

Hoja de aprobación

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 147

Tijuana, B. C., a 23 de julio de 2015

C. Gilberto Quiñonez Palacio
Pasante de: Doctor en Ciencias de la Salud
Presente


El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo

quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: Estudio clínico de tabletas de 7.5 mg de capsaicina y su posible uso en el
tratamiento de la Neuropatía Diabética.

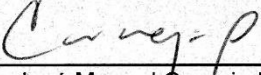
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- TEORIA GENERAL
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES



Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Director Secretario





Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi esposa quien es esencial para mí, a mis hijos quien es mi orgullo y a mis nietos que son la alegría de mí ser.

Agradecimientos

En primer lugar a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería pues fue quien me dio la oportunidad de entrar al increíble universo de la investigación, dándome la oportunidad primero de cursar la maestría y ahora en doctorado. Un agradecimiento muy especial al Dr. José Manuel Cornejo Bravo quien fue mi maestro en maestría y doctorado y además mi tutor, gracias José Manuel.

Otra persona de la Facultad es la Dra. Aracely Serrano Medina quien me guio con sus sugerencias y aportaciones para elaborar y terminar mi tesis, gracias Aracely.

Un agradecimiento muy especial a Victory Enterprises al QFI. Francisco Gómez Hernández quien ha mostrado interés en el proyecto y que sin su apoyo no hubiera logrado obtener resultados.

Al QFB. David Vargas Torres por su cooperación en el desarrollo de este proyecto por su valiosa colaboración y sus sugerencias.

Muchas gracias a Benjamín Gómez por su excelente trabajo y apoyo en la elaboración de las diferentes gráficas y figuras.

Publicaciones

“Possible use of oral capsaicin lipid nanoparticles in symmetric diabetic neuropathy” 15th World Congress on Pain Buenos Aires, Argentina October 2014.

“Capsaicina., el y su uso en neuropatía diabética” Revista Portales médicos, Volumen Numero 2, Enero 2015.

Índice

| | |
|--|----|
| Hoja de aprobación..... | 1 |
| Dedicatoria..... | 2 |
| Agradecimientos..... | 3 |
| Publicaciones..... | 4 |
| Lista de símbolos, abreviaturas y definiciones..... | 7 |
| Lista de tablas y figuras..... | 12 |
| Resumen..... | 14 |
| Capítulo I Introducción..... | 16 |
| 1.1. Antecedentes..... | 16 |
| 1.2. Objetivo general..... | 20 |
| 1.3. Justificación..... | 20 |
| Capítulo II. Teoría general..... | 21 |
| II.2. Neuropatía diabética..... | 21 |
| II.2.1. Bases diagnósticas..... | 26 |
| II.3. Farmacología de la capsaicina..... | 29 |
| II.3.2. Parámetros farmacocinéticas de la capsaicina..... | 30 |
| II.3.3. Farmacodinamia, propiedades farmacológicas y mecanismo de acción.... | 31 |
| II.3.4. Reacciones adversas..... | 32 |
| II.3.5. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia..... | 32 |
| II.3.6. Precaución efectos de carcinogénesis, mutagénesis y sobre la fertilidad..... | 33 |
| II.3.7. Interacciones medicamentosas..... | 33 |
| II.3.8. Precauciones generales..... | 33 |
| II.3.9. Toxicidad..... | 33 |
| Capítulo III. Parte experimental..... | 36 |
| III.1. Primera etapa..... | 36 |
| III.1.1. Información general..... | 37 |
| III.1.2. Selección de pacientes..... | 38 |
| III.1.3. Periodo de estudio..... | 40 |
| III.1.4. Administración farmacológica..... | 41 |
| III.1.5. Plan operativo..... | 41 |
| III.1.6 Acceso directo a los datos reales obtenidos..... | 50 |
| III.1.7. Contrato con ambulancia y servicio de hospital en caso de emergencia... | 50 |
| III.1.8. Estadística y plan estadístico..... | 51 |
| III.1.9. Eventos adversos..... | 52 |
| III.2 Segunda etapa..... | 53 |
| III.2.1. Generalidades..... | 53 |
| III.2.2. Calificación instrumental..... | 54 |
| III.2.3. Etapas de una calificación..... | 54 |
| III.2.4. Cumplimiento etapas..... | 56 |

| | |
|---|-----|
| III.2.5. Sustancias de referencia..... | 57 |
| III.2.6. Reactivos y disolventes..... | 58 |
| III.2.7. Equipo e instrumentos..... | 58 |
| III.2.8. Materiales..... | 59 |
| III.2.9. Matriz biológica..... | 60 |
| III.2.10. Preparación de soluciones y curvas de calibración..... | 60 |
| III.2.11. Preparación de las muestras para selectividad del método..... | 62 |
| III.2.12. Preparación de la muestra para adecuabilidad del sistema..... | 64 |
| III.1.13. Preparación de las muestras a concentración baja, media y alta en solución..... | 64 |
| III.2.14. Preparación de la curva de calibración para el método..... | 65 |
| III.2.15. Preparación de las muestras a concentración baja, media y alta para el método | 65 |
| III.2.16. Blanco de plasma..... | 66 |
| III.2.17. Tratamiento de las muestras..... | 66 |
| III.2.18. Condiciones cromatográfico..... | 68 |
| III.2.19. Modelo matemático..... | 68 |
| III.2.20. Cronograma de actividades..... | 76 |
| III.2.21. Cronograma de análisis de voluntarios..... | 77 |
| Capítulo IV. Resultados..... | 79 |
| IV.1. Primera etapa..... | 79 |
| IV.2. Segunda etapa..... | 83 |
| IV.2.1. Tabla de adecuabilidad del sistema..... | 83 |
| IV.2.2. Linealidad del método..... | 84 |
| IV.2.3. Selectividad..... | 86 |
| IV.2.4. Repetibilidad y Recobro..... | 87 |
| IV.2.5. Estabilidad a 24 horas..... | 91 |
| IV.2.6. Tolerancia a cambio de temperatura..... | 95 |
| IV.2.7. Tolerancia a cambio en la solución Buffer..... | 98 |
| IV.2.8. Tolerancia a cambio de longitud de onda de excitación y emisión..... | 102 |
| IV.3. Análisis de voluntarios..... | 107 |
| IV.3.1. Adecuabilidad del sistema..... | 107 |
| IV.3.2. Linealidad del método..... | 108 |
| IV.3.3. Muestras control en plasma..... | 110 |
| IV.3.4. Resultados y cromatograma de voluntarios..... | 111 |
| Capitulo V. Conclusiones..... | 126 |
| Referencias..... | 130 |
| Anexos..... | 137 |

Lista de símbolos, abreviaturas y definiciones

1. $(AUC_{0 \rightarrow t})$. Área bajo la curva del tiempo cero al tiempo t, calculada por la regla trapezoidal, siendo t el último punto de muestreo
2. $(AUC_{0 \rightarrow \infty})$. Área bajo la curva del tiempo cero al infinito
3. (C_{max}) . Concentración máxima
4. $C_{max} (t_{max})$. Tiempo en que se alcanza la Concentración máxima
5. (K_e) . Constante de eliminación
6. $(t_{1/2})$. Vida media
7. **(TMR)**. Tiempo medio de residencia
8. **Adecuabilidad del sistema (verificación del sistema)**. A la verificación de que el sistema analítico opera con base a criterios preestablecidos por el proveedor, que permitan asegurar un desempeño óptimo y la confiabilidad de los resultados de un método analítico.
9. **Calibración**. Conjunto de operaciones que determinan bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondiente a un patrón de referencia.
10. **Corrida analítica**: Al conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.
11. **Cromatograma**: A la gráfica de la respuesta analítica derivada de la aplicación de la técnica y el método analítico correspondientes.
12. **Curva de Calibración**: Al conjunto de concentraciones que describen el intervalo de trabajo en el cual se cuantifica el compuesto a analizar.

- 13. Documentación.** Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.
- 14. Especificaciones.** Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.
- 15. Especificidad.** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.
- 16. Exactitud.** Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- 17. Estabilidad analítica de la muestra.** Propiedad de una muestra de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.
- 18. Intervalo de trabajo.** Al intervalo de trabajo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior de un compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
- 19. Límite de cuantificación.** A la cantidad mínima de analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.
- 20. Límite de detección.** Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada distinguido del ruido instrumental, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
- 21. Linealidad.** Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo para obtener una respuesta lineal respecto a la concentración del compuesto en la muestra.

- 22. Método analítico.** Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.
- 23. Muestra.** Porción del material a evaluar.
- 24. Placebo.** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.
- 25. Placebo adicionado.** Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida de analito.
- 26. Parámetro de desempeño.** Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.
- 27. Precisión.** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como Repetibilidad y reproducibilidad.
- 28. Precisión intermedia.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.
- 29. Protocolo de validación.** Al documento donde se definen y describen las pruebas, criterios y procedimientos para realizar y demostrar que un método analítico cumple con lo requerido.
- 30. Repetibilidad.** A la precisión de un método analítico bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.
- 31. Reproducibilidad intralaboratorio.** a la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

- 32. Robustez.** Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.
- 33. Selectividad.** Es la habilidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra. A menudo puede expresarse como la desviación de los resultados obtenidos mediante el análisis de las muestras que contienen impurezas agregadas, productos de degradación, metabolitos o fármacos que pueden ser administrados concomitantemente, con respecto a los resultados de las muestras sin sustancias agregadas. La desviación puede expresarse como la diferencia entre los resultados de la valoración de los dos grupos de muestras.
- 34. Tolerancia.** Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos, columnas. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos al método.
- 35. Trazabilidad.** A la propiedad del resultado de una medición o del valor de un estándar, por la cual ésta puede relacionarse por un material de referencia reconocido a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones, teniendo todas las incertidumbres determinadas. Sus requisitos deben especificarse para un cierto periodo o desde un cierto momento de la partida.

36. Validación del método analítico. Proceso por el cual se demuestra, por estudios de estadística, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Lista de tablas y figuras

| | |
|--|------------|
| Figura 1. Esquema de los efectos de la hiperglucemia..... | 22 |
| Figura 2. Algoritmo del dolor neuropatico..... | 23 |
| Formato 1. Cuestionario para el diagnóstico del dolor neuropatico (DN4)..... | 24 |
| Tabla 1. Signos y síntomas sensoriales de neuropatía diabética..... | 25 |
| Formato 2. Formato de los 8 puntos..... | 28 |
| Figura 3. Estructura química de la capsaicina..... | 29 |
| Tabla 2. Estudios realizados con capsaicina..... | 35 |
| Figura 4. Cronograma de seguimiento clinico..... | 42 |
| Grafica 1. Intervalos de muestreos..... | 44 |
| Tabla 3. Parametros a evaluar en un sistema cromatográfico..... | 56 |
| Tabla 4. Preparacion de la adecuabilidad del sistema..... | 64 |
| Tabla 5. Preparacion de las muestras en solución..... | 64 |
| Tabla 6. Preparacion de la curva de calibración (Dilución)..... | 65 |
| Tabla 7. Preparacion de las muestras control en plasma..... | 65 |
| Diagrama 1. Flujograma..... | 66 |
| Diagrama 2. Metodo para determinar concentraciones de capsaicina en plasma.... | 67 |
| Figura 5. Cronograma de actividades..... | 76 |
| Tabla 8. Cronograma de análisis en voluntarios..... | 77 |
| Tabla 9. Manifestaciones clínicas..... | 80 |
| Tabla 10. Signos vitales promedio de los voluntarios..... | 82 |
| Tabla 11. Adecuabilidad del sistema..... | 83 |
| Tabla 12. Linealidad del método..... | 84 |
| Figura 6. Lineamiento del metodo..... | 85 |
| Tabla 13. Prueba de selectividad..... | 86 |
| Tabla 14. Exactitud y repetibilidad de muestras concentración baja..... | 88 |
| Tabla 15. Exactitud y repetibilidad de muestras concentración media..... | 89 |
| Tabla 16. Exactitud y repetibilidad de muestras concentración alta..... | 90 |
| Tabla 17. Estabilidad de muestras concentración baja..... | 92 |
| Tabla 18. Estabilidad de muestras concentración media..... | 93 |
| Tabla 19. Estabilidad de muestras concentración alta..... | 94 |
| Tabla 20. Tolerancia de muestras concentración baja..... | 95 |
| Tabla 21. Tolerancia de muestras concentración media..... | 96 |
| Tabla 22. Tolerancia de muestras concentración alta..... | 97 |
| Tabla 23. Tolerancia de muestras concentración baja, solución buffer..... | 99 |
| Tabla 24. Tolerancia de muestras concentración media, solución buffer..... | 100 |
| Tabla 25. Tolerancia de muestras concentración alta, solución buffer..... | 101 |
| Tabla 26. Tolerancia de muestras concentración baja, cambio de longitud de onda | 103 |
| Tabla 27. Tolerancia de muestras concentracion media, cambio de longitud de onda..... | 104 |

| | |
|---|------------|
| Tabla 28. Tolerancia de muestras concentración alta, cambio de longitud de onda. | 105 |
| Tabla 29. Resumen de resultados de validación..... | 106 |
| Tabla 30. Adecuabilidad del sistema..... | 107 |
| Figura 7. Grafica de linealidad del método..... | 109 |
| Tabla 31. Linealidad del método..... | 109 |
| Tabla 32. Resultados estadísticos muestra concentración baja..... | 110 |
| Tabla 33. Resultados estadísticos muestra concentración media..... | 110 |
| Tabla 34. Resultados estadísticos muestra concentración alta..... | 111 |
| Tabla 35 a 48. Resultado de voluntarios..... | 112 |

Resumen

La neuropatía diabética (ND) es el factor primario y principal en el desarrollo de las úlceras plantares. El 15 % de los diabéticos padecen de úlceras plantares y hasta el 60% de los diabéticos padecen de neuropatía diabética (Academy of Neurology, Diabetes Care 1988). La diabetes se puede presentar con síntomas de neuropatía, estos datos son más que elocuentes en la importancia que tiene el estudio de esta alteración. La gran mayoría de los pacientes con esta fisiopatología presenta una forma simétrica distal la cual progresa a un patrón de daño fibra-longitudinal con manifestaciones sensoriales y autonómicas predominantes.

La base patogenética es una axonopatía distal. El poder dominar y conocer esta enfermedad es sumamente importante para poder valorar la alta frecuencia en nuestro medio y con ello estar en condiciones de establecer parámetros de educación y tratamiento con el objetivo de disminuir la alta frecuencia. Se ha encontrado que en algunas patologías el uso de capsaicina oral al 0.25% es efectiva para disminuir el dolor como en el Síndrome Oral Quemante.

La capsaicina es miembro de la familia de vaniloides, se une selectivamente a receptores vanílicos subtipo 1 (VR1) (Szcolcsanti, 2004), estos receptores pertenecen a la familia de receptores potenciales vaniloides 1 (TPR1), los cuales son del tipo canal-iónico y están localizados en las membranas de neuronas sensoriales para dolor y calor; así mismo, la capsaicina libera el disparo de neuropéptidos P de las fibras nerviosas sensoriales tipo C. Los receptores para capsaicina juegan un papel importante en la transmisión del dolor térmico e inflamación.

En este trabajo se está investigando el posible uso de nanopartículas de capsaicina por su mecanismo único de acción, ya que es de gran importancia encontrar formas alternas para disminuir el dolor de las úlceras plantares provocadas por la neuropatía diabética.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La capsaicina es un compuesto que se encuentra en chiles y es el responsable de la sensación de ardor; generalmente se ha utilizado en forma de especie y condimento en la cocina nacional como internacional. Es utilizada en la medicina alternativa desde la época prehispánica (Buen rostro M. 2001), relacionándola con propiedades analgésicas, más comúnmente con el dolor. Se ha utilizado mezclada con azúcar para evitar la sensación de calor oral en pacientes que están recibiendo quimioterapia. (Pamplona RJ: ,2004).

La capsaicina se une a nociceptores en la piel originando una excitación inicial de las neuronas y un periodo de excitación aumentada; esto es usualmente percibido como prurito, quemazón, irritación y se acompaña de vasodilatación, asumiendo que es originado por estimulación selectiva de fibras aferentes C y liberación de sustancia P la cual puede ser neurotóxica ya que la administración sistémica en animales destruye fibras aferentes C. (Welk et al, 1984).

La capsaicina se aisló parcialmente por primera vez en 1816 por Bucholtz en forma de cristales (Szolcsanti: 2004) y en 1846 se aisló en forma cristalina pura por Tresh, quien la llamó capsaicina (Szolcsanti: 2004). La estructura fue elucidada en 1919 por Nelson y Dawson, así mismo la primera síntesis completa de la capsaicina fue desarrollada en 1930 por Späth y Darling (Szolcsanti: 2004).

Se sabe que la capsaicina se absorbe efectivamente a través de piel, se ha demostrado que alcanza rápidamente concentraciones plasmáticas cuando se aplica tópicamente y su tiempo de vida media es de aproximadamente 24h (Pershing et al, 2004). En un estudio extensivo de la distribución en tejidos de capsaicina administrada oralmente, cerca del 94% fue absorbida y una concentración máxima en sangre se alcanzó 1 hora después de su administración. Se encontró una distribución máxima del 24.4% de la capsaicina administrada en sangre, hígado, riñón e intestino dentro de 1 hora y posteriormente disminuyó notablemente hasta que no se detectó después de 4 días (Suresh et al, 2010).

Estudios realizados en ratas y conejos, indicaron una sustancial y rápida absorción de capsaicina en el sistema gastrointestinal al administrarse por vía oral, esto fue evidenciado por C_{max} en plasma el cual se logró en 40 minutos (T_{max}) y el tiempo de vida media aparente ($t_{1/2}$) fue de 2.4 horas (Bernard et al, 2010). La mayoría de los tejidos obtuvieron C_{max} dentro de las 2 horas de haber sido administrada de la dosis; el tejido que mostró el nivel de concentración más alto fue el riñón. La concentración de capsaicina se equilibró con la del plasma, eliminándose a las 24 horas. Los estudios farmacocinéticos realizados no mostraron resultado signos de toxicidad ni efectos teratógenos en las especies estudiadas. (Bernard et al, 2008, Kodama et al, 2008).

En años recientes han emergido tratamientos farmacológicos para la neuropatía diabética así como también se ha visto que es esencial el control estricto de glucemias, de HbA1c, presión arterial y lípidos, además de incidir en el cambio en el estilo de vida del paciente (ADA, 1988, PK, Review, 2010).

Los antidepresivos como la amitriptilina, imipramina y duloxetina, son un conjunto de fármacos que inhiben la recaptura presináptica de la serotonina y de la norepinefrina como forma para aliviar el dolor en neuropatía diabética. Estos fármacos son prescritos para este fin en dosis de 25 a 150 mg y su uso ha sido confirmado en varios estudios (McQuay et al, 1996,,Sarto et al 2005). El único fármaco de este grupo autorizado por la Agencia de Alimentos y Fármacos (FDA). Es la duloxetina la cual tiene tres indicaciones para su prescripción, depresión mayor, ND dolorosa e incontinencia urinaria por estrés. Éste fármaco es el primero con una inhibición balanceada de la recaptura de serotonina y norepinefrina. La dosis es de 60 mg cada 12 horas por 12 semanas (McQuay et al, 1996,,Sarto et al 2005).

