlation between the gene doses and plasma concentrations of AT and NT [15]. Unfortunately, genotyping facilities are not widely available and frequently the predicted phenotype is not in concordance with the genotype, specially in polypharmacy patients, mainly by enzyme inhibition, and in patients with renal or hepatic diseases. Alternatively, the phenotype of drug metabolism can be evaluated using probe drugs, such as debrisoquine for *CYP2D6* and omeprazole for *CYP2C19* [16]. However, some of the probes have considerable side effects and their use to predict dose regimens can delay the start of pharmacotherapy. A reasonable approach is to determine the correlation between metabolic ratios of frequently used drugs and the standard probes and use routine TDM as a tool to predict the metabolic phenotypes. In the case of drugs with more complex metabolism, such as AT, the TDM proceeding should evaluate a comprehensive range of metabolites. The simultaneous determination of AT and its demethylated and hydroxylated metabolites in routine TDM, can allow the calculation of metabolic ratios for demethylation and hydroxylation and the consequent estimation of the activity of *CYP2D6* and *CYP2C19*. This approach was used by Van der Weide *et al.* [17] with steady state concentrations of AT and NT, when demethylation metabolic ratios showed strong correlation with *CYP2C19* genotypes. In addition, Shimoda *et al.* [18] calculated metabolic ratios either for hydroxylation and demethylation after steady state was

achieved in AT treatment of depression and demonstrated its correlation with *CYP2C19* and *CYP2D6* genotypes. Several analytical methods have been developed for the determination of AT and metabolites in human plasma using either GC with NPD [19-21] or MS [22] detection, or HPLC, mainly with either UV [23-29] or MS detection [30,31]. Most of these reports focus on the determination of different drugs, including AT and NT [19,21,22,27-29,31], and some include the determination of the hydroxylated metabolites [20,23-26,30]. There is no report of the use of a HPLC method to simultaneously determine AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT. The only report of this determination was published recently by Koski *et al* [30], using a LC-MS/MS system. The use of a diode array detector (DAD) detector coupled to the HPLC system allows a more specific analytical technique compared with HPLC methods using traditional detectors such as UV, allowing the identification of unknown peaks eventually present through comprehensive databases of UV-spectra for DAD [32]. Additionally, the DAD permits the evaluation of the spectral purity of the chromatographic peaks, further improving the method specificity [33]. This gain in specificity is specially important in a clinical setting, considering that a significant amount of patients does not report their current use of pharmaceuticals, rising the probability of dangerous drug interactions [34-36]. The plasma sample preparation usually is done by solid-phase extraction [19], liquid-liquid extraction with a solvent evaporation step [29] or by liquid-liquid extraction incorporating a back-extraction of the extraction solvent to a small amount of acidic solution [27]. The latter approach is much faster and provides cleaner extracts than the one-step extraction, also presenting lower operational costs than solid-phase extraction, and has been used as useful alternative on HPLC drug analysis.

The aim of the present work is to develop a simple and fast HPLC-DAD method for simultaneous determination of AT and its demethylated and hydroxylated metabolites (NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT) in small samples of human plasma. Samples were prepared using liquid-liquid extraction with an additional step of simultaneous back-extraction and concentration, avoiding a solvent evaporation procedure and reducing analysis time. The method was applied to a pilot study in the determination of metabolic ratios of AT after a single oral dose in individuals previously phenotyped with respect to CYP2C19 using omeprazole as probe drug.

## **2. Experimental**

### *2.1. Chemicals*

Amitriptyline, nortriptyline and clomipramine hydrochlorides were obtained from Purifarma Química e Farmacêutica (São Paulo, Brazil). E-10-hydroxyamitriptyline (EHAT), Z-10-hydroxyamitriptyline (ZHAT), E-10-hydroxynortriptyline (EHNT), Z-10-hydroxynortriptyline (ZHNT) and desmethylnortriptyline (NNT) were kindly donated by Lundbeck A/S (Copenhagen, Denmark). HPLC grade acetonitrile, isopropyl alcohol, hydrochloric and phosphoric acids were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade n-hexane was obtained from Malinkrodt (Phillisburg, USA). HPLC water was obtained by distillation and deionization and purified additionally with an Elga Purelab Ultra SC system purchased from Analítica (São Paulo, Brazil). Monobasic sodium phosphate and anhydrous dibasic sodium phosphate were purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil). The extraction solvent was prepared by mixing 95 volumes of n-hexane with 5 volumes of isopropyl alcohol. Phosphate buffer pH 2.3 was prepared dissolving 6,66 g of anhydrous dibasic sodium

phosphate in 1000 ml of water with final pH adjustment with orthophosphoric acid 85% (v/v). Before mobile phase preparation, phosphate buffer was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane (Sartorius, Germany). Tris buffer pH 9.5 (0.2 M) was prepared dissolving 23.4 g of tris-hydroxy-methyl-aminometane in 1000 ml of water, with final pH adjustment with 0.1 M HCl. Generic amitriptyline 25 mg tablets were manufactured by Eurofarma Laboratórios Ltda (São Paulo, Brazil).

## *2.2. Equipment*

The chromatographic apparatus consisted of a binary pump LC-10AT, an on line degasser DGU-14, a column oven CTO 10AS, an automatic injector SIL-10AF and a diode array detector SPDM10A. The system was controlled by the software Class VP 6.13 SP2. The complete system was obtained from Shimadzu (Kyoto, Japan).

## *2.3. Chromatographic conditions*

The separation was performed on a Lichrospher RP8ec (250 x 4.0 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ) column with a guard column Lichrospher RP8e (10 x 4.0 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ), both from Merck (Darmstadt, Germany). The integration wavelength was set at 210 nm, with diode array spectral acquisition in the range of 200 to 380 nm. The mobile phase consisted of phosphate buffer pH 2.3 and acetonitrile (63:37, v/v) at a flow rate of 1.0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . The column was kept at 30  $^{\circ}\text{C}$  during the analyses. The mobile phase was prepared daily and degassed by ultrasonication before use. The mobile phase was not allowed to recirculate during the analyses.

## *2.4. Standard solutions*

Stock solutions of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT were prepared in

methanol at the concentration of  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , calculated as base. Working solutions containing all analytes were prepared from stock solutions by dilution with methanol in order to obtain concentrations of 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 and  $5000 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . The stock solution of clomipramine (internal standard) was prepared in methanol at a concentration of  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . The working solution of clomipramine ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was obtained by dilution of the stock solution with methanol. The standard solutions were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### *2.5. Sample preparation*

To  $500 \mu\text{l}$  of plasma in a glass-stoppered 10-ml centrifuge tube,  $50 \mu\text{l}$  of internal standard working solution ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $500 \mu\text{l}$  of Tris buffer pH 9.5 and 5 ml of hexane: isopropyl alcohol (95:5, v/v) were added. After vortex mixing (1 min.), the mixture was centrifuged at 3500 g for 10 minutes and the organic phase was transferred to another glass stoppered tube to which  $150 \mu\text{l}$  of phosphoric acid 0.1 % (v/v) was previously added. This mixture was vortex mixed for 1 minutes and then centrifuged at 3500 g for 10 minutes. The organic layer was discharged and  $100 \mu\text{l}$  of the aqueous phase were transferred for a microvial for autosampler and  $50 \mu\text{l}$  were injected into the liquid chromatograph.

### *2.6. Biological samples*

Pooled blank plasma used to obtain the calibration samples was obtained from healthy volunteers. These samples were tested previously with the proposed method in order to assure the absence of interfering compounds. All blank plasma samples were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , being thawed just before use.

## *2.7. Method validation*

### *2.7.1. Plasma calibration curves and quantitation*

To 450  $\mu\text{l}$  of blank plasma, 50  $\mu\text{l}$  of the working standards containing all analytes were added, yielding final concentrations of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT of 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 500  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . To this mixture, 50  $\mu\text{l}$  of internal standard working solution were added to yield a IS concentration of 200  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Each calibration level was analyzed in sextuplicate. Calibration curves were constructed by plotting peak area ratio ( $y$ ) of the analytes to the internal standard versus concentrations ( $x$ ). A linear regression was used for quantitation, with a weighting factor of  $1/\text{concentration}^2$ .

### *2.7.2. Stability*

The stability of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT was assessed for spiked plasma samples stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for one month, with weekly analysis. Stability was also tested at room temperature for 24 hours at the chromatograph autosampler. The stability of stock solutions stored at above mentioned temperatures was determined by injecting appropriate dilutions of stocks in methanol at different days and comparing their peak areas with fresh stock prepared on the day of analysis. Samples were considered stable if the assay values were within the acceptable limits of accuracy and precision.

### *2.7.3 Selectivity and specificity*

Control human blank plasma, obtained from 10 healthy volunteers, was assessed by the procedure described above to evaluate for the presence of interfering endogenous peaks and by injecting solutions of different compounds usually co-administered with

AT. In all runs, peaks related to AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT were evaluated with respect to their spectral purity and compared with reference spectra at the available library.

#### *2.7.4. Precision and accuracy*

The precision and accuracy experiments were designed according to Wieling [37]. The precision and accuracy of the method were examined by adding known amounts of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT to blank plasma, yielding final concentrations of 25, 50 and 100 ng.ml<sup>-1</sup> of each analyte. Quality control samples were analyzed in triplicate on each of 6 days. The 18 measured concentrations per concentration level were subjected to analysis of variance (ANOVA), considering day as the grouping variable, to estimate the within-run precision and the between-run precision. Precision was expressed as percentage relative standard deviation (R.S.D. %). The accuracy of the method was determined from the same results that were used for the determination of precision. Accuracy was calculated by comparing the mean of the 18 measured concentrations per concentration level with the nominal concentration and was expressed as percentage of the spiked concentration.

#### *2.7.5. Limit of quantitation*

The Limit of Quantitation (LOQ) was established as the lowest concentration evaluated yielding acceptable precision (C.V. < 20 %) and accuracy (80-120 % of theoretical value).

### *2.7.6. Extraction yield (absolute recovery)*

The absolute recovery for plasma at three different concentrations of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT (25, 50 and 100 ng.ml<sup>-1</sup>) was determined. Known amounts of analytes were added to drug-free plasma and submitted to the analysis procedure previously described. The absolute recovery was calculated by comparing the peak areas for extracted analytes from spiked plasma and a standard solution of the compounds in methanol containing internal standard with the same initial concentration (six samples for each concentration level).

### *2.8. Pharmacokinetic study design and sample collections*

The pharmacokinetic pilot study protocol was approved by the Ethics Committees of Centro Universitário Feevale and of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, and a written informed consent was obtained from the volunteers. The participants of the study were previously phenotyped with respect to CYP2C19 activity, with omeprazole as probe drug, being 3 extensive metabolizers (omeprazole hydroxylation ratio of 0.90, 1.25 and 2.41), 1 ultra rapid metabolizer (omeprazole hydroxylation ratio of 0.05) and 1 poor metabolizer (omeprazole hydroxylation ratio of 9.83). Subjects were excluded of the study if they had renal or hepatic insufficiency, were under any drug or herbal treatment, had the presence of any factor affecting AT pharmacokinetics or had a reported allergy to drugs. Before inclusion on the study, hepatic and renal function of all volunteers were evaluated by biochemical assays. Individual with altered hepatic or renal function were excluded from the study. Special instructions were given to all subjects regarding the avoidance of coffee, alcohol, and herbal products 48 hours before the AT administration. AT was administered in a single oral dose of 1 mg/kg body mass to

the volunteers after an 8 hours fasting. Blood samples were collected pre-dose and at 1, 2, 3, 4, 5, 7, 24 and 48 hours after dosing. After collection, plasma was immediately separated and transferred to polypropylene tubes and frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assayed. The volunteers were clinically evaluated with respect to pupil size, blood arterial pressure, pulse rate and electrocardiogram at times 0, 2 and 4 hours. Volunteers were not allowed to drink or eat until 3 hours after drug administration. Plasma concentrations of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT were determined and metabolic ratios and pharmacokinetic parameters were calculated as described below.

### *2.9. Pharmacokinetic data analysis and statistical analyses*

AT and NT pharmacokinetic parameters were determined by non-compartmental methods. Elimination rate constant ( $K_{el}$ ) was estimated by the least-square regression of plasma concentration-time data points in the terminal log-linear region of the curves. Half-life was calculated as  $0.693$  divided by  $K_{el}$ . The area under the plasma concentration–time curve from zero to the last measurable plasma concentration at time  $t$  ( $AUC_{0-t}$ ) was calculated using the linear trapezoidal rule. Peak plasma concentration ( $C_{max}$ ) and time to peak concentration ( $T_{max}$ ) were obtained directly from the individual plasma concentration versus time curves. Demethylation metabolic ratio was calculated as  $[AT]/[NT]$  and hydroxylation metabolic ratio was calculated as  $[NT]/[EHNT]$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Chromatographic conditions

Under the chromatographic conditions described, AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT and the internal standard peaks were well resolved. Endogenous plasma components did not give any interfering peaks. Separation was performed on a fully endcapped octylsilica reversed-phase column, with isocratic elution. Several binary mobile phase compositions of phosphate buffer pH 2.3 and acetonitrile were tested, with phosphate buffer proportions ranging from 60 to 65%. The mobile phase composed of phosphate buffer pH 2.3 and acetonitrile in the ratio of 63:37 (v/v) was the best compromise between resolution of all analytes and analysis time. Complete separation was achieved in less than 20 minutes. Fortunately, the chosen chromatographic conditions allowed the use of a comprehensive database of relative retention times and DAD spectra, acquired between 200 and 380 nm, as proposed by Pragst *et al* [32], allowing the identification of unexpected compounds in patient's samples. Then, for the optimal use of this database, we decided to extend the run time to 30 minutes. One must note that even with patients under medical and pharmaceutical supervision, the use of non reported drug or herbal medicines is a common situation [34-36] and its analytical identification can help to clarify unusual therapeutic and pharmacokinetic behaviors. The selected wavelength for analyte quantification was 210 nm. As in previous works, we used clomipramine as internal standards [27,29], due to its similar structural characteristics to AT and metabolites. Most of the studies on AT metabolite determination by HPLC used amine modifiers to improve chromatographic performance. Fortunately, the conjugation of acidic mobile phase and fully endcapped reversed phase column provided adequate resolution and peak shapes, making the use of amine modifier unnecessary, what can collaborate to

a larger working life of the column. Fig. 2 shows a typical chromatogram of blank plasma. The average retention times EHNT, EHAT, ZHNT, ZHAT, NNT, NT, AT and CLO were 3.7, 4.1, 4.5, 5.1, 9.3, 11.5, 13.2 and 18.4 minutes, respectively, without the occurrence of co-elution. A chromatogram of an extracted calibration plasma sample, with analytes at the concentration of  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ , is presented in figure 3.