Los anticonvulsivos gabapentina, pregabalina y oxcarbamazepina han sido utilizados por muchos años para el manejo del dolor neuropático (McQuay et al 1995); estudios recientes han encontrado evidencia limitada de la eficacia de este grupo farmacológico en ND(Wiffen et al 2005). La oxcarbamazepina ha presentado una mejor respuesta para la reducción del dolor en ND. Se ha visto que gabapentina a dosis de 1800 a 3600 mg al día es efectivo pero el perfil de efectos colaterales es mayor que los anticonvulsivos tetracíclicos. La pregabalina la cual es un análogo de gabapentina presenta una mayor potencia y eficiencia y es otro agente aprobado por la FDA para el tratamiento de ND. La evidencia de su eficacia es basada en estudios piloto de pacientes diabéticos con neuropatía. (Sonnert et al 2006).

El tramadol es un agonista opioide, ha demostrado eficacia para el dolor en ND como se plasma en un estudio de Harati Y., et al. (Harati et al, 2000). Sin embargo el uso de opioides como el tramadol continua siendo controversial ya que no se han establecido de manera clara los riesgos y el beneficio con su uso en ND.

Se han utilizado agentes antiarrítmicos clase 1B y un análogo estructural de lignocaina, sus eficacias han sido evaluados en estudios en pacientes con ND. Este grupo por sus características farmacológicas y mecanismos de acción deben de ser monitorizados regularmente con electrocardiogramas. Fármacos como ketamina y dextrometorfano han demostrado eficacia predominantemente en reducir dolor postoperatorio y en el consumo de analgésicos (McCartney et al, 2004).

En la actualidad se están investigando otros tratamientos farmacológicos, tales como factores de crecimiento nervioso y otros (Winters et al, 1988) que posiblemente puedan utilizarse en los próximos años como tratamiento en la neuropatía diabética. Uno de las principales objetivo el cuerpo humano es mantener la homeostasia. Dentro de las funciones de las neuronas aferentes primarias es recibir y transmitir información del medio interno y externo. Se han realizaron investigaciones extensas proporcionando información sobre la histoquímica y patofisiología de la neurona aferentes. Trabajos analíticos han traído como resultado la creación de nuevas técnicas de experimentación, y también marcó el inicio de la investigación de la capsaicina la cual se comprobó que es una herramienta farmacológica importante en la neurociencia de la sensibilidad. (Holzer, 1991).

1.1.1. Objetivo general

Determinar concentraciones de capsaicina C_{\max} y C_{\min} en plasma humano mediante un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia así como parámetros farmacocinéticas como K_d , V_d , T_{\max} ., en sujetos sanos de género masculino y femenino, con la administración por vía oral.

1.2. Justificación

Se ha visto en la actualidad que el manejo analgésico para el dolor en la neuropatía diabética es complejo y no existe un tratamiento único, razón por la cual se deben instituir un manejo farmacológico adecuado con diversos principios activos para lograr una analgesia eficiente para el dolor en la neuropatía diabética. Tomando en cuenta los factores anteriores, la investigación de la capsaicina proporcionará información en el campo de la analgesia para el manejo de la neuropatía diabética.

CAPITULO II

TEORÍA GENERAL

II.2. La neuropatía diabética.

La neuropatía diabética (ND) se refiere a los signos y síntomas de neuropatía en pacientes con diabetes en quien se han excluido otras causas de neuropatía. La neuropatía simétrica distal es la forma más común de ND y constituye el 75% (Academy of Neurology. Diabetes Care 1988). Las causas de su origen se fundamentan en el proceso de glucación no enzimático de glucosa, α -oxoaldehídos, y otros derivados sacáridos con proteínas, nucleótidos y lípidos (Clinical Policy Bulletin: Diabetic neuropathy: Medical data, 2012). Un proceso temprano de glucación como en fructosaminas y una avanzada dan productos terminales de glucación avanzada (AGEs: por sus siglas en inglés).

El término “glucación” es utilizado para los procesos de glucación que involucra oxidación. Los nervios peroneal, safeno de pacientes diabéticos contienen AGEs en el perineurio, células endoteliales y pericitios de microvesículas endoneurales así como también en fibras mielinizadas y no mielinizadas localizadas en agregados irregulares del citoplasma y colágeno intersticial de membranas basales. Éste proceso puede disminuir el ensamblaje de citoesqueletos, induce agregación proteica y provee ligando para receptores superficiales celulares. En neuronas periféricas se han expresado receptores para glucación avanzada y AGEs. (Neurobiol, 2002). Es probable que altas concentraciones intracelulares de glucosa sean un gatillo importante para aumentar la glucación, con llevando a un incremento en la formación de metilglioxal, glioxal y 3-deoxiglucosona los cuales son básicos para la formación de AGEs intra y extracelularmente.

El estrés oxidativo incrementa este proceso. Se requiere de mayor investigación en los procesos de glicación para entender el papel de este proceso en la neuropatía diabética.

En la **Figura1**. Se presenta un esquema de los efectos de la hiperglucemia sobre vías bioquímicas en la neuropatía diabética.

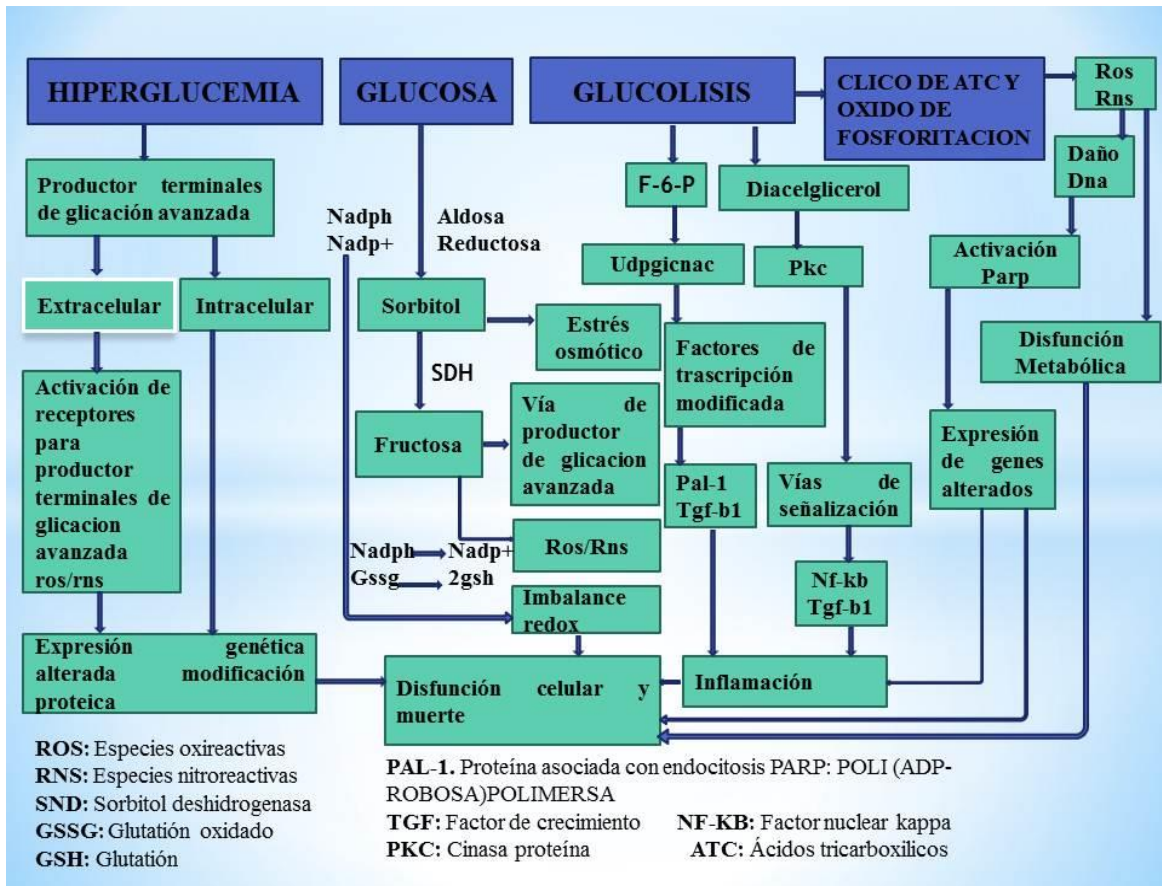


Figura 1. Efecto de la hiperglucemia sobre vías bioquímicas en neuropatía diabética. Exceso del metabolismo de glucosa genera exceso de NADH y lleva a una sobrecarga en la cadena de transporte de electrones originando estrés oxidativo, y activando la PARP (Poli ADP-ribosa) polimerasa. Ésta activación llevada a cabo por ROS (especies oxireactivas) actúa en conjunto con hexosamina y la vía de proteína cinasa C (PKC) para inducir inflamación y disfunción neuronal. La combinación de estrés oxidativo y la hiperglucemia activan la vía de los AGEs (productos finales de glicación avanzada), polioli, hexosamina y la vía de proteína cinasa C lo cual lleva a un inbalance redox, expresión alterada de genes y mayor estrés oxidativo.

NF-kB: factor nuclear kappa B ; PARP: poli(ADP-ribosa) polimerasa ;PKC: proteína cinasa C; AGEs : productos terminales de glicación avanzada ; RNS :especies nitroreactivas ; ROS: especies oxígeno reactivas ;GSH : glutación ; GSSG : glutación oxidado ;UDPGlcNAc : UDP-N-Acetilglucosamina ; VEGF : factor de crecimiento vascular endotelial.

Las neuropatías asimétricas pueden involucrar los nervios craneales, torácicos o los nervios de la extremidad; y son de aparición aguda resultantes de infarto isquémico de vasa nerviosa. Para el diagnóstico clínico de ND, se recomienda presentar 2 de las 5 siguientes condiciones: (i) signos, (ii) los síntomas, prueba sensorial cuantitativa (iii), estudio de conducción nerviosa (iv) y (v) pruebas autonómicas. El manejo de estos pacientes se fundamenta en un control de la hiperglucemia, y otros factores de riesgo cardiovascular, el ácido alfa-lipoico y la L-carnitina.

En la **Figura 2.** Se presenta un algoritmo mostrando los pasos para la valoración e investigación de una posible neuropatía. (Winter et al, 1995).

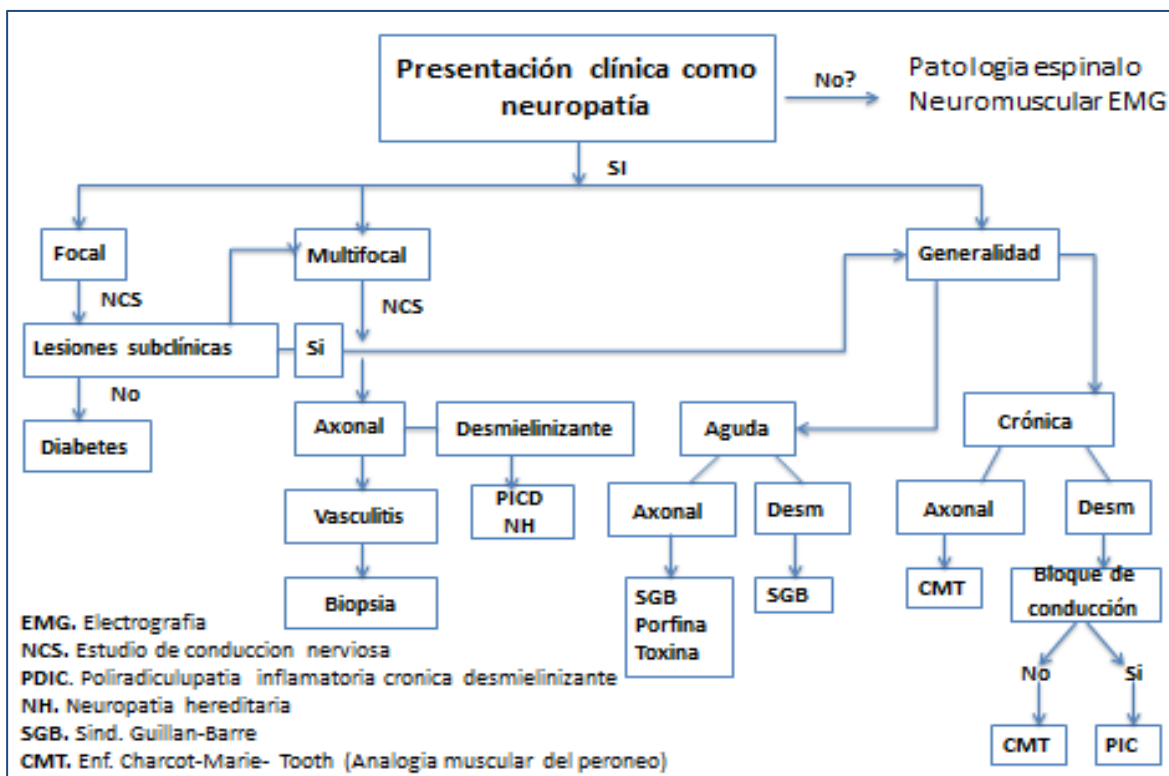


Figura 2. Algoritmo del dolor neuropático

En el diagnóstico del dolor en ND lo más importante es distinguirlo del dolor nociceptivo y para esto es crucial analizar la calidad de la anomalía somato sensorial. Los pacientes con dolor por ND casi siempre presentan áreas de sensaciones anormales e hipersensibilidad, en el área afectada, las cuales pueden ser adyacentes a o combinados con áreas dérmicas con déficit sensorial.

En la Tabla 1 se aprecia la gama tan amplia de manifestaciones asociadas a ND. El examen debe incluir la evaluación de la potencia muscular, sensaciones de presencia, posición conjunta, tacto y temperatura. Prueba de vibración debe realizarse por el diapason de 128 Hz. Se recomienda para toque, mono filamento de sensación de 1g. El examen sensorial debe realizarse bilateralmente en manos y pies, existe un cuestionario para el diagnóstico del dolor neuropático (**Formato 1**) el cual fue publicado en la revista de la Asociación Internacional para el estudio del dolor.

Formato 1. Cuestionario para el diagnostico del dolor neuropatico (DN4).

| | |
|--|---|
| A. Pregunta No 1. | Incluye aspectos de la descripción del dolor |
| ¿Su dolor tiene una o más de las siguientes características? | 1.- Quemante__ 2.- Compresivo__ 3.- Frio doloroso__ 4.- Descarga electrica__ 5.- Lancinante__ |
| B. Pregunta No 2. | Esta relacionada con la asociacion de parestesia/disestesia dentro de la zona dolorosa |
| ¿El dolor se asocia con uno o más de los siguientes síntomas en la misma área? | 1.- Alfileres y agujas__ 2.- Hormiguero__ 3.- Entumecimiento__ 4.- Picazón__ |
| C. Pregunta No 3. | Incluye informacion relacionada con deficit sensorial |

| | |
|---|---|
| ¿Es el dolor localizado en una zona donde el examen físico puede revelar una o más de las siguientes características? | 1.- Hipostesia al tocar__ 2.- Hipostesia al pinchar__ 3.-Hipostesia al calor__ 4.- Hipostesia al frio__ |
| D. Pregunta No 4. | Incluye informacion relacionada con dolores evocados |
| ¿En la zona dolorosa puede el dolor ser causado aumentado por cualquiera de las siguientes? | 1.- Cepillado__ 2.- Presion__ 3.- Contacto con frio__ 4.- Contacto con el calor__ |

Adaptada de la Revista International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. doi:10.1016/j.pain.2004.12.010

En la vejez (> 70 años) vibración y reflejo de tobillo pueden estar reducidos normalmente y se considera anormal si estos están ausentes en lugar de reducidos, pueden utilizarse pruebas sensoriales como, las pruebas de función autonómica comúnmente utilizadas en Diabetes Mellitus se basan en la presión arterial y pulso en respuesta a una serie de maniobras.

Se utilizan pruebas específicas para evaluar la función gastrointestinal, genitourinaria, función sudomotor y flujo de la sangre periférica de la piel. Biopsia de nervio puede ser útil para excluir otras causas de neuropatía. En la tabla 1 se presentan signos y síntomas sensoriales de neuropatía diabética.

Tabla 1. Signos y síntomas sensoriales de neuropatía diabética.

| Sensaciones espontaneas o dolor | | | |
|--|--|---|--|
| Parestesia | Sensación continua no dolorosa (piel arrastre) | Intensidad de grado (0-10); área en cm ² | .. |
| Dolor paroxismal | Tiros ataques eléctricos para segundos | Número por tiempo; intensidad de grado (0-10); umbral para la evocación | .. |
| Dolor superficial | Sensación dolorosa del curso, a menudo una sensación de ardor | Intensidad de grado (0-10); área en cm ² | .. |
| Dolor evocado | | | |
| Alodinia mecánica de dinámica | Dolor de luz normalmente no dolorosa estímulos en movimiento en piel | Piel de trazo con el pincel del pintor. Hisopo de algodón o gasa | Agudo dolor superficial ardiente; presente en la principal zona afectada pero se extiende más allá |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | en las áreas de la piel afectada (zona secundaria) |
| Hiperalgia estática mecánica | Dolor de estímulos normalmente no dolorosos presión estática suave sobre la piel | Aplicar manual suave presión mecánica a la piel | Dolor sordo; presente en la zona de afectados las terminaciones nerviosas aferentes primarios (dañados o sensibilizada) (zona principal) |
| Hiperalgia mecánica de punteado, pinchazo de alfiler | Dolor punzante normalmente pero estímulos no dolorosos | Pinchar la piel con un perno de seguridad, palillo afilado o pelo tieso de von frey | Dolor agudo superficial; presente en la principal zona afectada pero se extiende más allá en la áreas de la piel afectada (zona secundaria) |
| Suma temporal | Aumentando la sensación de dolor (wind-up-como dolor)de aplicación repetitiva de estímulos nocivos solos idénticos | Pinchar la piel con perno de seguridad a intervalos de <3 s para 30 s | Agudo dolor superficial de intensidad creciente |
| Hiperalgia fría | Dolor de estímulos no dolorosos de fríos | Póngase en contacto con la piel con objetos de 20°C (rodillo de metal, de vidrio con agua refrigerantes como acetona);control: contacto con la piel con objetos de la temperatura de la piel | Dolorosa, a menudo ardor, sensación de la temperatura; presente en la zona de afectados las terminaciones nerviosas aferentes primarios (dañados o sensibilidad)(zona principal) |
| Hiperalgia de calor | Dolor de estímulos normalmente no dolorosos de calor | Póngase en contacto con la piel con objetos de 40 °C (rodillo de metal, de vidrio con agua);control: contacto con la piel | Sensación dolorosa de temperatura ardiente; presente en la zona de afectados las terminaciones nerviosas |
| Hiperalgia somática profundo mecánica | Dolor de presión normalmente no dolorosa en tejidos profundos somáticos | Aplique presión ligera manual en las articulaciones o músculos | Profundo dolor en las articulaciones o músculos |

II.2. 1. Bases diagnósticas.

La biopsia de piel se ha utilizado cuando todas las demás medidas son negativas en el diagnóstico de neuropatía de fibra pequeña y para la cuantificación del producto de gen de la proteína 9.5, que es un marcador (Kennedy et al, 1996). La diabetes como causa de la neuropatía se diagnostica por exclusión de otras etiologías en pacientes que presentan pies dolorosos y tienen alteraciones de la prueba de tolerancia a la glucosa.(Miller et al,1982).

Recientemente se ha reportado microscopía focal de córnea en la evaluación de la polineuropatía diabética. En microscopía focal, la córnea se analiza y se examinan las imágenes de la capa de Bowman, que contiene un plexo de nervio ricos para la densidad de fibra de nervio, longitud y densidad de rama. Estos parámetros son significativamente reducidos en ND y correlacionados con la severidad de la neuropatía. Debido a su naturaleza no invasiva, la microscopía focal puede tener gran potencial en la evaluación de la estructura nerviosa in vivo sin necesidad de realizar biopsia. Se ha visto que existe una disminución en la expresión de los receptores TRPV1 en nervios con neuropatía, comparado con nervios que no presentan esta alteración. La disminución era diferente si se trataba de una neuropatía axonal distal a una neuropatía desmielizante. En todos los casos histológicamente mostraba disminución de fibras nerviosas y/o atrofia axonal. (Oyagbemii et al, 2010). Se ha demostrado la existencia de receptores TRPV3 en queratinocitos. (Peier et al, 2002). La epidermis del diabético se sabe que anormalmente es delgada, se plantea que la disminución de los TPRV3 en queratinocitos puede estar relacionada con cambios de neurotrofinas u otros factores que regulan la diferenciación dérmica y la expresión de los TPRV3. Se ha sugerido que las propiedades funcionales de los receptores vaniloides en los queratinocitos involucre mecanismo novedosos de transducción entre las terminaciones nerviosas de queratinocitos basales y subepidérmico/dérmicos (Peter et al, 2002) o exocitosis de cuerpos laminares epidérmicos los cuales son regulados por el flujo de calcio. (Denda et al, 2003). La Academia Americana de Neurología recomienda que la ND se diagnostique en presencia de neuropatía autonómica o somática, cuando han sido otras causas de neuropatía excluidas. (Freeman et al, 2008) aproximadamente el 10% de los pacientes diabéticos pueden tener otras causas de neuropatía, se sugiere utilizar el cuestionario elaborado, lo ideal es obtener 8 puntos en dicho instrumento (**Formato 2**).

Formato 2. Formato de los 8 puntos. Elaborado por la Academia Americana de Neurología.

| Apariencia de pies Derecho ___ Normal ___ | | Si (0) | No(1) |
|--|------------------|--|---------------------------|
| Si la respuesta es NO seleccione lo que se aplique | | 1.- Deformado___ 2.- Piel seca___ 3.- Infección ___ 4.- Ulceración (1) | |
| Reflejos tobillos | | Presente Ausente | Presente/reforzado |
| Derecho | | (0) | (0.5) |
| | Izquierdo | _____ | _____ |
| | | _____ | _____ |
| Vibración percepción de 1er. Ortejo | | | |
| | Derecho | _____ | _____ |
| | Izquierdo | _____ | _____ |
| | | Total _____ | |

La ND no puede diagnosticarse sin un examen cuidadoso, porque puede ser asintomática en un número de pacientes. Al menos uno de los cinco criterios es necesario: síntomas, signos, pruebas electrodiagnósticas, sensoriales cuantitativas y autonómicas pueden ser necesarias en protocolos de investigación. (Care, 1988). Sin embargo en la práctica clínica dos de cinco criterios han sido recomendados. (Welk et al, 1984).

Los errores diagnóstico de ND en la práctica clínica se han destacado en el estudio objetivo de A1C donde 7000 pacientes fueron evaluados y se detectaron sólo 38% con leve y 61% con neuropatía severa. Este estudio destacó la importancia de la educación del médico en el diagnóstico de ND. (Herman et al, 2003).

II.3. Farmacología de la capsaicina.

II.3.1. Propiedades fisicoquímicas de la capsaicina.

Químicamente; trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida (Figura No.3), se encuentra en fruta y plantas del genero Capsicum. Es una planta nativa en América y ha sido cultivada desde 7500 años antes de Cristo. Es una sustancia inodora con un punto de fusión de 65°C y un punto de ebullición entre 210-220°C. Está compuesta por un grupo de amidas ácidas, (**Figura 3**) formadas a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono. Su peso molecular es de 305.40 g/mol, (García et al, 2002).

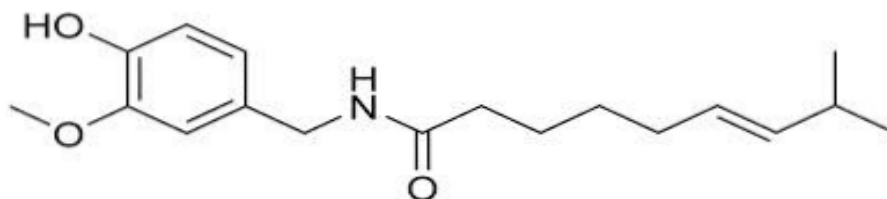


Figura 3. Estructura química de la capsaicina. La estructura de la capsaicina está constituida por un anillo aromático, un grupo amida y una cadena alifática.

La absorción máxima en ultravioleta está en el intervalo de 227-281 nm en el espectro de UV-Visible presentando una coloración rojo-naranja en solución. Puede estar almacenada en forma estable durante años. (García et al, 2002). Cristaliza en forma de placas rectangulares: escamas en éter de petróleo. Es insoluble en agua, fácilmente soluble en álcalis, éter, benceno, cloroformo (Gómez et al, 1995), alcohol etílico, alcohol metílico, acetona y tetracloruro de carbono.

Al extraerla y someterla a un proceso de cristalización se pueden obtener cinco compuestos capsaicinoides, los cuales son: Capsaicina 69%, dihidrocapsaicina 22%, norhidrocapsaicina 7%, homocapsaicina 1% y homodihidrocapsaicina 1%, de estos los responsables del sabor picante son capsaicina y dihidrocapsaicina. (Chhabra et al, 2012).

II.3.2. Parámetros farmacocinéticos de la capsaicina

II.3.2.1 Absorción

Estudios realizados en ratas indicaron una sustancial y rápida absorción por sistema gastrointestinal, fue absorbida cerca del 94% del compuesto, después de su administración por vía oral, y la concentración plasmática máxima se alcanzó 40 minutos (T_{max}) después de su administración. El tiempo de vida media aparente ($t_{1/2}$) fue de 2.4 horas en forma oral. (Bernard et al, 2010) y la concentración de capsaicina se equilibró con la del plasma, eliminándose a las 24 hora (Bernard et al, 2010). Se ha reportado vida media de 24 horas al administrarse tópicamente (Pershing et al, 2004). Se sabe que se absorbe efectivamente a través de piel así mismo se ha demostrado que alcanza rápidamente concentraciones plasmáticas cuando se aplica por vía tópica. (The capsaicin study group. Arch. Intr. Med, 1991).

II.3.2.2. Distribución

En un estudio extensivo de la distribución de capsaicina en tejidos, indicó que la mayoría de los tejidos obtuvieron C_{max} después de 2 horas de ser administrada la dosis de capsaicina, el tejido que mostró el nivel de concentración más alto fue riñón.

La concentración obtenida en el tejido renal se equilibra con la del plasma eliminándose a las 24 h.

II.3.2.3. Metabolismo

La capsaicina es metabolizada a nivel hepático por medio de sistema CYP450 y carboesterasas los cuales dan productos tales como O-dimetilados, hidroxilados y N-dehidrogenados. (Suhr et al, 1995). Se había sugerido que generaba productos intermediarios tóxicos durante su metabolismo; estos reactivos son epóxidos, quinonas y radicales fenoxi, los cuales han sido reportados que actúan como inhibidores del CYP2E1. (Guía farmacoterapéutica, 2011).

Farmacológicamente ha sido documentada que modula la actividad microsomal del CYP450-dependiente de la monooxidasa. El metabolismo microsomal de capsaicina es aparentemente similar en humanos, ratas y perros (Suresh et al, 2010), éste se lleva a cabo mediante el complejo enzimático P450.

II.3.3.4. Excreción

La capsaicina es principalmente eliminada por riñón con una pequeña proporción sin cambios excretada por heces y orina. (Suresh et al, 2010).

II.3.3. Farmacodinámica propiedades farmacológicas y mecanismo de acción.

Se han diferenciado dos formas de acción: a) Selectividad para neuronas aferentes delgadas en especies de mamíferos y se expresa inicialmente en una estimulación corta que puede ser seguida de una desensibilización a capsaicina y otros estímulos neuronales sensoriales. Ambos efectos se producen por activación de canales catiónicos en la membrana de células neuronales sensoriales en mamíferos. (Holzer P.Capsaicin.Cellular target, 1991) y b) acción no selectiva que se percibe como una depresión pasajera de la excitación con ninguna consecuencia tardía para la célula.

Se ha encontrado que las acciones de capsaicina sobre los nervios sensitivos aferentes son dosis dependiente. (Holzer P.Capsaicin.Cellular target, 1991, Szolcsanyi et al, 1981). Se ha observado cuatro etapas de acción de la capsaicina en nervios aferentes dependiendo de la dosis y tiempo de exposición al compuesto:

Etapa 1.Excitación

Etapa 2.Bloqueo efecto sensorial.

Etapa 3. Impedimento neurotóxico selectivo a largo plazo y

Etapa 4. Destrucción celular irreversible. (Szolcsanyi et al, 1984) Estas etapas de acción se pueden detectar en tracto gastrointestinal. (Moznik et al, 2001).

II.3.4. Reacciones Adversas

Sensación de quemazón cutáneo y además en los parches cutáneos dolor, eritema, pápulas, vesículas, edema, hinchazón, sequedad, en la zona de aplicación. En forma oral la literatura reporta pirosis, dispepsia.

II.3.5. Restricciones de uso durante el embarazo y lactancia.

No existe experiencia de su uso en forma oral. Se considera improbable que las pequeñas cantidades absorbidas transdérmicamente produzcan daños. La cantidad teórica que puede recibir el lactante por la leche materna no es significativa y teniendo en cuenta su atoxicidad puede considerarse improbable que la capsaicina puede causar efectos adversos durante el embarazo y lactancia.

En estudios realizados en ratas lactantes expuestas al parche cutáneo diario durante 3 horas se observaron niveles cuantificables de capsaicina en la leche materna. No es aconsejable en la lactancia el día que se administre el tratamiento con capsaicina (Kodama et al, 2010).

II.3.6. Precaución con efectos de carcinogénesis, mutagénesis y sobre la fertilidad.

Los estudios farmacocinéticos realizados, no mostraron signos de toxicidad ni mostraron efectos teratogénicos en especies animales (Bernard et al, 2008, Kodama et al, 2008).

II.3.7. Interacciones medicamentosas

No se han descrito interacciones clínicas con la administración tópica de este fármaco.

II.3.8. Precauciones generales.

No aplicar calor ni vendajes oclusivos sobre piel lesionada o con heridas, ojos o mucosas. No utilizar de forma prolongada ni en áreas extensas.

No se recomienda en niños. Para la capsaicina en crema, si la zona a aplicar son las manos esperar 30 minutos antes de lavarlas.

II.3.9. Toxicidad

Existen dos mecanismos que pueden llevar a la neurotoxicidad uno de ellos es la vía dependiente del flujo de Ca^{+} y la otra involucra la acumulación intracelular de $NaCl$. La excesiva acumulación de Ca^{+} intracelularmente es extremadamente tóxica y parece común que es un proceso final donde toxinas causan degeneración celular y muerte. Proteasas calcio-activas y otras enzimas degradadoras se piensa que destruyen la organización citoesquelética interfiriendo con el flujo axoplásmico.

Se puede deducir que los diferentes grados de acumulación de Ca^{+} y la rapidez con que este exceso pueda ser revertido determinan si se produce una desensibilización no específica o neurotoxicidad. La acumulación intracelular de NaCl involucra la disposición permanente de cationes y aniones monovalentes, bajo condiciones fisiológicas, aparentemente está dado por el flujo de Na^{+} a través de los canales catiónicos operados por la capsaicina. La entrada de Na^{+} es seguida pasivamente por el Cl^{-} . La entrada de Na^{+} y Cl^{-} – resultara en un aumento neto de NaCl el cual favorece el flujo de agua y lisis osmótica.

En estudios realizados sobre toxicidad de productos comerciales capsinoides administrados mediante sonda nasogástrica a ratones de ambos sexos a dosis de 500mg/Kg produjeron signos de toxicidad aguda observada a las 2 horas posteriores a la administración, pero no fue letal. Todas las manifestaciones se resolvieron después de 6 horas de postadministración. No se encontró ningún efecto a largo plazo ni anormalidades en la necropsia.

La LD_{50} encontrada en ratones de ambos sexos fue de $>5000\text{ mg/Kg}$ (Watanabe et al, 2008). En un estudio llevado a cabo en microsomas hepáticos de 50 humanos edades de 6 a 78 años con una relación de 34 mujeres y 16 hombres de diversas razas, capsaicina mostro que inhibe la actividad de los citocromos P450 3A4 probablemente debido a un mecanismo base–inhibidor de CYP3A4. En la tabla 2 se presenta estudios realizados con capsaicina tópica para el manejo de neuropatías. Encontrándose una disminución del dolor en pacientes con neuropatías diabéticas como de origen neurológico y pos radiación.

Tabla .2 Estudios realizados con capsaicina en neuropatía diabética

| Estudios realizados con capsaicina en neuropatía diabética | | |
|---|-------------------------|----------------------------|
| Patología | Dosis capsaicina | Referencia |
| Neurología diabética | % Capsaicina en crema | |
| | 0.75 | Chad et all (40) |
| | 0.75 | Capsaicin Study Group (41) |
| | 0.75 | Sheffler et al (42) |
| | 0.75 | Tandan et al (43) |
| | 0.75 | Tandan et al (44) |
| | 0.75 | Capsaicin Study Group (45) |

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Primera Etapa

ESTUDIO PILOTO PARA EVALUAR LOS ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DE CAPSAICINA TABLETA DE 7.5 mg EN SUJETOS DE INVESTIGACION SANOS, DE AMBOS GENEROS BAJO CONDICIONES DE AYUNO.

Sitio de realización de la Fase Clínica.

Centro de Ciencias de la Salud, Unidad Valle de las Palmas

Dirección de CISALUD:

Boulevard universitario # 1000, Valle San Pedro UABC, Unidad Valle de las Palmas, Tijuana, Baja California, México.

Sitio de Realización de la Fase Analítica:

Victory Enterprises, S. A. de C. V.

Dirección de realización de Fase Analítica:

Carretera Ensenada KM 12.5 SN
La gloria, CP 22677, Tijuana, B. C.
Tel. (664) 615 3200 ó 636 2471

Sitio de realización de Selección:

Hospital virtual de CISALUD
Boulevard universitario # 1000, Valle San Pedro UABC, Unidad Valle de las Palmas, Tijuana, Baja California, México.

Comités evaluadores:

Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología UABC

Investigador Principal:

M en C. Gilberto Quiñones Palacio

Colaboradores:

Dr. Jorge Arturo Alvelais Palacios
Lic. Juan Carlos Núñez Valdez
Mtra. Lizbeth Mariela Cerón Ramírez
Mtra. Verónica González Torres

Autores del protocolo.

M en C. Gilberto Quiñones Palacio
QFI. Francisco Gómez Hernández.

Clave del protocolo: PROINV001VICUABC

APROBACIONES

| | | |
|---|---|--|
| (Nombre y Firma) M en C. Gilberto Quiñones Palacio Investigador Principal | Dr. Jorge Arturo Alvelais Palacios Responsable estudio clínico | Lic. Juan Carlos Núñez Valdez Selección de voluntarios |
| QFB David Vargas Torres Responsable Estudio Analítico | QFB Guadalupe Romero Fernández Responsable Sanitario Victory Enterprises, S. A. de C. V. | QFB Braulio Navarro Rodríguez Formulador |
| Patrocinador o su representante. | | |

III.1.1 Información general

III.1.1.1. Investigador principal

M en C. Gilberto Quiñonez Palacio

Profesional: Escuela de Medicina, UABC Tijuana B.C.

Diplomado en Contaminación Ambiental, Escuela de Ingeniería industrial y Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC Tijuana B.C.

Maestría en Ciencias, Facultad de ciencias Químicas e Ingeniería, ABC Tijuana B.C.

Certificado por la International Education Research Foundation

Actualmente adscrito en el programa de Doctorado en Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma de Baja California en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería Este ensayo forma parte del proyecto de investigación para la obtención de Grado de Doctor del investigador principal.

Reconocimiento como Medico Investigador ISSSTECALI

Nombramiento de Profesor-Investigador UABC con Perfil PROMEP

PPREDEPA Nivel 8

Autor de: Fisiopatología Elemental, Un punto de vista práctico. Editorial Trillas México; Junio 2006 y Biofísica Fundamentos, Editorial Trillas México; Mayo 2012.

III.1.1.2. Sede del ensayo

El ensayo se llevará a cabo en el Hospital virtual del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California, estando programada para los días 19 de noviembre del 2014. Se realizará previa autorización a la solicitud presentada al Jefe del Centro de Ciencias de la Salud Dr. Miguel Ángel Cadena Alcantar.

III.1.1.3. Tipo de Investigación

Los ensayos clínicos se deben realizar en condiciones de respeto a los derechos fundamentales de la persona y a los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, siguiéndose a estos efectos los contenidos de la Declaración de Helsinki, la inicial realizada en Helsinki (1964) y sus sucesivas actualizaciones en Tokio (1975), Venecia (1983), Hong-Kong (1989), Somerset West (1996) y Edimburgo (2000).

Fase I: Constituye el primer paso en la investigación de una sustancia o medicamento nuevo en el hombre. Son estudios de farmacocinética y farmacodinamia que proporcionan información preliminar sobre el efecto y la seguridad del producto en sujetos sanos o en algunos casos en pacientes (sería el caso de los ensayos clínicos en pediatría), y orientarán la pauta de administración más apropiada para ensayos posteriores.

Se utiliza un diseño de dosis única, con 14 sujetos en condiciones de ayuno 1 periodo, 1 secuencia abierto, aleatorio comparativo y prospectivo se administrara en forma oral capsaicina. Definiéndose como voluntario sano un sujeto que, según la información disponible, no padece ninguna enfermedad significativa con relevancia para el estudio propuesto, cuyas proporciones corporales y de peso estén dentro de los límites normales y que tiene un estado mental que le permita comprender y otorgar el consentimiento válido para el estudio **Anexo 3**.

III.1.2. Selección de pacientes.

Reclutamiento por invitación a través de convocatoria abierta. Inclusión en el estudio de 14 sujetos hombres y mujeres de acuerdo a los criterios del protocolo. Se seleccionaran los voluntarios que cumplan con los siguientes criterios:

III.1.2.1. Criterios de inclusión:

- a) Sexo: varones y mujeres
- b) Edad: de 18 a 50 años
- c) Peso: 10% del peso ideal
- d) Índice de masa corporal (peso/talla²): 20-28
- e) Historia clínica: sin hallazgos anormales.
- f) Signos vitales normales:
 - Frecuencia cardiaca entre 50 y 100 latidos por minuto
 - Frecuencia respiratoria entre 12 y 20 por minuto
 - Presión sistólica menor a 139 mmHg
 - Presión diastólica menor a 89 mmHg
 - Temperatura entre 36.0 y 37.0°C
- g) Exploración física normal
- h) Capacidad para comprender la información sobre el ensayo
- i) Consentimiento informado por escrito

III.1.2.2. Criterios de exclusión:

- a) Antecedentes de enfermedad
- b) Antecedentes de alergias medicamentosas
- c) Antecedentes de reacciones adversas a fármacos similares
- d) Tratamiento farmacológico actual o reciente
- e) Fumadores
- f) Abuso de alcohol o drogas
- g) Participación en otro ensayo clínico en los 3 meses previos

- h) Donación de sangre en los 3 meses previos
- i) Dificultad para colaborar.
- j) Cualquier condición que pudiera suponer un aumento del riesgo o dificultar la interpretación de los resultados.