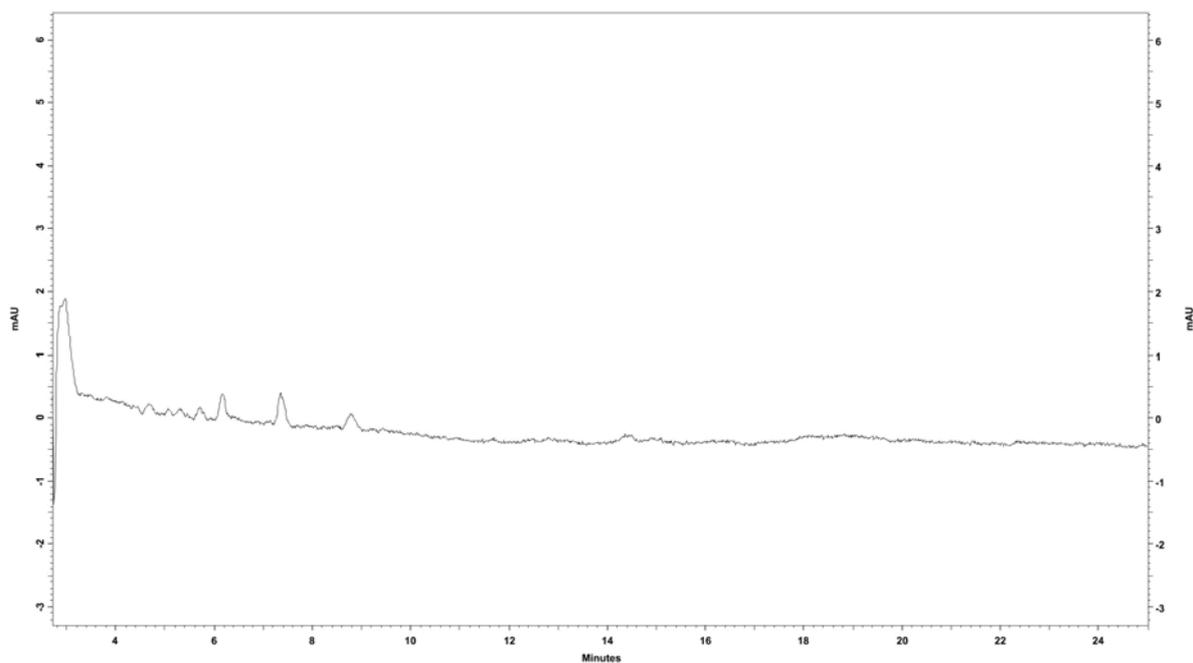


Figure 2. Chromatogram of an extracted blank plasma sample

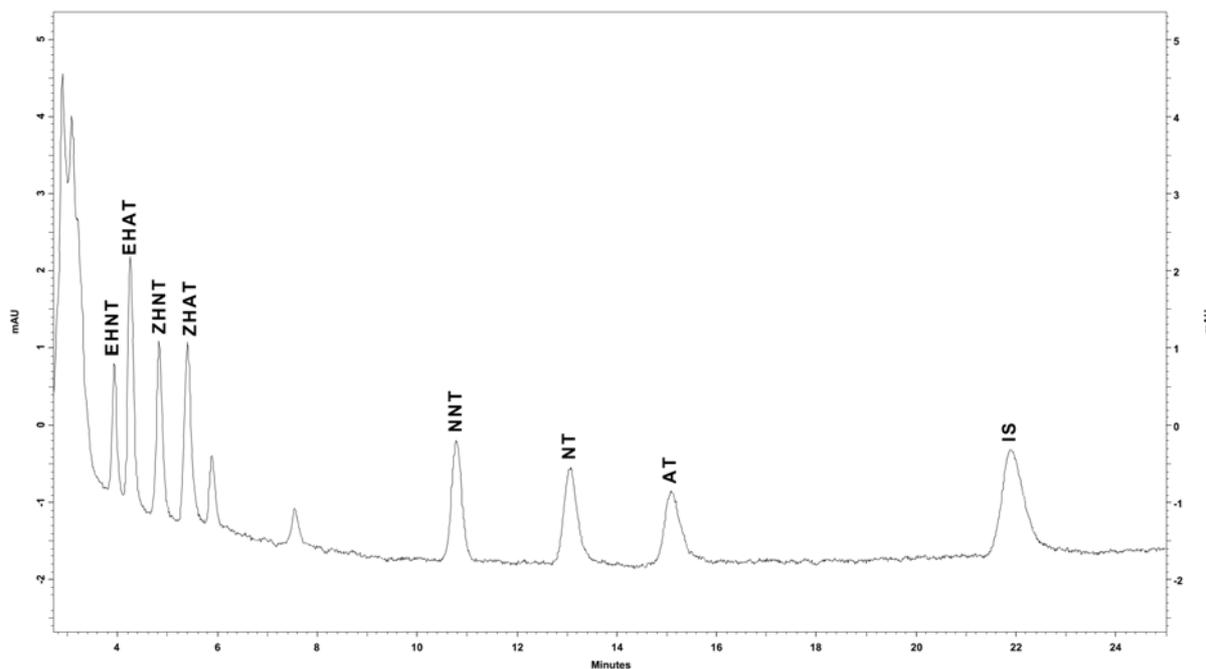


Figure 3. Chromatogram of an extracted calibration plasma sample, with analytes at the concentration of  $50 \text{ ng.ml}^{-1}$ . Internal concentration is  $200 \text{ ng.ml}^{-1}$ .

### 3.2. Sample preparation

Plasma and blood samples have been extracted for the determination of AT and metabolites mainly by solid-phase and liquid-liquid extraction procedures. The latter option, besides its favorable cost characteristics, can provide very clean extracts when submitted to a subsequent back-extraction to an acidic aqueous solution. The cleanness of these extracts allows the use of shorter wavelengths for analyte quantification. In our study we monitored the chromatograms at 210 nm, differently from other authors [27,29] that used longer wavelengths, leading to less sensible determinations. Differently from other studies, we used small volumes of sample, allowing reanalysis if needed even with typical amounts of collected plasma. Usually, the liquid-liquid extraction of tricyclic antidepressants is based on binary mixtures of solvents, mainly composed of an apolar solvent like hexane and more

lipophilic alcohols as butylic, isoamylic and isopropylic [20,25,29]. We tested different proportions of n-hexane and isopropylic alcohol, namely 99:1, 95:9 and 90:10 (v/v). The best compromise between recovery of all analytes, with a wide range of polarities, was achieved with the solvent composed by 95% of n-hexane and 5% of isopropylic alcohol. The smallest extraction yield was obtained with EHNT, the most polar compound analysed. All the other compounds presented recoveries close to 70%, with exception of ZHAT with average extraction yields of 84 %. Considering the lack of endogenous chromatographic interference with the two step liquid-liquid extraction, even the compounds with smaller yields presented adequate limits of detection. In addition, the fast preparation of samples due to the absence of a solvent evaporation step represents a considerable advantage. The whole sample preparation process does not take more than 25 minutes.

### *3.3. Method validation*

Calibration curves were set up on blank plasma by adding to the plasma standard solutions of the analytes at concentrations ranging from 5 to 500 ng.ml<sup>-1</sup> (with IS at a constant 200 ng.ml<sup>-1</sup> concentration) and subjecting the resulting mixtures to the developed two step liquid-liquid extraction. Once area ratios of analytes to internal standard presented significant heteroscedasticity through the range of concentration of the calibration curve, weighted linear regression was used to fit the data, with a weighting factor of 1/concentration<sup>2</sup>. The calculated parameters of linearity assays are reported in table 1. Acceptable linearities were obtained for all analytes, with values of r<sup>2</sup> between 0.992 for EHAT and 1.000 for NNT.

Table 1. Assay linearity and regression analysis

Substance	Parameter	Coefficient	Standard error	r <sup>2</sup>
AMI	Slope	0.009	0.006	0.994
	Intercept	0.018	0.001	
NT	Slope	0.010	0.000	0.998
	Intercept	-0.001	0.004	
NNT	Slope	0.010	0.001	1.000
	Intercept	-0.002	0.000	
EHAT	Slope	0.008	0.001	0.992
	Intercept	0.019	0.006	
ZHAT	Slope	0.009	0.001	0.993
	Intercept	0.070	0.006	
EHNT	Slope	0.004	0.000	0.994
	Intercept	0.020	0.002	
ZHNT	Slope	0.006	0.000	0.993
	Intercept	0.029	0.004	

Once LOQ was defined as the concentration of the lowest calibrator with R.S.D. % < 20 % and accuracy between 80-120 %, the concentration of 5 ng.ml<sup>-1</sup> was estimated as the limit of quantification for all compounds evaluated. Precision results were also satisfactory, with R.S.D. % values for within-run precision always lower than or equal to 10.5 %, and R.S.D. % values for between-run precision lower than or equal to 13.5 %. Accuracy was also acceptable, ranging from 93.4 to 103.4 %. Complete precision, extraction yield and accuracy data are presented at table 2.

Stability of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT was assessed at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for one month, with weekly analysis. Stability samples maintained at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  presented average concentrations values of 98.3% of spiked values with average R.S.D. % of 9.8. Stability samples maintained at  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  showed average concentrations values of 94.7 % of spiked values with average R.S.D. % of 12.3. At room temperature for 24 hours, samples kept at the chromatograph autosampler had average values of 103.1% of spiked concentrations and R.S.D. % of 6.3. Selectivity was evaluated by extracting and analyzing plasma samples drawn from ten different volunteers not subjected to any pharmacological therapy. None of them produced peaks that could interfere with the analysis. In all analysis, peaks were evaluated with respect to spectral purity by the DAD and we did not find any impurity at the peaks related to AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT and internal standard. Further proof of selectivity was obtained from the injection of standard solutions of several drugs that can be coadministered with AT. The average retention time presented by codeine, bromazepam, carbamazepine, nordazepam, paroxetine, diazepam, sertraline and fluoxetine were 2.3, 4.7, 6.7, 7.1, 8.8, 15.8, 16.9 and 17.5, respectively. None of the tested drugs had a retention time similar to those of the analytes or the IS.