A los voluntarios seleccionados se les elaborará una Historia Clínica (**Anexo 5**); durante todo el estudio piloto se contará con el apoyo del Consultorio Médico a cargo del Dr. Jorge Arturo Alvelais Palacios el cual es médico de urgencias y es profesor de CISALUD; anotar sus observaciones en el (**Anexo 6** Formato de nota de evolución).

III.1.2.3. Criterios de eliminación.

- a) Retiro voluntario antes del inicio del tratamiento.
- b) Prueba (cualitativa) positiva de embarazo antes de la administración del medicamento de estudio.

III.1.3. Periodo del estudio.

Durante el ingreso se efectuará una valoración clínica que consiste en un interrogatorio por aparatos y sistemas con exploración física, con objeto de verificar que el sujeto sigue siendo candidato apto para el estudio. Se tomarán muestras de sangre y orina para los pruebas de embarazo en el caso de las mujeres y para la detección de Fármacos de abuso. Además se realizará una prueba de alcohol en aliento. Al término de la prueba se hace un interrogatorio, exploración física, toma de signos vitales y seguimiento de eventos adversos. Los sujetos deberán reportar al médico cualquier síntoma que presenten desde el ingreso y después de la dosificación, y en caso de manifestarlo se proporcionará la atención al sujeto y se harán las anotaciones en los documentos correspondientes.

Dentro de las horas previas a la administración de la dosis, a cada sujeto se le tomará (sentado) la presión arterial, el pulso, la frecuencia respiratoria y la temperatura. Estos valores deben estar dentro de la normalidad para que el sujeto continúe participando en el estudio. En caso de que alguno de los sujetos presente variaciones clínicamente significativas fuera de los rangos de normalidad en sus cifras de presión arterial y pulso en el periodo de confinamiento post-dosis, será vigilado estrechamente por el médico responsable y de persistir esta variación será evaluada su continuidad en el estudio por el investigador principal.

III.1.4 Administración farmacológica

Se administrará por vía oral, una tableta de capsaicina de 7.5 mg, con 250 ml de agua.

III.1.5. Plan operativo

III.1.5.1. Administración oral de capsaicina

- Asegurarse de que la cena sea antes de diez horas previas a la administración de la dosis.
- A las 7:00 horas aseo personal e ingesta de 250 ml agua.
- De 7:30 a 8:00 horas instalación del catéter (toma de muestra control ó “0”).
- A las 8:00 horas, administración oral del medicamento de prueba con 250 mL de agua a temperatura ambiente por vía oral.
- De las 8:15 a las 20:00 toma de muestras de acuerdo al cronograma de toma de muestras.

- A partir de las 11:00 horas se realizará un trazo DII largo de electrocardiograma a partir de las 3 horas post-dosis para verificar la función cardiaca, la prueba debe ser sin alteraciones de significancia clínica.
- A partir de las 12:00 horas, desayuno.
- A partir de las 16: horas, comida.

A partir de las 21:00 horas, alta de la unidad clínica y alta temporal con cita abierta

III.1.5.2. Seguimiento clínico

El seguimiento se realizará a todos los sujetos incluidos en el estudio de manera externa, a partir de la última administración del medicamento, con cita abierta o contacto telefónico a criterio del investigador durante un periodo de 5 días. Cada sujeto tendrá una participación de trece horas aproximadamente para el intervalo de prueba de acuerdo al siguiente cronograma:

Figura 4. Cronograma de seguimiento clínico

| Etapa preclínica | Etapa Clínica | | Etapa Post-Clínica |
|--|-----------------------|-----------------------------------|--|
| Actividad del día 21 septiembre al 22 octubre 2014 | Día 19 noviembre 2014 | Hora | Actividad |
| ✓ Elaboración de protocolo. | | Aproximadamente a las 07:00 horas | Internamiento. |
| ✓ Elaboración de carta compromiso no embarazo, resumen cronograma FCI y FRC. | | 7:00 horas | Toma de 250 mL de agua |
| | | 7:30 horas | Aplicación de catéter y muestra 0. |
| | | 8:00 horas | Toma del medicamento |
| | | 8:15 horas | Inicio de toma de muestras |
| ✓ Autorización de protocolo. | | 20:00 horas | Muestra de las 12 horas |
| ✓ Recepción de medicamento. | | Aproximadamente a las 21:00 horas | Alta del laboratorio-alta temporal, cita abierta. |
| | | | ✓ Seguimiento clínico de los sujetos. ✓ Cierre de FRC's ✓ Entrega de muestras al área analítica ✓ Elaboración del reporte de etapa clínica. ✓ Fase analítica ✓ Cierre de estudio ✓ Destrucción de muestras biológicas. |

III.1.5.3. Dieta

A los voluntarios seleccionados se les proporcionara un desayuno estándar consisten en 1 tazón de fruta, 2 huevos revuel, 2 rebanadas de tocino, 1 rebanada de pan tostado de trigo y vaso de 250 ml de leche o jugo de manzana.

El tiempo estimado de consumo es de 30 minutos, así como una comida consistente en un plato mediano de sopa de verduras, 2 nopales asados, una pieza de pollo sin grasa, una ensalada de lechuga con tomate, una rebanada de piña o sandía, un vaso con jugo de manzana.

III.1.5.4. Muestreo

A los voluntarios seleccionados previa asepsia y antisepsia utilizando un BD IV StartPak se les aplicara un Cateter Autoguardable c/ alas Autoguard BD Obturado No.16/18 el cual llevara una Línea Conecta Becton Dickinson en antebrazo basado en la NOM -022-SSA3-2012, Que instituye las condiciones para la administración de la terapia por infusión y el protocolo para el manejo estandarizado del paciente con catéter periférico, central y permanente.

Esto con el objetivo de tomar las diferentes muestras con el volumen requerido el cual es de 6 ml el cual se colocara en un tubo con heparina debidamente etiquetado con nombre, numero de muestra y hora. **Grafica 1.** Los intervalos de muestreo serán los siguientes:

Grafica 1. Intervalo de muestreo

INTERVALO DE TIEMPOS DE MUESTREO

| Fase | Muestras | Tiempo | Unidad |
|------|----------|--------|--------|
| | 0 | 0.00 | H |
| | 1 | 0.25 | H |
| | 2 | 0.50 | H |
| | 3 | 0.75 | H |
| | 4 | 1.00 | H |
| | 5 | 1.25 | H |
| | 6 | 1.50 | H |
| | 7 | 2.00 | H |
| | 8 | 2.50 | H |
| | 9 | 3.00 | H |
| | 10 | 4.00 | H |
| | 11 | 5.00 | H |
| | 12 | 6.00 | H |
| | 13 | 8.00 | H |

NÚMERO TOTAL DE MUESTRAS

| No. Casos | Muestras | Periodos | Total |
|-----------|----------|----------|-------|
| 14 | 13 | 1 | 182 |

CRONOGRAMA DE TOMA DE MUESTRAS SANGUINEAS.

| | |
|-------------------|----------------------|
| No. Sujetos: | 14 |
| Matriz Biológica: | Plasma |
| Vol. Sangre: | 6mL |
| Género: | Femenino y Masculino |

| | |
|---------------------|-------------------|
| Forma farmacéutica: | Tableta |
| Presentación: | Capsaicina 7.5 mg |
| Dosis y No. dosis: | 7.5 mg 1 tableta |
| Anticogulante: | Heparina sódica |

III.1.5.5. Recolección de las muestras

Cada tubo de ensaye se rotulara con el nombre de cada voluntario, número de muestra y hora de la toma y además se utilizara el **Anexo 7** para anotar toda esta información.

Se procederá a separar el paquete globular del plasma en una centrifuga a 3500 rpm, el plasma se vertiera en un tubo Eppendorf ámbar de 2 ml con una pipeta Pasteur, dicho tubo se identificará con el nombre del paciente y número de muestra, colocándose en su propia gradilla. Se congelarán dichas muestras a -20°C para ser trasladadas para su respectivo análisis.

Los procedimientos de muestreo y recolección de muestras serán coordinados por el Lic. Enf. Juan Carlos Núñez Valdez profesor de la carrera de enfermería en CISALUD con el apoyo de los pasantes de servicio social en enfermería.

Los procesos de centrifugación y separación del plasma será realizado por la M.C. Lizbeth Mariela Cerón Ramírez, Dr. Verónica Gonzales Torres profesoras en el área de Bioquímica de CISALUD.

III.1.5.6. Fluidos biológicos para el estudio

III.1.5.6.1. Muestras de sangre

- Se obtendrán trece muestras de sangre por periodo en los tiempos establecidos en el cronograma en tubos de ensayo específicamente diseñados para venopunción con heparina sódica.
- Cada muestra será de 6mL. La sangre extraída para limpiar el catéter deberá desecharse antes de la obtención de la muestra de sangre (purgado). El volumen de sangre que se extraerá por el estudio será de 78 mL aproximadamente.

- Se acepta tolerancia de \pm dos minutos para la toma de la muestra durante la fase de absorción y distribución y de hasta \pm cinco minutos durante la fase de eliminación.
- Cada muestra se centrifugará a 3500 rpm durante cinco minutos a 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).
- El volumen de plasma resultante, será depositado en dos criotubos de 1.5 ó 2 mL cada uno.
- Los tubos con el plasma serán perfectamente identificados con N^o de estudio (E), N^o de caso (1, 2,3, etc.) y N^o de muestra (T1, T2, T3, etc.); mantenidos en congelación a -20°C bajo, hasta su entrega a la Unidad Analítica.

III.1.5.6.2. Envío de muestras

Para garantizar que las condiciones de traslado de las muestras biológicas desde el laboratorio, en donde fueron procesadas para su congelación y conservación, hasta la unidad de química analítica no afecten la estabilidad de las muestras, será indispensable cumplir con los siguientes lineamientos:

- El investigador principal o el sub-investigador del estudio, definirá la fecha y hora del traslado en acuerdo con la unidad analítica, así como el transporte a emplear y el tiempo aproximado para el recorrido.
- El mecanismo de control y seguridad para el traslado de muestras será definido por el responsable del traslado en coordinación con el investigador principal o el sub-investigador.
- El Investigador principal firmará una relación del material que se envía, con una descripción detallada para cada sujeto del número de tubos y las claves.

- Se contará con un sistema de lectura de la temperatura interna en el congelador. Al menos cada 2 horas se hará una lectura con su registro correspondiente.
- Se registrará además, la lectura en el momento de la salida del material de área de procesamiento de muestras, así como la lectura del momento de recepción en la unidad analítica.
- El traslado de las muestras es responsabilidad del laboratorio virtual de enfermería en donde se realizó la obtención y procesamiento de las muestras.
- La entrega será personal, por un miembro del Laboratorio virtual de enfermería.
- Las muestras deberán llegar congeladas (20°C bajo cero como límite) en el momento de la revisión de las bolsas contenedoras.

III.1.5.7. Recepción, inspección y almacenamiento de las muestras por el Laboratorio Control de Calidad de Victory Enterprises, S. A. de C. V.

1. Aseguramiento de la calidad o control de la calidad recibirán y llenarán el registro recepción de muestras biológicas provenientes de un estudio de farmacocinética.
2. Verificarán la integridad de la documentación de las muestras.
3. El supervisor de métodos analíticos recibirá las muestras y con el apoyo de los analistas registrarán las observaciones en el formato PNO-10-026.8 bitácora de análisis de producto de desarrollo.

Una vez concluida la inspección el supervisor de métodos analíticos almacenará las muestras en el congelador y documentará el hecho en la bitácora PNO-10-011.1 operación y limpieza de refrigeradores y congeladores.

4. Aseguramiento de la calidad se cerciorará de la veracidad y confiabilidad de las operaciones. Rechazará las muestras que no cumplan con los criterios de aceptación, además aquellas muestras que no estén acompañadas por la documentación pertinente, informará al investigado principal, el motivo por el cual se rechazaron las muestras.
5. El responsable de métodos analíticos o aseguramiento de la calidad informará al laboratorio virtual de enfermería el motivo por el cual se rechazaron las muestras.
6. Las muestras biológicas rechazadas serán guardadas en Victory Enterprises, S. A. de C. V. mientras se dictamina su disposición por Victory Enterprises, S. A. de C. V. y el hospital virtual de CISALUD.

III.1.5.8. Inspección y criterios de aceptación de las muestras biológicas

1. Que las muestras se reciban congeladas a una temperatura no mayor a 20°C bajo cero.
2. Identificación correcta del contenedor y el embalaje.
3. Integridad del contenedor.
4. El número de voluntarios y muestreos.
5. El volumen de muestra por contenedor y muestreo.
6. Que las muestras no presenten hemólisis o lipemia. Solo se aceptarán siempre y cuando el número de muestras con estas condiciones no sea mayor del 10% del total de las muestras del proyecto.
7. Entrega por parte del laboratorio virtual de enfermería del registro de monitoreo de la temperatura de las muestras durante el transporte.

III.1.5.9. Almacenamiento de las muestras biológicas

Las muestras biológicas se almacenarán en congelación a una temperatura no menor de 20°C bajo cero.

III.1.5.10. Manejo de las muestras biológicas por Victory Enterprises, S. A. de C. V.

Las muestras biológicas serán manejadas conforme al documento controlado identificado como protocolo analítico que será desarrollado y validado por Victory Enterprises, S. A. de C. V., el cual será de uso exclusivo para el análisis químico de dichas muestras.

III.1.5.11. Desecho de las muestras biológicas

Una vez concluido el análisis químico de las muestras biológicas y el análisis estadístico de las mismas, las muestras serán retiradas del congelador y almacenadas en el almacén temporal de residuos peligrosos biológicos Infecciosos, en espera de ser recolectadas por la empresa TM-WINCO, S.A. de C.V.

III.1.5.12. Etiquetado de las muestras ultra congeladas

Los criotubos serán identificados con etiquetas que indicará el número de estudio, el número del sujeto, y número de muestra especificados en el protocolo. Las etiquetas serán diseñadas en computadora e impresas en una impresora térmica. El tipo de etiqueta e impresión asegurarán que la impresión y la adhesividad resistan varios ciclos de congelación y descongelación.

III.1.5.13. Gestión de calidad

El área de gestión de calidad del laboratorio virtual de enfermería mediante monitoreo al estudio como parte de un sistema de aseguramiento de calidad, determinará que se realicen todos los procedimientos de acuerdo a lo estipulado en el protocolo de investigación y que se cumpla con las recomendaciones de la regulación vigente y los lineamientos de la buena práctica clínica.

III.1.5.14. Documentación

Las Formas de reporte de caso serán llenadas por el personal médico autorizado con letra legible y sin tachaduras.

En caso de errores o cancelaciones se debe utilizar una línea sobre la palabra o dato erróneo y se coloca el dato o palabra correcto y se indica coloca la inicial del nombre y apellido completo de la persona que hace la corrección y la fecha. Si no hay espacio suficiente se deberá indicar en un lugar donde se encuentre espacio suficiente para hacer la indicación correspondiente.

III.1.6. Acceso directo a los datos reales obtenidos

Como parte de las responsabilidades del patrocinador, el estudio podrá ser monitoreado tanto en la parte analítica como en la clínica para asegurar la precisión y claridad de los datos, teniendo acceso a los documentos reales obtenidos para la verificación de los formatos de reporte de caso.

III.1.7. Contrato con ambulancia y servicio de hospital en caso de emergencia

En caso de eventos adversos, el personal médico proporcionará la atención médica inmediata que se requiera de acuerdo al evento adverso presentado.

En el caso de una contingencia grave que requiera atención hospitalaria, el investigador principal o personal médico en turno indicará el traslado del sujeto al hospital bajo convenio y procederá a contactar al servicio de ambulancia externa, de acuerdo al procedimiento normalizado de operación.

III.1.8. Estadística y plan analítico.

III.1.8.1. Análisis farmacocinético

37. En el estudio se evaluarán los siguientes parámetros farmacocinéticos:
38. Área bajo la curva del tiempo cero al tiempo t, calculada por la regla trapezoidal, siendo t el último punto de muestreo ($AUC_{0 \rightarrow t}$).
39. Área bajo la curva del tiempo cero al infinito ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$).
40. Concentración máxima (C_{max}).
41. Tiempo en que se alcanza la C_{max} (t_{max}).
42. Constante de eliminación (K_e).
43. Vida media ($T_{1/2}$).
44. Tiempo medio de residencia (TMR).

III.1.8.2. Análisis estadístico

De los niveles plasmáticos determinados de Capsaicina graficarán los perfiles de C_p vs t para cada sujeto y formulación. A partir de esas gráficas, se obtendrán los siguientes parámetros farmacocinéticos: Concentración máxima ($C_{máx}$) y tiempo necesario para alcanzar tal $C_{máx}$ ($t_{máx}$), el área bajo la curva al último tiempo de muestreo (ABC_{0-t}) será calculado por el método de los trapecios.

La velocidad de eliminación (k_e) será calculado por regresión log-lineal de la fase final de eliminación, y a partir de tal se calculará la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) al dividir $0.693/k_e$. El área bajo la curva extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$) se estimará sumando el ABC_{0-t} al cociente de la última concentración medida entre q_e . Estos parámetros farmacocinéticos serán evaluados estadísticamente por medio del módulo de análisis de varianza (ANADEVA) implementado en el programa Phoenix® WinNonLin®. Esto con el objetivo de evaluar el efecto terapéutico con respecto a la concentración máxima obtenida, en la formulación desarrollada.

III.1.9. Eventos adversos

Se utilizara **Anexo**

III.2. Segunda etapa

Validación del método analítico para la cuantificación de capsaicina en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia.

III.2.1. Generalidades

La validación de un método analítico es el proceso que establece por medio de estudios de laboratorio, que las características de desempeño de la metodología cumplen con requisitos para aplicaciones analíticas previstas, asegurándonos que es lineal, exacta precisa bajo los rangos especificados y que los resultados son altamente confiables. Las características de un método analítico se fundamentan en la determinación de estos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

La etapa previa a la validación de un método analítico, corresponde al estudio de todo aquello involucrado en el proceso de afectar la calidad del producto final o el resultado en el ensayo (valoración), es decir, la calificación de los equipos utilizados durante el desarrollo del proceso, los procedimientos, el personal ,estándares y/o la materia prima involucrados. La calificación es una premisa necesaria para poder validar. Es la comprobación formal, sistemática y documentada de que el equipo es el más adecuado para los fines previstos. Para llevar a cabo la misma se procede a la calibración del equipo a la comprobación de métodos y sistemas. La calificación de equipos es establecer evidencia documentada de que equipo funciona correctamente. Corresponde a realizar pruebas o ensayos a un equipo que es vital en un proceso de fabricación, compara resultados contra especificaciones o normas de calidad internacionales o nacionales y así terminar si es apto para asegurar un producto final de calidad.

III.2.2. Calificación instrumental

La calificación del equipo HPLC es esencial la verificación del rendimiento del instrumento elegido para una técnica analítica en particular, así como el software y el hardware que lo controla.

III.2.3. Etapas de una calificación

La calificación de un equipo se realiza tres etapas sucesivas:

- A.** Calificación de instalación (IQ), **B.** Calificación Operacional (OQ) y **C.** Calificación desempeño (PQ).