Table 2. Precision, extraction yield and accuracy results (n = 18)

Spiked concentration (ng.ml <sup>-1</sup> )	Within-run R.S.D (%)	Between-run R.S.D (%)	Extraction yield (%)	Accuracy (%)
AT				
25	5.3	6.3	73.3	101.5
50	4.8	4.9	75.5	103.4
100	3.7	4.1	75.3	102.6
NT				
25	4.5	5.6	70.2	98.5
50	2.4	5.5	73.8	99.9
100	2.8	3.8	75.3	102.5
NNT				
25	3.5	4.8	68.5	102.7
50	3.2	4.4	69.5	100.9
100	1.8	4.3	72.1	102.1
EHAT				
25	7.8	9.2	68.5	95.8
50	7.7	8.8	66.8	97.3
100	6.9	8.1	71.5	96.9
ZHAT				
25	8.9	11.3	83.2	95.8
50	7.8	10.8	85.3	99.8
100	8.3	8.2	82.6	93.4
EHNT				
25	10.5	13.5	37.3	96.4
50	9.6	12.8	35.2	95.1
100	9.7	12.9	39.7	96.3
ZHNT				
25	9.9	11.2	62.4	92.2
50	10.5	10.5	65.5	95.5
100	8.8	9.3	65.1	95.3

### 3.4. Pharmacokinetic study

A group of five Brazilian volunteers, previously phenotyped with respect to CYP2C19 activity with omeprazole, received a single oral dose of 1mg.kg<sup>-1</sup> AT. All the volunteers presented perceptive sedation, especially in the period of 2 to 4 hours after drug intake. No signs of AT intoxication were observed. The maximal observed concentrations of AT, NT, EHAT, EHNT and ZHNT were 162.8, 32.4, 17.2, 65.4 and 43.0 ng.ml<sup>-1</sup>. ZHAT was detected below the LOQ and was not identified in any sample. Pharmacokinetic parameters were calculated only for AT and NT, once

several metabolites were not detected in enough data points, and are presented at table 3. Half lives of AT and NT presented considerable variations among the individuals. The UM metabolizer for CYP2C19 presented the lowest AT half-live (4.9 hours). The PM for CYP2C19 presented half-life for AT similar to the EM, but was also the only individual with considerable amounts of either EHAT, with  $C_{max}$  of 17.6  $ng.ml^{-1}$ . This preliminary data indicates that the major biotransformation pathway of AT was shunted to hydroxylation in CYP2C19 poor metabolizer, once total metabolite concentration (sum of the concentration of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT ) of PM was not different from EM and UM, besides the presence of very low levels of NT (below 9  $ng.ml^{-1}$ ).

Table 3. Summary of pharmacokinetic parameters obtained after administration of a single oral dose of amitriptyline in a group of volunteers

Volunteer	CYP2C19 phenotype	Amitriptyline			Nortriptyline		
		$C_{max}$ ( $ng.ml^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	AUC ( $ng.ml^{-1}.h$ )	$C_{max}$ ( $ng.ml^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	AUC ( $ng.ml^{-1}.h$ )
1	EM	67.7	13.5	960.7	28.4	49.7	941.8
2	EM	87.1	9.9	843.9	32.4	67.2	788.1
3	EM	51.3	6.3	395.3	23.9	10.6	233.0
4	PM	162.8	11.8	1246.9	8.5	n.d.	n.d.
5	UM	28.0	4.9	139.4	32.3	33.5	530.6

n.d.: not determined

Metabolic ratios for demethylation and hydroxylation were calculated at the times where maximal AT, NT and ZHNT were determined (table 4). These metabolic ratios were compared with omeprazole hydroxylation ratios, previously determined. At 3 hours after drug administration, the PM volunteer, as defined by omeprazole phenotyping, presented AT demetylation ratio ( $[AT]/[NT]$ ) 7.9 times bigger than EMs. In addition, in the same time point, the UM volunteer had AT demethylation 2 times smaller than EMs, together with an hydroxylation ratio for NT ( $[NT]/[EHNT]$ ) also considerably smaller than other participants of the study. Unfortunately, during the present study, there was no knowledge of CYP2D6 phenotype of the volunteers. A chromatogram of a sample obtained 3 hours after AT administration to an EM volunteer is presented in figure 4.

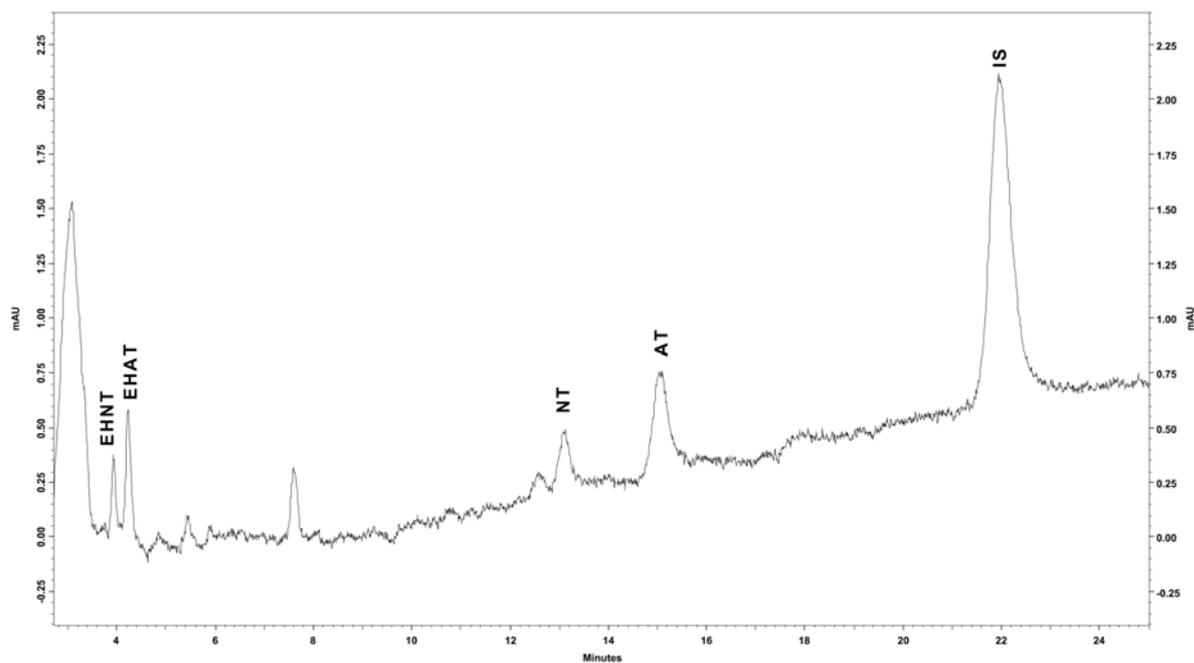


Figure 4. Chromatogram of a volunteer plasma sample, obtained 3 hours after AT administration. Concentrations ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) are 14.1 for EHNT, 16.7 for EHAT, 18.9 for NT and 46.1 for AT. IS concentration is  $200\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Table 4. Relationship between the metabolic ratios for OME hydroxylation and the metabolic ratios for AT demethylation and NT hydroxylation in a group of volunteers

volunteer	[OME]/[HOME] (t = 3 h)	CYP2C19 phenotype	[AT]/[NT] (t = 3 h)	[NT]/[EHNT] (t = 3 h)	[AT]/[NT] (t = 4 h)	[NT]/[EHNT] (t = 4 h)
1	0.90	EM	2.44	1.34	2.00	1.09
2	1.25	EM	2.32	1.03	2.11	0.66
3	2.41	EM	1.64	0.99	2.29	0.79
4	9.83	PM	19.24	n.d.	12.52	n.d.
5	0.05	UM	0.87	0.52	0.49	0.39

EM: extensive metabolizer, PM: poor metabolizer, UM: ultra rapid metabolizer, n.d.: not determined

Van der Weide *et al.* [17] has previously used the determination of AT demethylation ratio to predict *CYP2C19* genotype, but this determination took place after establishment of steady state concentration, which usually takes 3 to 4 weeks. Our preliminary study shows that can be feasible to detect unusual metabolism without the use of classical probe drugs, avoiding the risk of the introduction of an additional drug and the delay on the onset of the adequate treatment, after the first oral dose of AT. To achieve this purpose, a blood sample can be drawn 3 hours after AT intake and the demethylation ratio can be determined with this simple and fast method.

#### **4. Conclusions**

A HPLC-DAD for the simultaneous determination of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT in small human plasma samples was described. The sample preparation is based on a two-step liquid-liquid extraction, without a solvent evaporation step. Samples were stable under standard storage and handling conditions. The method showed to be precise, accurate, specific and sensitive. Currently, this is the first report on the simultaneous quantification of AT, NT, NNT, EHAT, ZHAT, EHNT and ZHNT by HPLC-DAD. With the presented method, it was possible to calculate demethylation and hydroxylation metabolic ratios after a single oral dose of  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  of AT. The demethylation ratios for AT, as determined in this work, correlated with CYP2C19 phenotype determined by omeprazole hydroxylation ratio.

#### **5. Acknowledgements**

The authors are grateful to Lundbeck A/S (Copenhagen, Denmark) for the kind donation of reference samples of amitriptyline metabolites.

#### **6. References**

- [1] I.M. Anderson, *Depress. Anxiety* 7 (Suppl 1) (1998) 11.
- [2] C. Barbui, M. Hotopf, *Brit. J. Psychiat.* 178 (2001) 129
- [3] L.M. Arnold, P.E. Keck, J.A. Welge, *Psychosomatics* 41 (2000) 104.
- [4] P.G. O'Malley, E. Balden, G. Tomkins, J. Santoro, K. Kroenke, J.L. Jackson, J. *Gen. Intern. Med.* 15 (2000) 659.
- [5] U. Breyer-Pfaff, *Drug Metab. Rev.* 36 (2004) 723.

- [6] K. Venkatakrisnan, D.J. Greenblatt, L.L. von Moltke, J. Schmider, J.S. Harmatz, R.I. Shader, *J. Clin. Pharmacol.* 38 (1998) 112.
- [7] U. Breyer-Pfaff, B. Pfandl, K. Nill, E. Nusser, C. Monney, M. Jonzier-Perey, D. Baettig, P. Baumann, *Clin. Pharmacol. Ther.* 52 (1992) 350.
- [8] S. Ulrich, J. Läuter, *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 853.
- [9] S.H. Preskorn, G.S. Jerkovich, *J. Clin. Psychopharmacol.* 10 (1990) 88.
- [10] L. Bertilsson, B. Mellström, F. Sjöqvist. *Life Sci.* 25 (1979) 1285.
- [11] T. Someya, K. Shimoda, S. Yasuda, S. Morita, M. Shibasaki, S. Takahashi, *Eur. Neuropsychopharm.* 6 (supl 3) (1996) 5.
- [12] R.C. Young, G.S. Alexopoulos, C.A. Shamoian, A.K. Dhar, H. Kutt. *Am. J. Psychiatry* 141 (1984) 432.
- [13] L.S. Schneider, T.B. Cooper, J.A. Severson, T. Zemplyeni, R.B. Sloane. *J. Clin. Psychopharmacol.* 8 (1988) 402.
- [14] J. Kirchheiner, K. Brosen, M.L. Dahl, L.F. Gram, S. Kasper, I. Roots, et al. *Acta Psychiatr. Scand.* 104 (2001) 173.
- [15] W. Steimer, K. Zopf, S. Von Amelunxen, H. Pfeiffer, J. Bachofer, J. Popp J, et al. *Clin. Chem.* 50 (2004) 1623.
- [16] R. Linden, A.A. Souto, *Rev. Bras. Toxicol.* 18 (2005) 131.
- [17] J. Van der Weide J, E.H. Van Baalen-Benedek, J.E. Kootstra-Ros, *Ther. Drug Monit.* 27 (2005) 478.
- [18] K. Shimoda, T. Someya, A. Yokono, S. Morita, G. Hirokane, S. Takahashi, et al, *J. Clin. Psychopharmacol.* 22 (2002) 371.
- [19] R. de la Torre, J. Ortuño, J.A. Pascual, S. González, J. Ballesta. *Ther. Drug Monit.* 20 (1998) 340.
- [20] S. Ulrich, T. Isensee, U. Pester. *J. Chromatogr. B* 685 (1996) 81.

- [21] I. Rasanen, I. Kontinen, J. Nokua, I. Ojanperä, E. Vuori. *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 243.
- [22] F. Pragst, M. Rothe, J. Hunger, S. Thor. *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 225.
- [23] J.S. Kiel, R.K. Abramson, C.S. Smith, S.L. Morgan, *J. Chromatogr.* 383 (1986) 119.
- [24] P.M. Edelbroek, J.M. de Haas, F.A. de Wolff, *Clin. Chem.* 28 (1982) 2143.
- [25] S. Härtter, C.J. Hiemke, *J. Chromatogr.* 578 (1992) 273.
- [26] P.M. Edelbroek, F.G. Zitman, J.N. Schreuder, H.G.M. Rooymans, F.A. de Wolff, *Clin. Pharmacol. Ther.* 35 (1984) 467.
- [27] G. Aymard, P. Livi, Y.T. Pham, B. Diquet. *J. Chromatogr. B* 700 (1997) 183.
- [28] C. Frahnert, M.L. Rao, K. Grasmäder. *J. Chromatogr. B* 794 (2003) 35.
- [29] R.H.C. Queiroz, V.L. Lanchote, P.S. Bonato, D. de Carvalho. *Pharm. Acta Helv.* 70 (1995) 181.
- [30] A. Koski, J. Sistonen, I. Ojanperä, M. Gergov, E. Vuori, A. Sajantila A, *Forensic Sci. Int.* 158 (2006) 177.
- [31] M. Kollroser, C. Schober. *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 537.
- [32] F. Pragst, M. Herzler, S. Herre, B.T. Erxleben, M. Rothe. *UV Spectra of Toxic Compounds.* Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, 2001.
- [33] F. Pragst, M. Herzler, B-T. Erxleben, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 1325.
- [34] I. Akwagyriam, L.I. Goodyer, L. Harding, S. Khakoo, H. Millington, *J. Accid. Emerg. Med.* 13 (1996) 166.
- [35] S. Berndt, C. Maier, H.W. Schütz, *Pain* 52 (1993): 331.
- [36] K. Rieger, A. Scholer, I. Smet, F.T. Peters, H.H. Maurer, I. Walter-Sack, W.E. Haefelli, M. Martin-Facklam, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60 (2004) 363.

[37] J. Wieling, G. Hendriks, W.J.Tamminga, J. Hempenius, C.K. Mensink, B. Oosterhuis, J. H. Jonkman,. J. Chromatogr. A 730 (1996) 381.

## RESULTADOS ADICIONAIS

Os 38 voluntários participantes do estudo de fenotipagem utilizando omeprazol como sonda metabólica doaram uma amostra adicional de sangue venoso, que foi utilizada para genotipagem de *CYP2C19* e *CYP2D6*. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale.

As análises de genotipagem foram realizadas pelo Dr. Mladen Tzvetkov, do Departamento de Farmacologia Clínica da Universidade Georg-August de Göttingen, Alemanha.

A genotipagem de *CYP2C19* foi realizada através de um ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (Taqman<sup>®</sup>, ensaio C\_1329163\_10, Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. A genotipagem dos alelos \*1, \*2, \*3, \*4, \*6, \*35 e \*41 de *CYP2D6* foi realizada com uma modificação do método de extensão de primer de base única descrito por FUSELLI *et al.* (2004). Deleções (alelo \*5) ou multiplicações completas do gene *CYP2D6* foram identificadas conforme procedimento descrito anteriormente por SACHSE *et al.* (1997).

Para cada indivíduo foi estimada uma dose semiquantitativa do gene (DSG), calculada a partir da soma dos valores atribuídos a cada alelo presente, segundo STEIMER *et al.* (2004). Para *CYP2D6*, foi atribuído valor 0 para alelos nulos completamente disfuncionais (\*3, \*4, \*5, \*6, \*7 e \*8); 0,5 para alelos parcialmente funcionais (\*9, \*10 e \*41) e 1 para alelos funcionais (\*1, \*2 e \*35). Para *CYP2C19*, foi atribuído valor 0 para alelos disfuncionais (\*2 e \*3) e 1 para alelos completamente funcionais (\*1). A tabela 1 apresenta o resultados dos testes de genotipagem associados às razões metabólicas para *CYP2C19*, bem como a dose semiquantitativa do gene.