Calificación del HPLC

Los parámetros a evaluar en un sistema cromatográfico se encuentra detallado en la tabla 3.

III.2.3.1.1 Calificación de instalación (IQ)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos claves de la instalación están de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Asegura que el equipo está instalado adecuadamente. En esta etapa se recolecta toda la información de identificación, la ubicación, los requisitos de servicios básicos, las conexiones y toda medida de seguridad del equipo que sea preciso documentar. Corresponden a las especificaciones aprobadas en diseño.

Las cuales pueden ser:

- Nombre del equipo

- Nombre del fabricante, modelo o tipo
- Número de serie
- Fecha en la que fue recibido (nuevo o usado)
- Aspectos verificados para su aceptación de recepción
- Fecha en la que el equipo fue puesto en servicio por el laboratorio
- Manual de operación
- Manual de mantenimiento

III.2.3.2 Calificación operacional (OQ)

Es la verificación de que los equipos funcionan en forma esperada y son capaces de operar satisfactoriamente, sobre todo en el rango de los parámetros operacionales para los que han sido diseñados. Demuestra que funciona según lo previsto. En esta etapa se someten a prueba todos los controles de operación bajo condiciones normales y bajo condiciones extremas como por ejemplo reinicio de un equipo después de un corte de luz, todos los puntos de alarma, interruptores, dispositivos visualizadores y cualquier otra indicación de operación y función. Es realizado por el técnico calificado.

Tabla 3. Parámetros a evaluar en un sistema cromatográfico

| Modulo | Parámetro | Especificación |
|-----------------|--|---|
| Bomba | Reproducibilidad del flujo Precisión de gradiente | Reproducibilidad/TR/A/H Transferencia del método |
| Inyector | Reproducibilidad Residuo de muestra | Precisión de los resultados Exactitud de precisión de los resultados |
| Horno | Reproducibilidad de Tr | TR/A/H/ forma del pico |
| Detector | Ruido Energía de la lámpara Relación de señal /ruido Precisión de la longitud de onda Linealidad | Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad, transferencia de datos Precisión de resultados |
| Columna | Forma de pico Asimetría de pico TR, Resolución, Platos teóricos | Proceso de datos , identificación, reproducibilidad |

III.2.3.3 Calificación desempeño (PQ)

Se realiza para demostrar la efectividad y reproducibilidad del proceso, bajo condiciones normales de operación, bajo las condiciones límites de operación- es verificado por el usuario, trabajando con estándares certificados. Es la verificación que el equipo funciona en la forma esperada y es capaz de operar satisfactoriamente sobre todo el rango de los parámetros operacionales para el que ha sido diseñado.

III.2.4 Cumplimiento de etapas

Una vez que se cumple con las tres etapas de calificación (Calificación de instalación (IQ), Calificación Operacional (OQ) y Calificación desempeño (PQ).)

De un equipo de cromatografía se procede a Validar y Seguido el análisis de las muestras Plasmáticas de los voluntarios sanos.

La validación del método analítico para la cuantificación de capsaicina en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia se llevó a cabo en el laboratorio analítico de la empresa Farmacéutica Victory Enterprise.

A continuación se describirá el protocolo de validación:

III.2.5 Sustancias de referencia

Se utiliza capsaicina como estándar primario USP y Naproxeno Sódico como estándar secundario (estándar interno) patrocinados por la empresa Farmacéutica Victory Enterprise.

III.2.5.1 Capsaicina estándar primario USP

Sinónimos: Oleoresina de cápsico. Extracto alcohólico de cápsico

Lote: IOL046

Pureza: 94.1% Por miligramo de material como base

Clave interna: Sref 279-3

III.2.5.1 Naproxeno sódico

Sinónimos: d-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico ácido. MNPA.

Lote: MP-14-068-01

Pureza: 99.35

Clave interna: SS005.3

III.2. 6.Reactivos y disolventes

- Agua grado cromatográfico
- Acetonitrilo grado cromatográfico(Fermon)
- Isobutil Metil Cetona (Karal)
- Gás Nitrogeno (Infra 99%)
- Naproxeno(secundario)
- NaOH (Jalmek)
- Fosfato Monobásico de Potasio(Fermont)
- Fosfato Dibásico de Sódio(Fermont)
- Paracetamol (USP)
- Heparina
- E.D.T.A
- Tetrahidrofurano (Jalmek)
- 6 Bolsas de Plasma Humana(laboratório de Banco de Snagre)
- Cafeína(USP)
- Acido Acetil salicílico(USP)

III.2.7 Equipos e instrumentos

- Agitador vortes, marca Scientific Ind:
- Micropipeta Eppendorf de 100- 1000 µl
- Micropipeta eppendorf de 10 – 100 µL.
- Micropipeta eppendorf de 50 – 200 µL
- Micropipeta eppendorf de 0.5 – 10 µL
- Balanza analítica, marca Mettler AE200.
- Sonificador marca. Transonic 820-H
- Potenciómetro, marca Thermo Orión
- Ultra congelador, marca REVCO
- Pontenciometrico Seven Easy
- Evaporador con vacío y nitrógeno
- Sistema vacío

- Sistema cromatográfico HPLC Hewlett Packard 1100 Con detector de fluorescencia de 5 canales, , Bomba cuaternaria, Automuestreador con regulador de temperatura con plato de 100viales,Horno de temperatura de 5- 70°C,
- Refrigerador,
- Agitador Vortex VWR DVX 2500
- Microcentrifuga Beckmann Coulter

III.2.8 Materiales

- Columna Cromatográfico RP-18, 4.6X150 mm, 5 μ , marca Waters.
- Viales eppendorf de 1.5 mL
- Matraces volumétricos de vidrio de 5ml
- Matraces volumétricos de vidrio de 10ml
- Matraces volumétricos de vidrio de 100 mL
- Matraces volumétricos de vidrio de 200 mL
- Puntas para pipeta repetitiva de 5 mL
- Puntas para pipeta repetitiva de 12.5 mL
- Probeta de vidrio de 100 mL
- Vaso de precipitado de 50 mL
- Vasos de precipitado de 10 mL
- Probetas de vidrio de 25 mL
- Viales ámbar de 2 mL Agilent
- Membranas de filtración 45 μ m Millipore
- Puntas azules para micropipeta de 100 a 1000 μ L
- Puntas amarillas para micropipeta de 10-100 μ L
- Puntas amarillas para micropipeta de 50-200 μ L
- Puntas amarillas para micropipeta de 0.5-10 μ L
- Tubos eppendorf de 2.0 mL
- Insertos para viales
- Acrodiscos de 0.4 μ m de nylon

III.2.9 Matriz biológica (plasma de trabajo)

Mezcla de plasma de 6 voluntarios Se agitan cada una de las bolsas con plasma de manera manual, se vierten todas en un vaso de precipitado, se mezclan, se filtran y se almacenan en criotubos de 50 mL, los cuales se identifican con: número seriado, clave de bitácora y no. de folio; en el congelador -20°.

El material que se utiliza para realizar el pool de plasma previamente se sanitizado con alcohol isopropílico al 70% cada vez que se utilice un tubo del pool de plasma mezclar y registrarse.

III.2.10 Preparación de soluciones y curvas de calibración

III.2.10.1 Capsaicina

- **Solución A de capsaicina concentración de 100 µg/mL.** Pesar con exactitud 10.6 mg de capsaicina, estándar primario pasarlos a un matraz volumétrico de 100 mL disolver y aforar con una solución de dilución Agua: Acetonitrilo (1:1). Esta solución contiene 100 µg/mL de Capsaicina.
- **Solución B de capsaicina a concentración de 2 µg/mL.** Medir 200 µL de la solución A de capsaicina, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución de dilución. Esta solución contiene 0.12 µg/mL de Capsaicina.
- **Solución C de capsaicina a concentración de 4 µg/mL.** Medir con micropipeta 400 µL de la solución A de capsaicina, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución de dilución. Esta solución contiene 4.0 µg/mL de capsaicina.

- **Solución D de capsaicina a concentración de 8 µg/mL.**

Medir con micropipeta 800 µL de la solución A de capsaicina, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con solución de dilución. Esta solución contiene 8.0 µg/mL de capsaicina.

III.2.10.2 Solución de estándar interno (Naproxeno).

- **Solución E a concentración de 1000 µg/mL.** Pesar 20 mg de NAPROXENO, transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver y aforar con solución de dilución. Esta solución tiene una concentración de 1000 µg/mL.

III.2.10.3 Soluciones.

- **Solución Agua: Acetonitrilo (1:1).** Medir 100 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, transferir a un frasco, adicionar 100 mL de agua grado cromatográfico, mezclar.
- **Fase móvil.** Filtrar y desgasificar acetonitrilo, colocarlo en un recipiente, la fase móvil proporcionada por el equipo de HPLC está en proporción agua-acetonitrilo-tetrahidrofurano-fosfato Monobásico de Potasio pH 2.5 (55:40:5:1).
- **Blanco de fase móvil.** Medir 400 µL de fase móvil, transferir a un vial de 2.0 mL e inyectar al cromatógrafo de líquidos.
- **Blanco de reactivos.** Medir 1000 µL de solución agua: acetonitrilo (1:1), mezclar e inyectar al cromatógrafo de líquidos.
- **Solución de cafeína a concentración de 1.0 mg/mL.** Pesar 10 mg de cafeína y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol. Esta solución tiene una concentración de 1.0 mg/mL de cafeína.

- **Solución de ácido acetilsalicílico a concentración de 1.0 mg/mL.** Pesar 10 mg de ácido acetilsalicílico y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol. Esta solución tiene una concentración de 1.0 mg/mL de ácido acetilsalicílico.
- **Solución de paracetamol a concentración de 1.0 mg/mL.** Pesar 10 mg de paracetamol y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol. Esta solución tiene una concentración de 1.0 mg/mL de paracetamol.

III.2.11 Preparación de las muestras para selectividad del método.

- **Blanco de plasma.** Medir 400 μ L de plasma, transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL y mezclar.
- **Blanco de plasma cargado con E. I.** Medir 400 μ L de plasma, transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL adicionar 25 μ L de la solución E de Naproxeno a concentración de 1000 μ g/mL y mezclar.
- **Blanco de plasma cargado con capsaicina.** Medir 390 μ L de plasma, transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL adicionar 10 μ L de la solución D de Capsaicina a concentración de 8 μ g/mL y mezclar.
- **Blanco de plasma cargado con capsaicina y E. I.** Medir 390 μ L de plasma, transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL adicionar 10 μ L de la solución D de Capsaicina a concentración de 8 μ g/mL y 25 μ L de la solución de E de E.I. y mezclar.
- **Blanco de plasma cargado con cafeína (10 μ g/mL).** Preparar una muestra como se indica a continuación, en un tubo eppendorf de 1.5 mL, transferir 5 μ L de una solución de cafeína de concentración de 1.0 mg/mL adicionar 395 μ L de plasma, mezclar.

- **Blanco de plasma cargado con ácido acetilsalicílico (25 µg/mL).** Preparar una muestra como se indica a continuación, en un tubo eppendorf de 1.5 mL, transferir 12.5 µL de una solución de ácido acetilsalicílico de concentración de 1.0 mg/mL adicionar 387.5 µL de plasma, mezclar.
- **Blanco de plasma cargado con paracetamol (20 µg/mL).** Preparar una muestra como se indica a continuación, en un tubo eppendorf de 1.5 mL, transferir 10 µL de una solución de paracetamol de concentración de 1.0 mg/mL adicionar 390 µL de plasma, mezclar.
- **Blanco de plasma con heparina.** Colocar en un tubo vacutainer con heparina sódica a concentración de 86 unidades USP, 6 mL de plasma, mezclar con ayuda del vortex, tomar 400 µL y colocarlos en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- **Blanco de plasma con E.D.T.A.** Colocar en un tubo Vacutainer con 7.2 mg de E.D.T.A. agregar 4 mL de plasma, mezclar con ayuda del vortex, tomar 400 µL y colocarlos en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- **Blanco de plasma hemolizado.** A un tubo eppendorf de 1.5 mL, adicionar 400 µL de plasma hemolizado.
- **Blanco de plasma lipémico.** A un tubo eppendorf de 1.5 mL, adicionar 400 µL de plasma lipémico.

III.2.12 Preparación de la muestra para adecuabilidad del sistema.

- Preparar una muestra control a partir de la solución C de Capsaicina (4 µg/mL) y adicionar 25 µl de la solución E de Naproxeno 1 mg/mL, como lo muestra la siguiente tabla:

| Tabla 4. Preparación de la adecuabilidad del sistema | | | | |
|---|---|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| MUESTRA | µL utilizados de la Sol. de 4.0µg/mL | µL utilizados de la fase móvil | µL de la sol. del E. I | Concentración (µg/mL) |
| CAPSAISINA | 250 | 4125 | 625 | 0.2/125 |

Mezclar e inyectar al cromatógrafo de líquidos.

III.2.13 Preparación de las muestras a concentraciones baja, media y alta en solución.

Preparar las muestras a concentración baja, media y alta en solución en como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 5. Preparación de las muestras en solución

| CONCENTRACIONES BAJA, MEDIA Y ALTA EN SOLUCIÓN | | | |
|---|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| MUESTRA | µL de solución (8.0µg/mL) | mL de fase móvil | Concentración (ng/mL) |
| BAJA | 281 | 5 | 90(450ng/mL) |
| MEDIA | 468 | 5 | 150(750ng/mL) |
| ALTA | 593 | 5 | 190(950ng/mL) |

Adicionar una alícuota de 0.625 ml de una solución de 1.0mg/ml de E.I. Esta solución contiene 0.125mg/mL. Mezclar e inyectar en el cromatógrafo de líquidos.

III.2.14 Preparación de la curva de calibración para el método.

Preparar la curva de calibración en tubos de 5 mL como se indica en la en la siguiente tabla:

Tabla 6. Preparación de la curva de calibración

| CURVA DE CALIBRACIÓN | | | |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| MUESTRA | μL de solución (2μg/mL) | μL de plasma | Concentración (ng/mL) |
| LM 1 | 6 | 394 | 30 |
| LM 2 | 12 | 388 | 60 |
| LM 3 | 24 | 376 | 120 |
| LM 4 | 36 | 364 | 180 |
| LM 5 | 42 | 358 | 210 |

III.2.15 Preparación de las muestras a concentración baja, media y alta para el método.

Preparar las muestras control en tubos de 5 mL como se indica en la en la siguiente tabla:

Tabla 7. Preparación de las muestras control en plasma

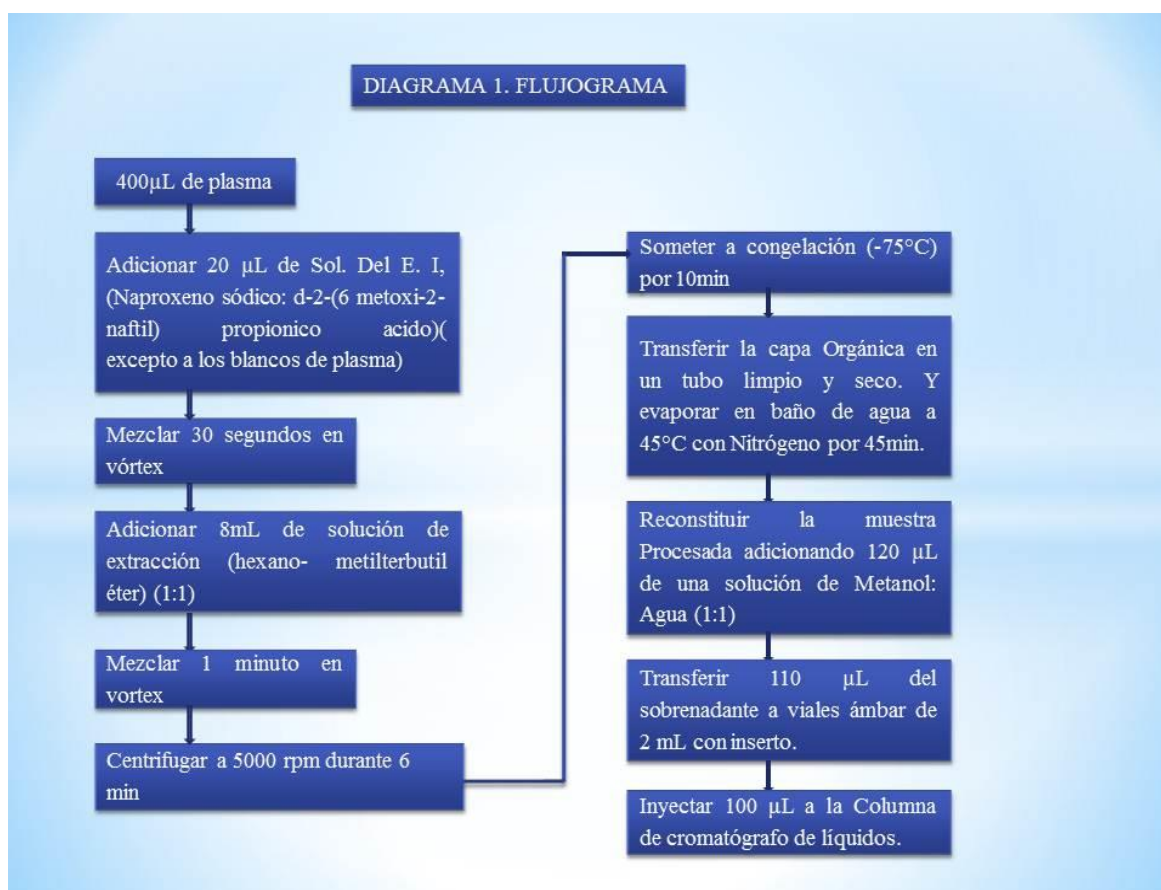
| CURVA DE CALIBRACIÓN | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|
| MUESTRA | μL de solución (2μg/mL) | μL de plasma | Concentración (ng/mL) |
| LM 1 | 6 | 394 | 30 |
| LM 2 | 12 | 388 | 60 |
| LM 3 | 24 | 376 | 120 |
| LM 4 | 36 | 364 | 180 |
| LM 5 | 42 | 358 | 210 |

III.2.16 Blanco de plasma

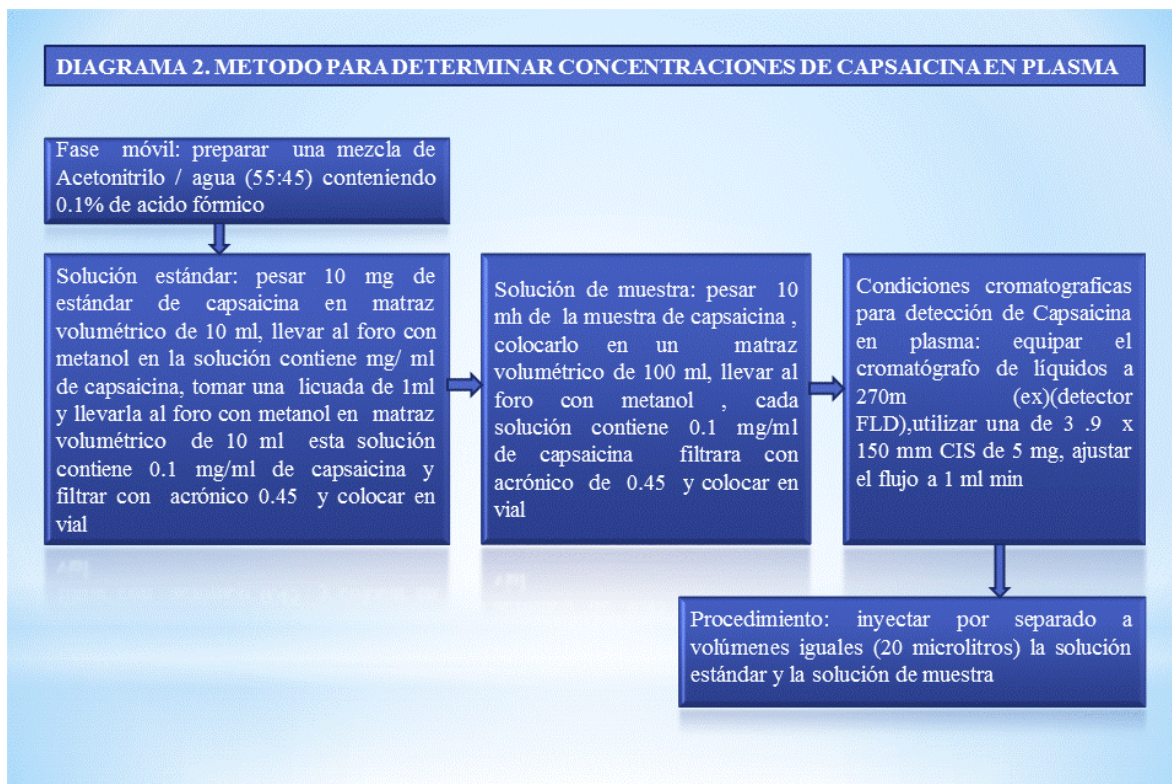
Medir 400 μL de plasma, transferir a un tubo de 5 mL y mezclar.

III.2.17 Tratamiento de las muestras

A todas las muestras preparadas con plasma contenidas en los tubos, realizarles el siguiente tratamiento de extracción, como se puede ver en el diagrama 1.



En el diagrama 2 se presenta el flujograma del método para determinar concentraciones de capsaicina en plasma.



III.2.18 Condiciones cromatográfico

| | |
|--|--|
| Columna Cromatografía: | Xterra RP-18, 3.9 X 150 mm, 5 μ . |
| Fase móvil: | Agua-Acetonitrilo-Tetrahidrofurano PH 2.5 (55:40:5:1) |
| Temperatura de columna: 25 °C | 25°C |
| Velocidad de flujo: 1.0 mL/min. | 1.0 mL/min. |
| Volumen de inyección: 100 μ HPLC FLD | 100 μ L |
| Longitud de onda: | Ex 275 nm Em 305 nm |
| Detector : | Fluorescencia |

| | |
|--|-------|
| Tiempo de retención aproximado: | |
| Capsaicina | 6 min |
| Naproxeno | 4 min |

III.2.19 Modelo matemático.

La respuesta del capsaicina utilizada durante la validación es el área bajo la curva, se obtendrá la relación de áreas de capsicina entre el área del E. I., que se relaciona con la concentración nominal correspondiente a través del modelo matemático lineal que es el modelo que mejor se ajusta a los datos, empleando la siguiente ecuación:

| | |
|----------------------|-------------------|
| Despejando x: | $y = mx + b$ |
| | $\frac{y - b}{m}$ |

Donde m es la pendiente, x es la concentración y b es la ordenada al origen. Para la determinación de la concentración recuperada, se debe introducir el resultado de área obtenido a la ecuación anteriormente generada.

III.2.19 Parámetros analíticos a evaluar en la validación

III.2.19.1 Adecuabilidad del sistema

III.2.19.1.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar, procesar e inyectar por día de análisis una muestra de Capsaicina (0.200 µg/mL) adicionada con el estándar interno a concentración de 0.125 µg/mL.
2. Inyectar al cromatógrafo de líquidos series de 6 inyecciones y evaluar las últimas seis que cumplan con los criterios de aceptación.

III.2.19.1.2 Criterio de aceptación

| |
|---|
| Platos teoricos ≥ 2000 |
| Factor de coleo ≤ 2.0 |
| Tiempo de retencion \leq |
| Respuestas cromatografica C.V ≤ 2.0 (Uv-Vis,FLD) |

Cualquier desviación deberá justificarse

III.2.19.2 Selectividad

III.2.19.2.1 Condiciones de la prueba

Preparar, procesar e inyectar por duplicado cada una de las siguientes muestras:

1. Muestra blanco del pool de plasma sin adición de Capsaicina.
2. Muestra blanco del pool de plasma adicionada con Capsaicina a la concentración más baja de la curva (30 ng/mL).
3. Muestra blanco del pool de plasma adicionada con 25 µL del E. I. (Naproxeno) a concentración de 1 mg/mL.
4. Muestra blanco del pool de la matriz biológica adicionada con cafeína a concentración terapéutica.
5. Muestra blanco del pool de la matriz biológica adicionada con paracetamol a concentración terapéutica.

6. Muestra blanco del pool de la matriz biológica adicionada con ácido acetil-salicílico a concentración terapéutica.
7. Muestra blanco del pool de la matriz biológica adicionada con heparina (sin el analito de interés).
8. Muestra blanco del pool de la matriz biológica adicionada con EDTA (sin el analito de interés).
9. Muestra blanco de la matriz biológica lipémico.
10. Muestra blanco de la matriz biológica hemolizado.
11. Muestra blanco del pool de plasma adicionado con Capsaicina a la concentración de 30 ng/mL y E. I.

III.2.19.2.2 Criterio de aceptación

No deben presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el tiempo de retención del estándar interno.

III.2.19.3 Linealidad del método.

III.2.19.3.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar y procesar a partir de pesadas independientes 3 curvas de calibración para Capsaicina, e inyectarlas en la misma corrida.
2. Reportar la concentración nominal contra el área obtenida.
3. Calcular el valor de la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de determinación y desviación absoluta (exactitud).
4. Elaborar una gráfica de concentración vs. Respuesta para cada curva y otra global.

III.2.19.3.2 Criterio de aceptación

El coeficiente de correlación “r” es mayor o igual a 0.99.

El coeficiente de determinación r^2 es mayor o igual a 0.98.

III.2.19.4 Límite de cuantificación.

III.2.19.4.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar, procesar e inyectar una curva de calibración y muestras de plasma adicionadas de la concentración más baja de la curva de calibración, por quintuplicado.
2. Determinar la concentración recuperada interpolando las respuestas de las muestras adicionadas en la curva de calibración preparada el mismo día de análisis.
3. Calcular el promedio de las concentraciones recuperadas, desviación estándar, coeficiente de variación y exactitud.

III.2.19.4.2 Criterio de aceptación

El valor promedio de las determinaciones debe estar dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal y el coeficiente de variación es $\leq 20\%$.

III.2.19.5 Recuperación absoluta.

III.2.19.5.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar, procesar e inyectar muestras control a concentración baja, media y alta (0.450, 0.750 y 0.950 $\mu\text{g/mL}$), cada una por quintuplicado en solución.
2. Preparar, procesar e inyectar muestras control a concentración baja, media y alta (90, 150 y 190 ng/mL), cada una por quintuplicado en plasma.
3. Determinar el cociente de la respuesta del capsaicina en plasma entre la respuesta de la capsaicina en solución por cien, para cada nivel de concentración.
4. Determinar el cociente de la respuesta del E. I (Naproxeno) en plasma entre la respuesta del E. I. (Naproxeno) en solución por cien, para cada nivel de concentración.

5. Determinar el % del Coeficiente de variación, para cada compuesto.

III.2.19.5.2 Criterio de aceptación

El por ciento de recuperación no es necesariamente del 100 %, pero debe ser consistente y reproducible para cada nivel de concentración. % C. V. \leq 15 %

III.2.19.6 Repetibilidad

(Precisión y exactitud)

III.2.19.6.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar, procesar e inyectar una curva de calibración y por quintuplicado muestras control a concentraciones baja, media y alta (90, 150 y 190 ng/mL), de Capsaicina.
2. Calcular la concentración recuperada para cada nivel de concentración interpolando la respuesta de los puntos control en la curva de calibración.
3. Determinar el promedio de la concentración recuperada, % de C.V. y la desviación absoluta.

III.2.19.6.2 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 % Exactitud (desviación) \pm 15 % respecto al valor nominal de concentración.

III.2.19.7 Reproducibilidad (precisión y exactitud)

III.2.19.7.1 Condiciones de la prueba

1. Un mismo analista, durante tres días diferentes, prepara, procesa e inyecta una curva de calibración y muestras control a concentración baja, media y alta (90, 150 y 190 ng/mL), cada uno por triplicado.
2. Calcular la concentración recuperada para cada nivel de concentración.

3. Comparar el promedio de las concentraciones de cada nivel de concentración de ambos analistas.

III.2.19.7.2 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 % Exactitud (desviación) \pm 15 % respecto al valor nominal de concentración.

III.2.19.8 Estabilidad inicial

III.2.19.8.1 Condiciones de la prueba

1. Para evaluar la estabilidad inicial (cero) preparar en cantidad suficiente de las muestras control en plasma a cada nivel de concentración (90, 150 y 190 ng/mL), para someter a cada condición.
2. El día de preparación, procesar e inyectar una curva y muestras control a tres niveles de concentración, cada uno por triplicado.
3. Calcular la concentración recuperada para cada nivel de concentración.

III.2.19.8.2 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 % Exactitud (desviación) \pm 15 % respecto al valor nominal de concentración.

III.2.19.9 Estabilidad a temperatura ambiente

III.2.19.9.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar muestra suficiente para obtener tres series de muestras control a concentración baja, media y alta (90, 150 y 190 ng/mL), cada una por triplicado.
2. El día de preparación, procesar e inyectar una curva de calibración y una serie de muestras control a tres niveles de concentración (90, 150 y 190 ng/mL), cada uno por triplicado.

3. Identificar la segunda y tercera serie como prueba y referencia (respectivamente) y almacenar en el ultra congelador.
4. Transcurridas 24 horas sacar del ultra congelador ambas series, procesar e inyectar la serie de **referencia** y mantener en la mesa de trabajo la serie de **prueba**
5. Transcurridas 24 horas realizar el tratamiento de extracción a la serie de prueba.
6. Comparar los resultados obtenidos para las muestras de prueba con las concentraciones de las muestras de referencia.

III.2.19.9.2 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 % Exactitud (Desv. Abs) \pm 15 % respecto al valor inicial.

III.2.19.10 Estabilidad de la solución

III.2.19.10.1 Condiciones de la prueba

1. En tubos eppendorf separar alícuotas de las soluciones a concentración de Capsaicina empleada para la adecuabilidad del sistema.
2. Identificar y almacenar en refrigeración.
3. Inyectar como se indica en la adecuabilidad.
4. Transcurrido el tiempo establecido para la estabilidad, evaluar la última alícuota mantenida en congelación de las muestra de referencia.
5. Comparar las respuestas de la muestra de referencia (Inyectada inicialmente) con las respuestas de la última inyección.

III.2.19.10.2 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 al comparar las respuestas de la muestra inyectada inicialmente con las respuestas de la última inyección.

III.2.19.11 Tolerancia

III.2.19.11.1 Condiciones de la prueba

1. Preparar, procesar e inyectar una curva de calibración junto con muestras control a concentración baja, media y alta (90, 150 y 190 ng/mL) de Capsaicina cada una por triplicado.
2. **Modificar las condiciones originales para evaluar:**
 - Influencia de la proporción de fase móvil, modificando la proporción de la solución amortiguadora una unidad arriba y una abajo del volumen empleado durante la validación.
 - Modificación de la temperatura del termostato de la columna una unidad arriba y otra abajo respecto a la temperatura empleada durante la validación.
3. Inyectar al cromatógrafo de líquidos muestras control a concentración baja, media y alta junto con una curva de calibración con las condiciones de validación como referencia, e inyectar las mismas muestras para cada condición modificada.
4. Realizar la comparación de la concentración de las muestras control de referencia con las concentraciones de las muestras control a condiciones modificadas.

III.2.19.11.2 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 % Exactitud (Desv. Abs) \pm 15 % respecto al valor nomina.

III.2.20 Cronograma de actividades

Figura 5. Cronograma de actividades

| Cronograma para la realización de la validación del método analítico para cuantificar capsaicina en plasma humano por FLD. | | | | |
|---|-------------|-------------------|-------------|-------------|
| Prueba | Dia1 | Dia2 | Dia3 | Dia4 |
| Blanco de reactivos | | | | |
| Adecuabilidad | | | | |
| Blanco de plasma | | | | |
| Selectividad | | | | |
| Linealidad | | | | |
| Recobro | | | | |
| Repetibilidad | | | | |
| Precisión del método | | | | |
| Reproducibilidad | | | | |
| Reproducibilidad (analista 2) | | | | |
| Limite de cuantificación | | | | |
| Est. Temp. ambiente | Referencia | 24 hrs. Prueba | | |
| Estabilidad de la solución | Inicial | | | Final |
| Tolerancia | | | | |

III.2.21 Análisis de voluntarios

Una vez concluido con la validación de método analítico para cuantificar capsaicina en plasma humano por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia, se procede a cuantificar capsaicina de las muestras plasmáticas obtenidas de la administración oral a 14 voluntarios sanos, 8 mujeres y 6 hombres, se obtuvieron muestras plasmáticas en diferentes tiempos de muestreo. En la siguiente tabla se observa el cronograma de actividades para el análisis de voluntarios. Por cada día de análisis se evalúa blanco de reactivos, Adecuabilidad, blanco de plasma, Curva de Calibración y muestras control. Intercaladas con las muestras de los voluntarios.

Tabla 8. Cronograma de análisis de voluntarios

| TABLA 10. CRONOGRAMA DE ANÁLISIS DE VOLUNTARIOS | | | | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Blanco de reactivos | Día1 | Día2 | Día3 | Día4 | Día5 | Día 6 | Día 7 |
| Adecuabilidad | | | | | | | |
| Blanco de plasma | | | | | | | |
| Linealidad | | | | | | | |
| Muestra de control Baja | | | | | | | |
| Muestra de voluntarios | Voluntario A | Voluntario B | Voluntario C | Voluntario D | Voluntario F | Voluntario H | Voluntario K |
| Muestra de control Media | | | | | | | |
| Muestra de voluntarios | | | | | | | |
| Muestra de control Alta | | | | | | | |
| Muestra de voluntarios | | | | | | | |
| Muestra de control Baja | | | | | | | |
| Muestra de voluntarios | | | | | | | |
| Muestra de control Media | | | | | | | |
| Muestra de voluntarios | | | | | | | |
| Muestra de control Alta | | | | | | | |
| | | | | | | | |

III.2.21.3 Parámetros y criterios de aceptación

III.2.21.4 Adecuabilidad del sistema

II.2.21.4.1 Criterio de aceptación

Platos teóricos ≥ 2000 .

Factor de coleo ≤ 2.0 .

Tiempo de retención ≤ 2.0 .

Respuesta Cromatográfico C.V ≤ 2.0 (Uv-Vis, FLD).

Cualquier desviación deberá justificarse.

III.2.21.5 Linealidad.

III.2.21.5.1 Criterio de aceptación

El coeficiente de correlación “r” es mayor o igual a 0.99.

El coeficiente de determinación r^2 es mayor o igual a 0.98.

III.2.21.6 Blanco de Reactivos y Blanco de plasma

III.2.21.6.1 Criterio de aceptación

No deben presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el tiempo de retención del estándar interno.

III.2.21.7 (Muestras control baja, media y alta)

III.2.21.7.1 Criterio de aceptación

% C. V. \leq 15 % Exactitud (desviación) \pm 15 % respecto al valor nominal de concentración.

CAPÍTULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS

IV.1 Primera etapa

Se administra en forma oral a 14 voluntarios sanos 8 mujeres y 6 hombres con un rango de edad entre 20 a 23 años en condiciones de ayuno de 12 horas una tableta de capsaicina de 7.5mg con 250 ml de agua.

A los 40 minutos posteriores a la ingesta de dicha tableta dos voluntarios de sexo masculino refieren dolor quemante en región de epigastrio con intensidad moderada y que se irradia hacia región de mesogástrico. Se toman signos vitales (presión arterial, frecuencias cardiaca y respiratoria, pulso y temperatura) los cuales se reportan dentro de parámetros clínicos normales. Al cabo de periodo de una hora de transcurrida la ingesta oral de capsaicina estos voluntarios refieren aumento en la intensidad del dolor epigástrico quemante acompañándose de sensación nauseosa, se valora presión arterial encontrándose en el voluntario D un incremento de la misma (130/95 mmHg), y en ambos se percibe fascies doloroso.

Con estos hallazgos clínicos se canalizan ambos con 500 ml de solución salina al 0.9% con un goteo de 30 por minuto agregando a dicha solución 25 mg de ranitidina (un antagonico de receptores H₂ de la histamina de las células parietales de estómago, el cual inhibe la secreción estimulada y basal de ácido gástrico y reduce la producción de pepsina). En el transcurso de dos a tres horas posteriores a la ingesta de capsaicina oral doce voluntarios (85.7%) refiere dolor epigástrico y seis de ellos también dolor mesogástrico.

El dolor epigástrico inicio con una intensidad leve progresando hacia una intensidad aguda en un intervalo de 35 minutos. Al tomar signos vitales en estos voluntarios no se perciben datos de anormalidad en los mismos. A la exploración clínica se despierta dolor en región de epigastrio y mesogástrico a la palpación abdominal, no se perciben alteraciones peristálticas abdominales a la auscultación y al realizar maniobras de percusión abdominal no se encuentran sonidos patológicos.

Se canaliza estos doce voluntarios con 500 ml de solución salina al 0.9% al mismo goteo, se aplica 25 mg a solución. Por las manifestaciones álgidas manifestadas por los voluntarios se aplica IV 25 mg de ranitidina lentamente. En este grupo de voluntarios cuatro de ellos (28.5%: 3 hombre y 1 mujer) refieren dolor agudo intenso epigástrico y mesogástrico el cual ameritó además del esquema terapéutico mencionado anteriormente la administración de 20 mg IV de butilhioscina.

En la tabla 9. Se presentan las manifestaciones clínicas observadas en los voluntarios durante el estudio.

| TABLA 9. MANIFESTACIONES CLINICAS | | | | | |
|--|----------------|---------------|--------------------------|---------------------------|------------------|
| VOLUNTARIO | PIROSIS | NAUSEA | DOLOR EPIGASTRICO | DOLOR MESOGRASTICO | FEBRICULA |
| A | | | X | | |
| B | | | X | X | |
| C | | | X | X | X |
| D | X | X | X | | |
| E | | | X | X | |
| F | X | | X | | |
| G | | | X | X | |
| H | | | X | X | |
| I | | | X | | |
| J | | X | X | X | |
| K | | | X | | |
| L | | | X | | |
| M | | | X | | |
| N | | | X | | |

El 85.7% de los voluntarios (12) en un lapso de 6 horas posteriores a la ingesta oral de la tableta de 7.5 mg de capsaicina con el manejo estipulado no refiere dolor ni epigástrico ni mesogástrico. Se observó que al ingerir el desayuno cuatro horas posteriores a la ingesta de capsaicina oral los voluntarios refieren una disminución de las manifestaciones epigástricas. Otro voluntario (7.14%) refiere cefalea frontal a los 45 minutos posteriores a la ingesta oral la cual cede de forma espontánea a las 2 horas. Otro más (7.14%) presenta hiperemia facial a los 45 minutos posteriores a la ingesta cediendo al cabo de una hora.