Tomando como referência as doses do gene, os voluntários foram classificados conforme o fenótipo estimado a partir do genótipo. Desta forma, indivíduos com DSG igual a 0 foram classificados como MPg (metabolizador pobre genotípico); indivíduos com DSG entre 0,5 e 1,0 foram classificados como MIg (metabolizador intensivo genotípico); indivíduos com DSG entre 1,5 e 2 foram classificados como MEg (metabolizadores extensivos genotípicos) e indivíduos com DSG igual ou superior a 3 como URg (metabolizador ultra-rápido genotípico).

Com base nos genótipos de *CYP2C19*, foram identificados 4 MPg (8 %), 23 MEg (62 %) e 11 MIg (30 %). A genotipagem de *CYP2D6* identificou a presença, no grupo avaliado, de 2 MPg (5 %), 20 MEg (53 %), 15 MIg (39 %) e 1 URG (3 %). As frequências de fenótipos previstos com base no genótipo foram semelhantes às aquelas encontradas em estudos anteriores com populações caucasianas (GOLDSTEIN *et al.*, 1997; SACHSE *et al.*, 1997).

Tabela 1. Razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol e genótipos para *CYP2C19* e *CYP2D6* nos voluntários participantes do estudo

voluntário	[OME]/[HOME]	<i>CYP2C19</i>			<i>CYP2D6</i>		
		alelos	DG	Fenótipo previsto	Alelos	DG	Fenótipo previsto
1	0,05	*1/*1	2	MEg	*4/*5	0	MPg
2	0,54	*1/*1	2	MEg	*1/*1	2	MEg
3	0,61	*1/*1	2	MEg	*1/*41	1,5	MEg
4	0,80	*1/*1	2	MEg	*2/*2	2	MEg
5	0,80	*1/*1	2	MEg	*2/*2	2	MEg
6	0,90	*1/*1	2	MEg	*9/*5	0,5	MIg
7	0,90	*1/*1	2	MEg	*1/*1	2	MEg
8	1,10	*1/*1	2	MEg	*1/*4	1	MIg
9	1,17	*1/*1	2	MEg	*1/*4	1	MIg
10	1,22	*1/*1	2	MEg	*2/*41	1,5	MEg
11	1,24	*1/*1	2	MEg	*1/*10	1,5	MEg
12	1,24	*1/*1	2	MEg	*1/*1	2	MEg
13	1,25	*1/*2	1	MIg	*4/*4	0	MPg
14	1,25	*1/*1	2	MEg	*1/*2	2	MEg
15	1,30	*1/*1	2	MEg	*2/*4	1	MIg
16	1,34	*1/*1	2	MEg	*1/*1	2	MEg
17	1,40	*1/*2	1	MIg	2X*1/*2	3	URg
18	1,51	*1/*1	2	MEg	*2/*2	2	MEg
19	1,55	*1/*1	2	MEg	*1/*4	1	MIg
20	1,64	*1/*1	2	MEg	*1/*41	1,5	MEg
21	1,65	*1/*1	2	MEg	*41/*41	1	MIg
22	1,69	*1/*2	1	MIg	*1/*1	2	MEg
23	1,70	*1/*2	1	MIg	*2/*35	2	MEg
24	1,72	*1/*1	2	MEg	*1/*1	2	MEg
25	1,97	*1/*2	1	MIg	*4/*41	0,5	MIg
26	2,06	*1/*2	1	MIg	*1/*6	1	MIg
27	2,12	*1/*1	2	MEg	*1/*5	1	MIg
28	2,12	*1/*2	1	MIg	*1/*2	2	MEg
29	2,27	*2/*2	0	MPg	*2/*5	1	MIg
30	2,41	*1/*1	2	MEg	*1/*41	1,5	MEg
31	2,45	*1/*1	2	MEg	*2/*2	2	MEg
32	2,77	*1/*2	1	MIg	*1/*1	2	MEg
33	2,83	*2/*2	0	MPg	*2/*4	1	MIg
34	3,03	*1/*2	1	MIg	*2/*4	1	MIg
35	3,97	*1/*2	1	MIg	*2/*10	1,5	MEg
36	5,44	*1/*2	1	MIg	*1/*1	2	MEg
37	6,62	*2/*2	0	MPg	*2/*4	1	MIg
38	9,83	*2/*2	0	MPg	*1/*4	1	MIg

Foi possível observar que os grupos classificados de acordo com a DSG apresentaram diferenças significativas entre as razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol ([OME]/[HOME]), indicador fenotípico de CYP2C19 utilizado nesta tese, conforme dados apresentados na tabela 2. Entretanto, foi observada uma clara sobreposição entre valores de [OME]/[HOME] entre os diferentes grupos de DSG. Especialmente, foi observada uma maior dispersão dos valores de [OME]/[HOME] no grupo MPg, provavelmente devido a variabilidade na atividade de rotas metabólicas alternativas

Tabela 2. Comparação entre dose semiquantitativa do gene CYP2C19 e razões metabólicas obtidas no experimento de fenotipagem com omeprazol

DSG	n	[OME]/[HOME] ± DP (min - máx)*	Fenótipo previsto
2	23	1,28 ± 0,57 (0,05 - 2,45)	MEg
1	11	2,49 ± 1,26 (1,25 - 5,44)	MIg
0	4	5,39 ± 3,54 (2,27 - 9,83)	MPg

\* Diferença entre grupos estatisticamente diferentes, P = 0,001, teste Kruskal-Wallis

No estudo farmacocinético com amitriptilina (AT), apesar do pequeno número de voluntários participantes desta etapa, foi possível observar diferenças entre as razões metabólicas de desmetilação de AT ([AT]/[NT]) entre os grupos de DSG de CYP2C19 (tabela 3). As razões metabólicas de hidroxilação de amitriptilina ([AT]/[EHAT]) e de hidroxilação de nortriptilina ([NT]/[EHNT]) não apresentaram correlação aparente com a DGS de CYP2D6. Entretanto, observa-se que o único voluntário MPg para CYP2C19 nesta etapa do estudo também foi o único no qual foram detectadas concentrações quantificáveis de E-10-hidróxi-amitriptilina (EHAT) 3

horas após a administração do fármaco. Este achado denota uma provável participação de rotas metabólicas alternativas, provavelmente com a participação de CYP2D6.

Tabela 3. Comparação entre as razões metabólicas [OME]/[HOME], [AT]/[NT] e [NT]/[EHNT] e as doses semiquantitativas do gene para *CYP2C19* e *CYP2D6*

voluntário	[OME]/[HOME] (t = 3 h)	DSG CYP2C19	[AT]/[NT] (t = 3 h)	DSG CYP2D6	[NT]/[EHNT] (t = 3 h)	[AT]/[EHAT] (t = 3 h)
1	0.05	2	0.87	0	0.52	n.d.
6	0.90	2	2.44	0,5	1.34	n.d.
14	1.25	2	2.32	2	1.03	n.d.
3	2.41	2	1.64	1,5	0.99	n.d.
38	9.83	0	19.24	1	n.d.	8,93

n.d.: não determinado (analitos abaixo do limite de quantificação)

## DISCUSSÃO

A prática usual do monitoramento terapêutico de fármacos não leva em consideração aspectos relevantes que impactam nas concentrações plasmáticas da amitriptilina e seus metabólitos, especialmente antes da obtenção do estado estacionário. Dentre estes, destaca-se a identificação de interações farmacocinéticas com outros fármacos e as características metabólicas individuais.

LAZAROU *et al.* (1998) demonstraram que mesmo entre pacientes hospitalizados as reações adversas a fármacos estão entre as seis causas de morte mais freqüentes. Também, no estudo de RIEGER *et al.* (2004), foi observado um índice elevado de achados positivos em análises toxicológicas em amostras fornecidas por pacientes que, em entrevista, não relataram o uso ou a exposição a estas substâncias. Desta forma, considerando as evidências disponíveis e o impacto das interações entre fármacos na atividade das enzimas metabolizadoras, pode-se propor que o monitoramento terapêutico de fármacos também deva incluir a realização de análises de triagem toxicológica.

Diferentes metodologias têm sido empregadas na identificação de substâncias de interesse toxicológico em amostras biológicas. Recentemente, sistemas com elevada sensibilidade e especificidade tem sido propostos empregando metodologias como a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas em tandem ou com detectores de tempo de voo (MARQUET, 2002; OJANPERÄ *et al.*, 2005). Entretanto, o custo destes equipamentos representa uma importante limitação ao seu uso disseminado, especialmente em países em desenvolvimento. Em uma revisão recente, DE ZEEUW (2004), considerado um dos fundadores da análise toxicológica sistemática, indicou sua preocupação com o fato de que, mesmo com os recentes avanços tecnológicos, a identificação de

substâncias em toxicologia analítica ainda deixa muito a desejar. No mesmo artigo, o autor destacou a importância da disponibilidade de técnicas de identificação de menor custo e que sejam acessíveis a um número maior de laboratórios.