Un voluntario amerito además del manejo con solución salina, ranitidina en solución e IV, butilhioscina agregarle 10 mg IV de metoclopramida, a este voluntario del sexo masculino se le controla sus manifestaciones hasta las 8 horas posteriores a la ingesta oral de capsaicina. Durante este periodo sus signos vitales estuvieron dentro de parámetros clínicos adecuados.

Otro más del sexo femenino se le maneja con solución salina, ranitidina en solución, ranitidina IV, butilhioscina se le agrega una dosis 100 mg de prednisona, signos vitales no muestran alteraciones cede su dolor a las 10 horas posteriores de la ingesta oral de capsaicina.

En la tabla 10. Se presentan los signos vitales promedio de los voluntarios.

| TABLA 10. SIGNOS VITALES PROMEDIO DE VOLUNTARIOS | | | | | | | | |
|--|------|-------------|-------------|-----------|-----------|--------------------------------|-------------|-----------|
| VOLUNTARIO | SEXO | P/A mmHg | FREC.CARD | FREC.RESP | PULSO | DOLOR A LA PALPACION ABD | | FEBRICULA |
| | | | Latidos/min | Movs/min | Pulsa/min | Abdominal | Epigastrica | E |
| A | F | 120/75 | 78 | 21 | 72 | | | |
| B | F | 100/65 | 69 | 19 | 66 | X | X | |
| C | F | 105/65 | 102 | 20 | 96 | X | X | 37.9 |
| D | F | 110/60 | 77 | 20 | 75 | | X | |
| E | M | 120/80 | 70 | 19 | 71 | X | X | |
| F | M | 120/80 | 74 | 20 | 74 | | X | |
| G | M | 110/80 | 63 | 20 | 68 | X | X | |
| H | M | 120/75 | 78 | 19 | 78 | X | X | |
| I | F | 115/70 | 68 | 19 | 68 | | X | |
| J | M | 120/80 | 76 | 20 | 79 | X | X | |
| K | M | 120/75 | 78 | 20 | 78 | | X | |
| L | F | 100/70 | 68 | 18 | 70 | | X | |
| M | F | 110/80 | 65 | 19 | 66 | | X | |
| N | F | 110/70 | 20 | 20 | 78 | | X | |

X=PRESENTA DOLOR

De las tablas 35 a la 48 se pueden observar los resultados obtenidos de los voluntarios, donde se percibe que no se reportan concentraciones plasmáticas así mismo en la figuras 6 a la 19 se presentan los cromatograma de los voluntarios a los 2 horas pos ingesta oral de capsaicina donde se ve claramente que no se detectó concentraciones.

IV.2 Segunda etapa

Resultados de validación de método analítico para cuantificar capsaicina en plasma humano por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia.

IV.2.1 Tabla de adecuabilidad del sistema (ver Cromatograma anexo 8)

| FORMULAS | | |
|------------------------------|--|----------------------------------|
| Promedio | Desviacion estandar | Coficiente de variacion |
| $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$ | $s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ | $C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$ |

n = número de muestras de contenido/potencia/valoración.

Por día de trabajo se inyecta capsaicina en solución, para verificación de que el sistema analítico opera con base a criterios preestablecidos por el proveedor, que permitan asegurar un desempeño óptimo y la confiabilidad de los resultados de un método analítico. Como se puede ver en la tabla siguiente.

Tabla 11. Adecuabilidad del sistema

| DATOS | CONCENTRACIÓN mg/mL | AREA Std _{REF} CAPSAICINA | AREA AL CUADRADO |
|--------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| 1 | 0.00075 | 0.2444 | 0.059707131777348 |
| 2 | | 0.2476 | 0.061306899706102 |
| 3 | | 0.2442 | 0.059634002052912 |
| 4 | | 0.2465 | 0.060751232213573 |
| 5 | | 0.2476 | 0.061289344902320 |
| 6 | | 0.2454 | 0.060228802153856 |
| SUMATORIA | | 5.902 | 0.362917412806111 |
| CUADRADO | | 34.84 | 0.13 |
| n | | 6 | |
| PROMEDIO | | 0.2459 | |
| DES. EST. | | 0.0014 | |
| % C. V. | | 0.58 | |
| CRITERIOS DE ACEPTACIÓN | | | |
| % C. V. | | ≤ 15 % | |

IV.2.2 Linealidad del método

| FÓRMULAS: | | |
|---|---------------------------------------|---|
| PENDIENTE | ORDENADA AL ORIGEN | COEFICIENTE DE DETERMINACION |
| $\beta_1 = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$ | $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$ | $r^2 = \frac{(n\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n\sum x^2 - (\sum x)^2)(n\sum y^2 - (\sum y)^2)}$ |

n= número de mediciones (Concentración - Respuesta analítica).

| INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE | |
|--|--|
| $t_{0.975, n-2}$ | $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$ |
| | $S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ |
| | $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$ |

En la siguiente tabla 12 se muestra el análisis de 5 muestras plasmáticas de diferente nivel de concentración preparado por triplicado, para la evaluación del modelo matemático (determinación de Capsaicina).

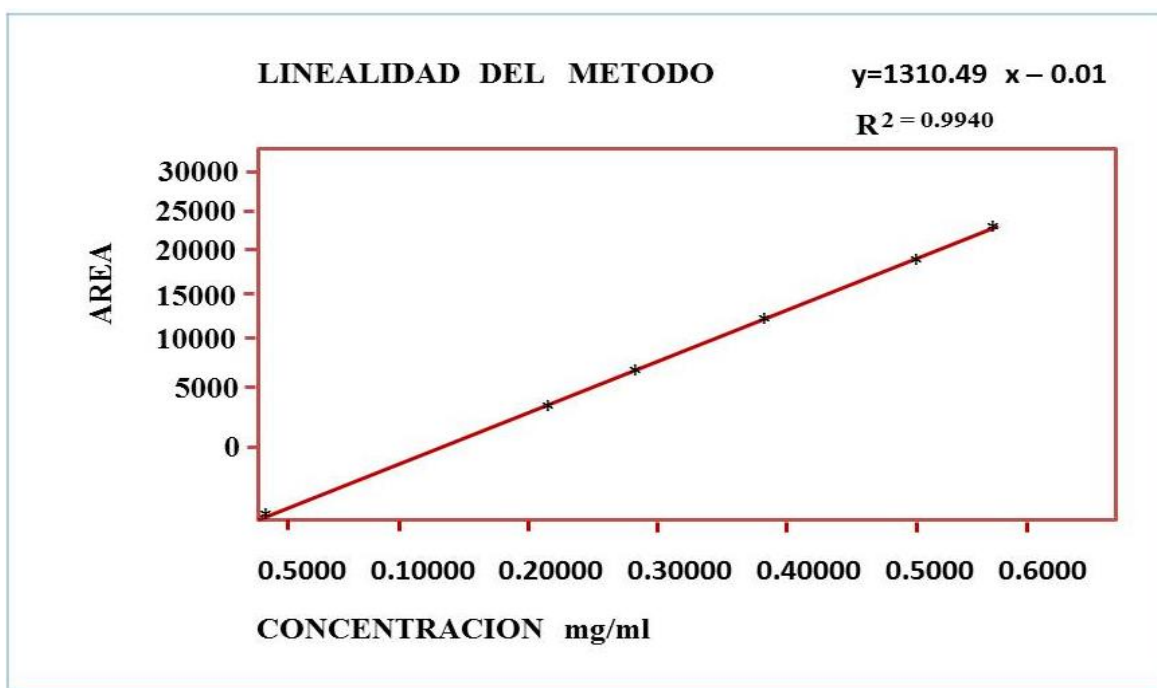
Tabla 12. Linealidad del método

| CONCENTRACIÓN mg/mL (x) | AREA (Y) CAPSAICINA | X ² | y ² | xy |
|-------------------------|---------------------|----------------|----------------|------------|
| 0.000030 | 0.0330 | 9E-10 | 0.00 | 0.00000099 |
| | 0.0353 | | 0.00 | 0.00000106 |
| | 0.0263 | | 0.00 | 0.00000079 |
| PROMEDIO | 0.032 | | | |
| 0.000060 | 0.0789 | 0.0000000036 | 0.01 | 0.00000474 |
| | 0.0719 | | 0.01 | 0.00000432 |
| | 0.0776 | | 0.01 | 0.00000466 |
| PROMEDIO | 0.076 | | | |
| 0.000120 | 0.1496 | 0.00000001 | 0.02 | 0.00001796 |
| | 0.1511 | | 0.02 | 0.00001813 |
| | 0.1464 | | 0.02 | 0.00001757 |
| PROMEDIO | 0.149 | | | |
| 0.000180 | 0.2458 | 0.00000003 | 0.06 | 0.00004425 |
| | 0.2341 | | 0.05 | 0.00004213 |
| | 0.2480 | | 0.06 | 0.00004463 |
| PROMEDIO | 0.243 | | | |
| 0.000210 | 0.2621 | 4.41E-08 | 0.07 | 0.00005504 |
| | 0.2655 | | 0.07 | 0.00005576 |
| | 0.2562 | | 0.07 | 0.00005380 |
| PROMEDIO | 0.261 | | | |
| SUMATORIAS | 4.56 | 0.00000 | 0.468668799 | 0.00 |
| CUADRADOS | 20.83 | 8.19104E-14 | 0.219650443 | 0.00 |
| n | | | 15 | |

n. numero de mediciones (concentración- respuesta analítica)

| CONC. (mg/mL) | AREA | PARAMETROS | |
|--------------------------------|-------|-----------------|---------|
| 0.00003 | 0.032 | b_1 | 1310.49 |
| 0.00006 | 0.076 | b_0 | -0.01 |
| 0.00012 | 0.149 | r | 1.00 |
| 0.00018 | 0.243 | r^2 | 0.9940 |
| 0.00021 | 0.261 | $t_{0.975,n-2}$ | 2.16 |
| IC(b_1)= (1178.78,1442.21) | | $S_{y/x}$ | 0.03 |
| | | S_{b1} | 60.98 |

Figura 6. Linealidad del método



IV.2.3 Selectividad

Tabla 13. Prueba de selectividad

| CRITERIOS DE ACEPTACIÓN | |
|--|--------------------------------------|
| Coeficiente de determinación | $R^2 \geq 0.98$ |
| Intervalo de confianza para la pendiente | IC(b_1), no debe incluir el cero |

IV.2.3 Selectividad

En la tabla 13 se muestra el análisis de 11 muestras plasmáticas de diferente concentración. Para evaluar la respuesta del método (capsaicina), se adiciona posibles analitos o variantes que pudieran presentar las muestras durante el muestreo. Estas variantes no presentaron interferencia en la respuesta de Capsaicina y tampoco se presentó interferencia en la respuesta al estándar Interno.

Tabla 13. Prueba de selectividad

| ANALITO | AREA CAPSAICINA | AREA ESTANDAR INTERNO |
|--|-----------------|-----------------------|
| Plasma sin capsaicina | 0.000 | 0.000 |
| | 0.000 | 0.000 |
| Plasma con capsaicina | 59.994 | 0.000 |
| | 68.178 | 0.000 |
| Plasma con std interno | 0.00 | 350.201 |
| | 0.00 | 351.120 |
| Plasma con capsaicina y std interno | 78.63 | 370.378 |
| | 63.69 | 310.581 |
| Matriz biológica con cafeína | 0.000 | 0.00 |
| | 0.000 | 0.00 |
| Matriz biológica con paracetamol | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 |
| Matriz biológica con acido acetil salicílico | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 |
| Matriz biológica con heparina | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 |
| Matriz biológica con edta | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 |
| Matriz biológica lipemica | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 |
| Matriz biológica hemolizada | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 |

IV.2.4 Repetibilidad y Recobro

(Presicion y Exactitud)

| FORMULA: | | | |
|------------------------------|--|----------------------------------|----|
| PROMEDIO | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | COEFICIENTE DE VARIACIÓN | DE |
| $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$ | $s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ | $C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$ | |

| INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL: | |
|---|---|
| n = Número de recobros. | $IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$ |

Criterio de aceptación

La respuesta del método únicamente debe de ser debida al analito.

En esta tabla 14 se observa el análisis de 5 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración baja, preparada de manera individual para evaluar la precisión y repetibilidad del método.

Apartir de las muestras de exactitud y repetibilidad se evalúa el recobro inyectando por quintuplicado una muestra en solución y se evalúa la cantidad recuperada, representada en un porcentaje.

Tabla 14. Exactitud y repetibilidad muestra concentración baja

| IV2.4. 1 MUESTRA DE CONCENTRACIÓN BAJA | | | | | | |
|--|-------------|------------------|---------------------|--|---------------------|--|
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREAS CAPSAICINA | CANTIDAD RECUPERADA | % DE RECOBRO (y) | RECOBRO AL CUADRADO | |
| Estándar | 0.00045 | 0.2985 | 10 | 100 | 10000 | |
| | | 0.3014 | 10 | 100 | 10000 | |
| | | 0.2978 | 10 | 100 | 10000 | |
| | | 0.3035 | 10 | 100 | 10000 | |
| | | 0.2972 | 10 | 100 | 10000 | |
| promedio | 0.00045 | 0.2997 | 10 | 100 | 10000 | |
| m1 | 0.00009 | 0.2152 | 7.18 | 71.82 | 5158.09 | |
| m2 | | 0.2149 | 7.17 | 71.71 | 5142.80 | |
| m3 | | 0.2210 | 7.37 | 73.74 | 5437.47 | |
| m4 | | 0.2176 | 7.26 | 72.60 | 5270.22 | |
| m5 | | 0.2148 | 7.17 | 71.68 | 5137.43 | |
| Sumatoria | | 3.251 | 36.15 | 361.54 | 26146.01 | |
| Cuadrado | | 10.56596043 | 1307.14 | 130714.44 | 683613877.47 | |
| n | | 5 | | | | |
| MEDIA ARITMÉTICA | | | | 72.31 | | |
| Desviación Estándar | | | | 0.88 | | |
| C. V. | | | 1.22 | | | |
| INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MEDIA POBLACIONAL DEL % DE RECOBRO | | | | | | |
| El IC(μ) debe incluir el 100 % ó que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: | | | | | | |
| METODO | | INTERVALO | | El CV del porcentaje de recobro | | |
| CROMATOGRÁFICO | | 60% -100% | | no mayor de 15% | | |

Aquí se observa el análisis de 5 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración Media, preparada de manera individual para evaluar la precisión y repetibilidad del método.

Apartir de las muestras de exactitud y repetibilidad se evalúa el recobro inyectando por quintuplicado una muestra en solución y se evalúa la cantidad recuperada, representada en un porcentaje.

Tabla 15. Exactitud y repetibilidad muestra concentración media

| IV2.4.2 MUESTRA DE CONCENTRACIÓN MEDIA | | | | | |
|--|----------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREAS CAPSAICINA | CANTIDAD RECUPERADA | % DE RECOBRO (y) | RECOBRO AL CUADRADO |
| Estándar | 0.00075 | | | | |
| | | 0.2331 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.2361 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.2298 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.2339 | 10 | 100 | 10000 |
| promedio | 0.00075 | 0.2330 | 10 | 100 | 10000 |
| m1 | 0.00009 | 0.233 | 10 | 100 | 10000 |
| m2 | | 0.1624 | 6.97 | 69.66 | 4852.02 |
| m3 | | 0.1611 | 6.91 | 69.08 | 4771.50 |
| m4 | | 0.1672 | 7.17 | 71.68 | 5138.48 |
| m5 | | 0.1639 | 7.03 | 70.28 | 4939.62 |
| Sumatoria | | 0.1662 | 7.13 | 71.26 | 5077.87 |
| Cuadrado | | 2.462 | 35.20 | 351.96 | 24779.48 |
| n | | 6.061929611 | 1238.74 | 123873.89 | 614022729.03 |
| MEDIA ARITMÉTICA | | 6 | | | |
| Desviación Estándar | | | | 70.39 | |
| C. V. | | | 1.08 | | |
| INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MEDIA POBLACIONAL DEL % DE RECOBRO | | | | | |
| El IC(μ) debe incluir el 100 % ó que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: | | | | | |
| METODO | | INTERVALO | | El CV del porcentaje de recobro | |
| CROMATOGRÁFICO | | 60% -100% | | no mayor de 15% | |

En la siguiente tabla 16 se observa el análisis de 5 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración Alta, preparada de manera individual para evaluar la precisión y repetibilidad del método.

Apartir de las muestras de exactitud y repetibilidad se evalúa el recobro inyectando por quintuplicado una muestra en solución y se evalúa la cantidad recuperada, representada en un porcentaje.

Tabla 16. Exactitud y repetibilidad muestra concentración alta

| IV2.4.3 MUESTRA DE CONCENTRACIÓN ALTA | | | | | |
|--|----------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREAS CAPSAICINA | CANTIDAD RECUPERADA | % DE RECOBRO (y) | RECOBRO AL CUADRADO |
| Estándar | 0.00095 | 0.1424 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.1424 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.1423 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.1384 | 10 | 100 | 10000 |
| | | 0.1406 | 10 | 100 | 10000 |
| promedio | 0.00095 | 0.141 | 10 | 100 | 10000 |
| m1 | 0.00019 | 0.1025 | 7.26 | 72.55 | 5263.52 |
| m2 | | 0.0957 | 6.78 | 67.80 | 4596.17 |
| m3 | | 0.0950 | 6.73 | 67.29 | 4528.05 |
| m4 | | 0.1010 | 7.16 | 71.55 | 5119.92 |
| m5 | | 0.1056 | 7.48 | 74.77 | 5590.79 |
| Sumatoria | | 1.500 | 35.40 | 353.96 | 25098.45 |
| Cuadrado | | 2.248737048 | 1252.89 | 125288.52 | 629932325.29 |
| n | | 6 | | | |
| MEDIA ARITMÉTICA | | | | 70.79 | |
| Desviación Estándar | | | | 3.19 | |
| C. V. | | | 4.51 | | |
| INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MEDIA POBLACIONAL DEL % DE RECOBRO | | | | | |
| El IC(μ) debe incluir el 100 % ó que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: | | | | | |
| | | | | El CV del porcentaje de recobro | |
| METODO | | INTERVALO | | | |
| CROMATOGRÁFICO | | 60% -100% | | no mayor de 15% | |

IV.2.5 Estabilidad a 24 Horas

FÓRMULAS:

Media aritmética de análisis inicial y de cada condición de almacenamiento

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

$n_0 =$ Número de muestras de la nálisis inicial

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$n =$ número de muestras de análisis
– esimo condición de almacenaje

i

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial.

$$|d_i| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0|$$

En la tabla 17 se observa el análisis de 3 muestras plasmaticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado.

Las muestra iniciales se preparan, procesan e inyectan el mismo día de trabajo, una serie (Prueba) se deja en la mesa de trabajo sin procesar y otra serie (Referencia) se coloca en el ultracongelador sin procesar. Trancurridas la 24hrs las muestras de Referencia y prueba se procesan e inyecta para evaluar estabilidad de la muestra a 24hrs a temepertura ambiente y congelación.