Neste contexto, embora diversos autores tenham publicado amplas bases de dados de comportamento cromatográfico de compostos de interesse toxicológico em sistemas padronizados (DE ZEEUW *et al.*, 1992; DE ZEEUW *et al.*, 1992a; PRAGST *et al.*, 2001), o uso destas bases na atividade diária dos laboratórios de análises toxicológicas é limitado. Este fato se deve, principalmente, pela dificuldade associada ao tratamento dos dados, especialmente no cálculo de parâmetros de retenção mais complexos, como fatores de retardamento corrigidos em cromatografia em camada delgada, índices de retenção em cromatografia gasosa e líquida, e na busca nas bases de dados considerando os aspectos estatísticos (HARSTRA *et al.* (2000).

Em nosso estudo, desenvolvemos um sistema de acesso livre através da rede mundial de computadores que permite, após a utilização de métodos estritamente padronizados, o cálculo de parâmetros cromatográficos complexos e a busca em bases de dados disponíveis na literatura. No artigo publicado pelos autores em Química Nova, a utilização do sistema com dados do antidepressivo imipramina demonstra o aumento na probabilidade de identificação de um determinado composto pela associação de metodologias analíticas simples e de baixo custo. Desta forma, o sistema informatizado de análise toxicológica sistemática desenvolvido pode permitir que laboratórios com recursos limitados possam realizar análises de triagem toxicológica com a capacidade de identificar um grande número de substâncias. Cabe destacar que atualmente não existe sistema semelhante disponível, mesmo internacionalmente.

Entretanto, uma limitação natural da análise toxicológica sistemática com enfoque probabilístico é o conteúdo das bases de dados. Nesta abordagem, compostos que não estão presentes na base de dados não poderão ser identificados.

Além da identificação de interações potenciais através da análise toxicológica sistemática, outro aspecto importante a ser considerado na implementação da farmacoterapia com amitriptilina é o perfil metabolizador individual. Esta avaliação tem sido realizada através de procedimentos de fenotipagem, com a administração de fármacos sonda, ou pela genotipagem de polimorfismos relacionados às enzimas da superfamília citocromo P450. As principais CYPs envolvidas no metabolismo da amitriptilina são a CYP2D6, principal responsável pelas reações de hidroxilação, e a CYP2C19, maior responsável pelas reações de desmetilação.

Neste estudo, a avaliação da capacidade metabolizadora dos sujeitos da pesquisa foi avaliada através de estratégias de fenotipagem, amplamente discutidas no artigo publicado na Revista Brasileira de Toxicologia. O trabalho foi focado na avaliação do fenótipo para CYP2C19 uma vez que dificuldades técnicas, como a disponibilidade de instalações para internação dos voluntários devido aos potenciais efeitos adversos do fármaco sonda metoprolol, impediram a realização da fenotipagem para CYP2D6.

Um estudo recente demonstrou que pacientes com genótipo metabolizador pobre para *CYP2C19*, quando associado ao genótipo metabolizador extensivo para *CYP2D6*, apresentam menor risco de reações adversas associadas à terapêutica com amitriptilina. A hipótese proposta é que estas reações estão relacionadas à níveis aumentados de nortriptilina, principal metabólito desmetilado da amitriptilina (STEIMER *et al.*, 2005).

O método desenvolvido para fenotipagem de CYP2C19, utilizando omeprazol como sonda de metabólica, permitiu também a fenotipagem simultânea de CYP3A4. A metodologia desenvolvida, além de apresentar parâmetros adequados de validação, permitiu a identificação de uma ampla faixa de atividades metabólicas. O método para determinação simultânea de omeprazol, 5-hidróxi-omeprazol e omeprazol sulfona é o primeiro descrito na literatura disponível com a utilização de detector de arranjo de diodos (DAD), o qual permite obter um ganho considerável de especificidade especialmente quando considerados todos os potenciais interferentes em análises cromatográficas a partir de extratos biológicos.

Embora não tenha sido possível calcular antimodas para a população estudada devido ao tamanho amostral limitado, valores utilizados previamente para a classificação de fenótipos para CYP2C19 utilizando razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol (GONZÁLEZ *et al.*, 2003) permitem estimar a presença de 1 UR (2,6%), 3 MP (7,9 %) e 34 ME (89,5%) no grupo de voluntários avaliado. Estas frequências são similares às encontradas em estudos de populações caucasianas (GOLDSTEIN *et al.*, 1997). Considerando os resultados das análises de genotipagem, poderia se estimar, no mesmo grupo de indivíduos, a presença de 4 MPg (8 %), 23 MEG (62 %) e 11 MIg (30 %). Considerando que os indivíduos com 1 alelo funcional para CYP2C19 normalmente apresentam fenótipo ME, o número de total de MP e ME estimados pela fenotipagem e pela genotipagem são bastante semelhantes. Entretanto, a genotipagem não permitiu a identificação de 1 UR fenotípico presente no grupo de voluntários. Também, indivíduos MPg apresentaram razões metabólicas para hidroxilação de omeprazol em uma ampla faixa de valores, com sobreposição aos valores obtidos por MEG e MIg. Desta forma, a genotipagem de CYP2C19 no grupo de MPg não permitiu uma estimativa adequada da atividade

de hidroxilação do omeprazol dos indivíduos participantes do estudo. Provavelmente, este fato deve-se à participação de rotas metabólicas alternativas à CYP2C19 nestes indivíduos.

A genotipagem de *CYP2D6* identificou a presença, no grupo avaliado, de 2 MPg (5 %), 20 MEg (53 %), 15 MIg (39 %) e 1 URG (3 %). As freqüências de fenótipos previstos com base no genótipo foram semelhantes às aquelas encontradas em estudos anteriores com populações caucasianas (GOLDSTEIN *et al.*, 1997; SACHSE *et al.*, 1997).

VAN DER WEIDE *et al.* (2005) demonstraram a correlação entre a razão metabólica de desmetilação da amitriptilina em pacientes em estado estacionário com o genótipo de *CYP2C19*. Uma abordagem não avaliada foi o estabelecimento da mesma correlação após uma dose oral única, quando as concentrações plasmáticas são consideravelmente influenciadas pelos processos de distribuição. Deve-se considerar que a fenotipagem de um paciente previamente ao início do tratamento com amitriptilina com a utilização de uma sonda de fenotipagem “clássica”, a fim de permitir o ajuste de dose com base no fenótipo, freqüentemente não é viável, principalmente devido ao retardo no início do tratamento. O conhecimento do fenótipo de *CYP2C19* pode influenciar no regime posológico, no caso da amitriptilina. KIRCHHEINER *et al.* (2001) propuseram ajustes de dose de amitriptilina baseadas no genótipo e/ou fenótipo de *CYP2C19*. Neste estudo, recomenda-se que metabolizadores pobres devam receber 60% da dose usual, enquanto metabolizadores extensivos devam receber 110% das doses normalmente recomendadas.

Para avaliar a relação entre razões metabólicas de desmetilação de amitriptilina, calculadas a partir das concentrações de amitriptilina e nortriptilina e o

fenótipo de CYP2C19 determinado com omeprazol, foi desenvolvido um método cromatográfico por HPLC-DAD para determinação de amitriptilina e seis metabólitos desmetilados e hidroxilados. Este é o primeiro método descrito para determinação simultânea destes compostos por cromatografia líquida associada a detectores espectrofotométricos e permite, também, a determinação de razões metabólicas de hidroxilação, indicativas da atividade de CYP2D6. As razões metabólicas de desmetilação de amitriptilina mostraram correlação aparente com aquelas obtidas com omeprazol, embora o pequeno grupo de voluntários participantes desta etapa do estudo limitem esta conclusão. As razões metabólicas de hidroxilação não apresentaram correlação aparente com as DSG de *CYP2D6*.

Desta forma, a abordagem proposta, através da associação de análise toxicológica sistemática e da avaliação da atividade de CYP2C19 imediatamente após a primeira dose oral de amitriptilina, pode contribuir significativamente para o aumento da segurança na utilização deste fármaco. Cabe destacar que o custo das análises, mesmo quando incluem testes de genotipagem, é inferior àqueles relacionados com os decorrentes das reações adversas da amitriptilina e do uso de fármacos mais modernos como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (STEIMER *et al.*, 2005).

## CONCLUSÕES

- Um sistema para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados de comportamento cromatográficos foi desenvolvido e está disponível através da rede mundial de computadores. Este sistema permite, através da associação de dados obtidos em diferentes sistemas analíticos, a identificação de compostos de interesse toxicológico mesmo sem a disponibilidade de amostras de referência. O sistema, disponível em [www.feevale.br/toxicologia/ats](http://www.feevale.br/toxicologia/ats) é o único desta natureza disponível internacionalmente.

- Uma metodologia por CLAE-DAD para fenotipagem simultânea de CYP2C19 e CYP3A4 após a administração de uma dose oral única de omeprazol foi desenvolvida e validada. A metodologia desenvolvida é a única disponível na literatura que determina simultaneamente omeprazol, 5-hidróxi-omeprazol e omeprazol sulfona em amostras de plasma humano por cromatografia líquida com a utilização de detectores DAD, o que contribui significativamente para sua especificidade.

- Um grupo de 38 voluntários saudáveis foi fenotipado através do método desenvolvido. Foi observada uma ampla variabilidade de razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol, na faixa de 0,05 a 9,83. Devido ao tamanho amostral reduzido não foi possível calcular valores de antimodas, mas com base em dados de literatura podemos estimar a presença, no grupo avaliado, de 1 metabolizador ultra-rápido, 3 metabolizadores pobres e 34 metabolizadores extensivos para CYP2C19. Também foi identificado um metabolizador ultra-rápido para CYP3A4. Este é o primeiro trabalho relatado de fenotipagem de CYP2C19 e CYP3A4 em um grupo de voluntários brasileiros.

- Os 38 voluntários fenotipados com omeprazol foram genotipados para *CYP2C19* e *CYP2D6*, permitindo a determinação de doses semiquantitativas dos genes e a estimativa de fenótipos baseados no genótipo. Foi estimada a presença de 4 metabolizadores pobres genotípicos (8 %), 23 metabolizadores extensivos genotípicos (62 %) e 11 metabolizadores intensivos genotípicos (30 %). A genotipagem de *CYP2D6* identificou a presença de 2 metabolizadores pobres genotípicos (5 %), 20 metabolizadores extensivos genotípicos (53 %), 15 metabolizadores intensivos genotípicos (39 %) e 1 metabolizador ultra-rápido genotípico (3 %). As frequências de fenótipos previstos com base no genótipo foram semelhantes às encontradas em estudos anteriores com populações caucasianas

- Os grupos de voluntários classificados de acordo com a dose semiquantitativa do gene *CYP2C19* apresentaram diferenças significativas entre as razões metabólicas de hidroxilação de omeprazol ([OME]/[HOME]).

- A partir do genótipo para *CYP2C19* não foi possível prever a razão metabólica de hidroxilação do omeprazol para os indivíduos com nenhum alelo funcional.

- Um método para determinação simultânea de amitriptilina, nortriptilina, desmetilnortriptilina, E-10-hidróxi-amitriptilina, Z-10-hidróxi-amitriptilina, E-10-hidróxi-nortriptilina e Z-10-hidróxi-nortriptilina em amostras de plasma humano foi desenvolvido e validado. O método apresentou elevada sensibilidade mesmo com a utilização de amostras de pequeno volume. Este é o único método disponível na literatura para determinação simultânea deste compostos em cromatografia líquida com detectores espectrofotométricos.

- Voluntários com diferentes fenótipos para CYP2C19 apresentaram razões metabólicas de desmetilação de amitriptilina nitidamente diferentes. Nas determinações realizadas 3 horas após a administração de uma dose oral de amitriptilina, o voluntário metabolizador pobre apresentou uma razão metabólica 7,9 maior que os metabolizadores extensivos, enquanto que o metabolizador ultra-rápido apresentou valor cerca de 2 vezes menor. A ampliação do grupo de voluntários é necessária para conclusões mais definitivas.

- Os resultados obtidos permitem propor que a determinação da razão metabólica de desmetilação da amitriptilina em amostras coletadas 3 horas após a administração de uma dose oral pode servir para a identificação de fenótipos aberrantes para CYP2C19. Com base no conhecimento atual, esta informação pode ser utilizada para o ajuste posológico deste fármaco, sem a necessidade de reações de genotipagem ou da administração de fármacos-sonda de fenotipagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akwagyriam I, Goodyer LI, Harding L, Khakoo S, Millington H. Drug history taking and the identification of drug related problems in an accident and emergency department. *J. Accid. Emerg. Med.* 1996; 13: 166-168.

Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Gaertner I, Rao ML, Ecjermann G, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, Müller-Oerlinghausen B, Riederer P, Zerni G. Therapeutic Monitoring of Psychotropic Drugs, An outline of the AGNP-TDM Expert Group Consensus Guideline. *Ther. Drug Monit.* 2004; 26 (2): 167-170.

Berndt S, Maier C, Schütz HW. Polymedication and medication compliance in patients with chronic non-malignant pain. *Pain* 1993; 52: 331-339.

De Zeeuw RA, Franke JP, Degel F, Machbert G, Schütz H, Wijsbeek J. Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1992.

De Zeeuw RA, Franke JP, Maurer HH, Pflieger K. Gas Chromatographic Retention Indices of Toxicologically Relevant Substances on Packed or Capillary Columns with Dimethylsilicone Stationary Phases. 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1992a.

De Zeeuw, RA. Substance Identification: the weak link in analytical toxicology. *J. Chromatog. B* 2004; 811: 3-12.

Fuselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruciani F, Scozzari R, Moral P, Sistonen J, Sajantila A, Barbujani G. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in the Mediterranean region. *Eur. J. Hum. Gen.* 2004; 12:916-924.

Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, Morais SM, Bell D, Krahn PM. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 59-64.

González, HM, Romero EM, Peregrina AA, Chavez TJ, Escobar-Islas E, Lozano F *et al.* CYP2C19- and CYP3A4-Dependent Omeprazole Metabolism in West Mexicans. *J. Clin. Pharmacol.* 2003; 43: 1211-1215.

Harstra J, Franke JP, De Zeeuw RA. How to approach substance identification in qualitative bioanalysis. *J. Chromatog. B* 2000; 739: 125-137.

Kirchheiner J, Brosen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, *et al.* CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr. Scand.* 2001;104:173–92.

Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1200–5.

Linder MW, Keck PE. Standards of laboratory practice, antidepressant drug monitoring. *Clin. Chem.* 1998; 44 (5): 1073-1084.

Marquet P. Is LC-MS Suitable for a Comprehensive Screening of Drugs and Poisons in Clinical Toxicology? *Ther. Drug Monit.* 2002; 24 (1): 125-133.

Mitchell PB. (2000). Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *Brit. J. Clin. Pharm.* 2000; 49: 303-312.

Ojanperä I, Pelander A, Laks S, Gergov M, Vuori E, Witt M. Application of accurate mass measurement to urine drug screening. *J. Anal. Toxicol.* 2005; 25 (1); 34-40.

Pragst F, Herzler M, Herre S, Erxleben BT, Rothe M. *UV Spectra of Toxic Compounds*. 4th ed. Heppenheim: . Verlag Dr. Dieter Helm; 2001.

Rieger K, Scholer A, Smet I, Peters FT, Maurer HH, Walter-Sack I, Haefeli WE, Martin-Facklam M. High Prevalence of unknown co-medication in hospitalized patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2004; 60: 363-368.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60:284-295.

Steimer W, Zöpf K, Von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Allele-Specific change of Concentration and Functional Gene Dose for the Prediction of Steady-State Serum Concentrations of Amitriptyline and Nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 Extensive and Intermediate Metabolizers. *Clin. Chem.* 2004; 50(9): 1623-1633.

Steimer W, Zöpf K, Von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Amitriptyline or Not, That Is the Question: Pharmacogenetic Testing of CYP2D6 and CYP2C19 Identifies Patients with Low or High Risk for Side Effects in Amitriptyline Therapy. *Clin. Chem.* 2005; 51: 376-385.

Van der Weide J, Van Baalen-Benedek EH, Koostra-Ros JE. Metabolic ratios of psychotropics as indication of Cytochrome P450 2D6/2C19 genotype. *Ther. Drug Monit.* 2005; 27 (4): 478-483.