Tabla 17. Estabilidad muestra concentración baja

| IV2.5. 1. MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN BAJA | | | | | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|
| | | (INICIAL) | | REFERENCIA (24 Hrs) | | PRUEBA (24 Hrs) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y1) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y1) | AREA (Y2) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y2) |
| ESTANDAR | 0.000 | 0.1089 | 100 | 0.1089 | 100 | 0.1089 | 100 |
| | 09 | 0.1028 | 100 | 0.1028 | 100 | 0.1028 | 100 |
| | | 0.0990 | 100 | 0.0990 | 100 | 0.0990 | 100 |
| PROMEDIO | | 0.104 | 100.00 | 0.104 | 100 | 0.104 | 100.00 |
| m1 | 0.000 09 | | | 0.1061 | 102.44 | 0.0985 | 95.10 |
| m2 | | | | 0.1074 | 103.76 | 0.0988 | 95.43 |
| m3 | | | | 0.1026 | 99.12 | 0.0959 | 92.64 |
| SUMATORIA | | | | 1.265 | 305.32 | 1.173 | 283.17 |
| n_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| y_0 | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 101.77 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 94.39 |

| | |
|---------------------------|-------|
| Promedio | 98.08 |
| Desviación estándar | 4.42 |
| Coefficiente de variación | 4.51 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|-------------|
| Cromatográfico | C.V. ≤ 15 % |

En la tabla 18 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Las muestra iniciales se preparan, procesan e inyectan el mismo día de trabajo, una serie (Prueba) se deja en la mesa de trabajo sin procesar y otra serie (Referencia) se coloca en el ultracongelador sin procesar. Transcurridas las 24hrs las muestras de Referencia y prueba se procesan e inyecta para evaluar estabilidad de la muestra a 24hrs a temperatura ambiente y congelación.

Tabla 18. Estabilidad muestra concentración media

| IV2.5.2 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN MEDIA | | | | | | | |
|---|-------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | | (INICIAL) | | REFERENCIA (24 Hrs) | | PRUEBA (24 Hrs) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| Estándar | 0.00015 | 0.1484 | 100 | 0.1484 | 100 | 0.1484 | 100 |
| | | 0.1683 | 100 | 0.1683 | 100 | 0.1683 | 100 |
| | | 0.1662 | 100 | 0.1662 | 100 | 0.1662 | 100 |
| Promedio | | 0.161 | 100.00 | 0.161 | 100 | 0.161 | 100.00 |
| m1 | 0.00015 | | | 0.1575 | 97.81 | 0.1449 | 90.02 |
| m2 | | | | 0.1567 | 97.31 | 0.1473 | 91.49 |
| m3 | | | | 0.1591 | 98.85 | 0.1478 | 91.84 |
| Sumatoria | | | | 1.893 | 293.98 | 1.760 | 273.35 |
| <i>n</i> ₀ | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| <i>n</i> ₁ | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 97.99 | | |
| <i>n</i> ₂ | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 91.12 |

| | |
|--------------------------|-------|
| Promedio | 94.55 |
| Desviación estándar | 3.85 |
| Coeficiente de variación | 4.07 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|------------|
| Cromatográfico | C.V ≤ 15 % |

En la tabla 19 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Las muestra iniciales se preparan, procesan e inyectan el mismo día de trabajo, una serie (Prueba) se deja en la mesa de trabajo sin procesar y otra serie (Referencia) se coloca en el ultracongelador sin procesar. Transcurridas las 24hrs las muestras de Referencia y prueba se procesan e inyecta para evaluar estabilidad de la muestra a 24hrs a temperatura ambiente y congelación.

Tabla 19. Estabilidad muestra concentración alta

| IV2.5.3 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN ALTA | | | | | | | |
|--|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| ANALITO | CONC. mg/mL | (INICIAL) | | REFERENCIA (24 Hrs) | | PRUEBA (24 Hrs) | |
| | | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00015 | 0.1949 | 100 | 0.1949 | 100 | 0.1949 | 100 |
| | | 0.2002 | 100 | 0.2002 | 100 | 0.2002 | 100 |
| | | 0.2037 | 100 | 0.2037 | 100 | 0.2037 | 100 |
| Promedio | | 0.200 | 100.00 | 0.200 | 100 | 0.200 | 100.00 |
| m1 | 0.00015 | | | 0.1946 | 97.48 | 0.1956 | 98.00 |
| m2 | | | | 0.1959 | 98.13 | 0.2084 | 104.41 |
| m3 | | | | 0.1959 | 98.15 | 0.2103 | 105.36 |
| Sumatoria | | | | 2.345 | 293.76 | 2.457 | 307.76 |
| n₀ | | | | | | | |
| $\frac{y_0}{y_0}$ | | | | | | | |
| n₁ | | | | | 3 | | |
| Ȳ₁ | | | | | 97.92 | | |
| n₂ | | | | | | | 3 |
| Ȳ₂ | | | | | | | 102.59 |

| | |
|-------------------------|--------|
| Promedio | 100.25 |
| Desviación estándar | 3.61 |
| Coficiente de variación | 3.60 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|------------|
| Cromatográfico | c.v ≤ 15 % |

IV.2.6 Tolerancia a cambio de temperatura ($\pm 1^\circ\text{C}$)

FÓRMULAS:

Media aritmética de análisis inicial y de cada condición de almacenamiento

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

$n_0 =$ Número de muestras de la náalisis inicial

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$n_i =$ Número de muestras de la náalisis i -esimo condición de almacenaje

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial

$$|d_i| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0|$$

En la tabla 20 se observa el análisis de 3 muestras plasmaticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalua la tolerancia del método con respecto a la temperatura del horno del método 25°C y sus variaciones 24 y 26°C .

Tabla 20. Tolerancia muestra concentración baja

| IV2.6.1 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN BAJA | | | | | | | |
|--|-------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| Temperatua de Horno | | 25 °C (INICIAL) | | 24 °C (-1 °C) | | 26 °C (+1 °C) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Yo) CAPSAICINA | % RECOBRO (Yo) | AREA (Y1) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y1) | AREA (Y2) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y2) |
| ESTANDAR | 0.00009 | 0.0881 | 100 | 0.0881 | 100 | 0.0881 | 100 |
| | | 0.0859 | 100 | 0.0859 | 100 | 0.0859 | 100 |
| | | 0.0878 | 100 | 0.0878 | 100 | 0.0878 | 100 |
| Promedio | | 0.087 | 100.00 | 0.087 | 100 | 0.087 | 100.00 |
| m1 | 0.00009 | | | 0.0927 | 106.21 | 0.0923 | 105.81 |
| m2 | | | | 0.0941 | 107.83 | 0.0959 | 109.86 |
| m3 | | | | 0.0940 | 107.72 | 0.0879 | 100.75 |
| Sumatoria | | | | 0.562 | 321.76 | 0.552 | 316.42 |
| n_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 107.25 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 105.47 |

| | |
|-------------------------|--------|
| Promedio | 106.36 |
| Desviación estándar | 3.10 |
| Coficiente de variación | 2.91 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|------------------|
| Cromatográfico | C.V. \leq 15 % |

En esta tabla 21. Se observa el análisis de 3 muestras plasmaticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalua la tolerancia del método con respecto a la temperatura del horno del método 25°C y sus variaciones 24 y 26°C en una muestra de concentración media.

Tabla 21. Tolerancia muestra concentración media

| IV2.6.2 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN MEDIA | | | | | | | |
|---|-------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | | 25 °C (INICIAL) | | 24 °C (- 1 °C) | | 26 °C (+ 1 °C) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00015 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 |
| | | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 |
| | | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 |
| Promedio | | 0.152 | 100.00 | 0.152 | 100 | 0.152 | 100.00 |
| m1 | 0.00015 | | | 0.1535 | 100.82 | 0.1554 | 102.06 |
| m2 | | | | 0.1530 | 100.50 | 0.1512 | 99.30 |
| m3 | | | | 0.1590 | 104.44 | 0.1496 | 98.29 |
| Sumatoria | | | | 0.931 | 305.75 | 0.912 | 299.66 |
| n_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| y_0 | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{y}_1 | | | | | 101.92 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{y}_2 | | | | | | | 99.89 |

| | |
|-------------------------|--------|
| Promedio | 100.90 |
| Desviación estándar | 2.16 |
| Coficiente de variación | 2.14 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|------------------|
| Cromatográfico | C.V. \leq 15 % |

En la tabla 22 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalúa la tolerancia del método con respecto a la temperatura del horno del método 25°C y sus variaciones 24 y 26°C en una muestra de concentración alta.

Tabla 22. Tolerancia muestra concentración alta

| IV2.6.3 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN ALTA | | | | | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | | 25 °C (INICIAL) | | 24 °C (-1 °C) | | 26 °C (+1 °C) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00019 | 0.1922 | 100 | 0.1922 | 100 | 0.1922 | 100 |
| | | 0.1990 | 100 | 0.1990 | 100 | 0.1990 | 100 |
| | | 0.1947 | 100 | 0.1947 | 100 | 0.1947 | 100 |
| Promedio | | 0.195 | 100.00 | 0.195 | 100 | 0.195 | 100.00 |
| m1 | 0.00019 | | | 0.1939 | 99.25 | 0.2006 | 102.70 |
| m2 | | | | 0.1828 | 93.58 | 0.2021 | 103.48 |
| m3 | | | | 0.1936 | 99.13 | 0.2002 | 102.50 |
| Sumatoria | | | | 1.141 | 291.97 | 1.206 | 308.68 |
| n_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| y_0 | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 97.32 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 102.89 |

| | |
|---------------------------|--------|
| Promedio | 100.11 |
| Desviación estándar | 3.69 |
| Coefficiente de variación | 3.69 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|-----------------|
| Cromatográfico | c.v \leq 15 % |

IV.2.7 Tolerancia cambio en la SOL. BUFFER ($\pm 1\%$)

FÓRMULAS:

Media aritmética de análisis inicial y de cada condición de almacenamiento

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

$n_0 =$ Número de muestras de la nálisis inicial

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$n_i =$ Número de muestras de la nálisis i - esimo condición de almacenaje

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial

$$|d_i| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0|$$

En la tabla 23 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalúa la tolerancia del método con respecto a la proporción de fase móvil (Solución Buffer 55%) y sus variaciones 54 y 56% en una muestra de concentración baja.

Tabla 23. Tolerancia muestra concentración baja

| IV2.7.1 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN BAJA | | | | | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | | 55 % (INICIAL) | | 54 % (- 1 %) | | 56 % (+ 1 %) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00009 | 0.0881 | 100 | 0.0881 | 100 | 0.0881 | 100 |
| | | 0.0859 | 100 | 0.0859 | 100 | 0.0859 | 100 |
| | | 0.0878 | 100 | 0.0878 | 100 | 0.0878 | 100 |
| Promedio | | 0.087 | 100.00 | 0.087 | 100 | 0.087 | 100.00 |
| m1 | 0.00009 | | | 0.0876 | 100.42 | 0.0881 | 100.96 |
| m2 | | | | 0.0925 | 105.98 | 0.0927 | 106.26 |
| m3 | | | | 0.0916 | 105.01 | 0.0915 | 104.82 |
| Sumatoria | | | | 0.543 | 311.41 | 0.545 | 312.04 |
| n_0 | | | | | | | |
| $\frac{y_0}{y_0}$ | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 103.80 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 104.01 |

| | |
|-------------------------|--------|
| Promedio | 103.91 |
| Desviación estándar | 2.56 |
| Coficiente de variación | 2.46 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|------------|
| Cromatográfico | C.V ≤ 15 % |

En la tabla 24 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalúa la tolerancia del método con respecto a la proporción de fase móvil (Solución Buffer 55%) y sus variaciones 54 y 56%.

Tabla 24. Tolerancia muestra concentración media

| IV2.7.2 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN MEDIA | | | | | | | |
|---|-------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | | 55 % (INICIAL) | | 54 % (- 1 %) | | 56 % (+ 1 %) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00015 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 |
| | | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 |
| | | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 |
| Promedio | | 0.152 | 100.00 | 0.152 | 100 | 0.152 | 100.00 |
| m1 | 0.00015 | | | 0.1560 | 102.49 | 0.1561 | 102.53 |
| m2 | | | | 0.1624 | 106.67 | 0.1622 | 106.58 |
| m3 | | | | 0.1543 | 101.39 | 0.1540 | 101.18 |
| Sumatoria | | | | 0.945 | 310.55 | 0.945 | 310.29 |
| <i>n</i> ₀ | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| <i>n</i> ₁ | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 103.52 | | |
| <i>n</i> ₂ | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 103.43 |

| | |
|---------------------------|--------|
| Promedio | 103.47 |
| Desviación estándar | 2.50 |
| Coefficiente de variación | 2.42 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|-------------|
| Cromatográfico | C.V. ≤ 15 % |

En la tabla 25 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalúa la tolerancia del método con respecto a la proporción de fase móvil (Solución Buffer 55%) y sus variaciones 54 y 56%.

Tabla 25. Tolerancia muestra concentración alta

| IV2.7.3 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN ALTA | | | | | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|
| | | 55 % (INICIAL) | | 54 % (- 1 %) | | 56 % (+ 1 %) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y1) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y1) | AREA (Y2) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y2) |
| ESTANDAR | 0.00019 | 0.1922 | 100 | 0.1922 | 100 | 0.1922 | 100 |
| | | 0.1990 | 100 | 0.1990 | 100 | 0.1990 | 100 |
| | | 0.1947 | 100 | 0.1947 | 100 | 0.1947 | 100 |
| Promedio | | 0.195 | 100.00 | 0.195 | 100 | 0.195 | 100.00 |
| m1 | 0.00019 | | | 0.2010 | 102.90 | 0.2006 | 102.69 |
| m2 | | | | 0.2083 | 106.62 | 0.2083 | 106.62 |
| m3 | | | | 0.2027 | 103.75 | 0.2037 | 104.31 |
| Sumatoria | | | | 1.224 | 313.28 | 1.225 | 313.63 |
| n_0 | | | | | | | |
| $\frac{\sum y_0}{n_0}$ | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 104.43 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 104.54 |

| | |
|---------------------------|--------|
| Promedio | 104.48 |
| Desviación estándar | 1.76 |
| Coefficiente de variación | 1.68 |

| Criterio de aceptación | |
|------------------------|------------------|
| Cromatográfico | C.V. \leq 15 % |

IV.2.8 Tolerancia cambio en la longitud de onda de excitación y de emisión ($\pm 5\text{nm}$).

FÓRMULAS:

Media aritmética de análisis inicial y de cada condición de almacenamiento

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

$n_0 =$ Número de muestras de la náalisis inicial

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$n_i =$ Número de muestras de la náalisis i - esimo condición de almacenaje

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial.

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

En la tabla 26 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalúa la tolerancia del método con respecto a la longitud de onda del método (EX 270nm, Em300nm) y sus variaciones (EX 275nm, Em305_ EX 265nm, Em295nm).

Tabla 26. Tolerancia muestra concentración baja

| IV.2.8.1 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN BAJA | | | | | | | |
|---|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | | EX: 270 nm, EM: 300 nm (INICIAL) | | EX: 275 nm, EM: 305 nm (+ 5 nm) | | EX: 265 nm, EM: 295 nm (- 5 nm) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICIN A | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00009 | 848.322 | 100 | 2383.387 | 100 | 232.326 | 100 |
| | | 843.530 | 100 | 2389.730 | 100 | 231.589 | 100 |
| | | 844.758 | 100 | 2376.666 | 100 | 229.791 | 100 |
| Promedio | | 845.537 | 100.00 | 2383.261 | 100 | 231.235 | 100.00 |
| m1 | 0.00009 | 851.499 | 100.71 | 2407.523 | 101.02 | 231.971 | 100.32 |
| m2 | | 852.979 | 100.88 | 2414.838 | 101.32 | 230.437 | 99.65 |
| m3 | | 845.076 | 99.95 | 2424.874 | 101.75 | 231.706 | 100.20 |
| Sumatoria | | 2549.554 | 301.53 | 7247.235 | 304.09 | 694.114 | 300.18 |
| n_0 | | | 3 | | | | |
| \bar{y}_0 | | | 100.51 | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 101.36 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 100.06 |

$$d1 = 101.36 - 100.51 = 0.85 \%$$

$$d2 = 100.06 - 100.51 = 0.45 \%$$

Criterio de aceptación

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| Cromatográfico y volumétricos | $d_i \leq 2.0 \%$ |
| Químicos ó espectrofotométricos | $d_i \leq 3.0 \%$ |

En la tabla 27 se observa el análisis de 3 muestras plasmaticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalua la tolerancia del método con respecto a la longitud de onda del método (EX 270nm, Em300nm) y sus variaciones (EX 275nm, Em305_ EX 265nm, Em295nm).

Tabla 27. Tolerancia muestra concentración media

| IV2.8.2 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN MEDIA | | | | | | | |
|---|--------------------|---|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| | | EX: 270 nm, EM: 300 nm (INICIAL) | | EX: 275 nm, EM: 305 nm (+ 5 nm) | | EX: 265 nm, EM: 295 nm (- 5 nm) | |
| ANALITO | CONC · mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICIN A | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.0000 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 |
| | 9 | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 |
| | | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 |
| Promedio | | 0.152 | 100.00 | 0.152 | 100 | 0.152 | 100.00 |
| m1 | 0.00009 | | | 0.1560 | 102.49 | 0.1561 | 102.53 |
| m2 | | | | 0.1624 | 106.67 | 0.1622 | 106.58 |
| m3 | | | | 0.1543 | 101.39 | 0.1540 | 101.18 |
| Sumatoria | | | | 0.945 | 310.55 | 0.945 | 310.29 |
| n_0 | | | 3 | | | | |
| $\frac{y_0}{y_0}$ | | | 100.51 | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 101.36 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 100.06 |

$$d1 = 101.36 - 100.51 = 0.85 \%$$

$$d2 = 100.06 - 100.51 = 0.45 \%$$

Criterio de aceptación

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| Cromatográfico y volumétricos | $d_i \leq 2.0 \%$ |
| Químicos ó espectrofotométricos | $d_i \leq 3.0 \%$ |

En la tabla 28 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración preparadas por triplicado. Se evalúa la tolerancia del método con respecto a la longitud de onda del método (EX 270nm, Em300nm) y sus variaciones (EX 275nm, Em305_ EX 265nm, Em295nm).

Tabla 28. Tolerancia muestra concentración alta

| IV2.8.3 MUESTRAS EN CONCENTRACIÓN ALTA | | | | | | | |
|--|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| | | EX: 270 nm, EM: 300 nm (INICIAL) | | EX: 275 nm, EM: 305 nm (+ 5 nm) | | EX: 265 nm, EM: 295 nm (- 5 nm) | |
| ANALITO | CONC. mg/mL | AREA (Y ₀) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₀) | AREA (Y ₁) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₁) | AREA (Y ₂) CAPSAICINA | % RECOBRO (Y ₂) |
| ESTANDAR | 0.00009 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 | 0.1477 | 100 |
| | | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 | 0.1580 | 100 |
| | | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 | 0.1509 | 100 |
| Promedio | | 0.152 | 100.00 | 0.152 | 100 | 0.152 | 100.00 |
| m1 | 0.00009 | | | 0.1560 | 102.49 | 0.1561 | 102.53 |
| m2 | | | | 0.1624 | 106.67 | 0.1622 | 106.58 |
| m3 | | | | 0.1543 | 101.39 | 0.1540 | 101.18 |
| Sumatoria | | | | 0.945 | 310.55 | 0.945 | 310.29 |
| n_0 | | | 3 | | | | |
| \bar{y}_0 | | | 100.51 | | | | |
| \bar{y}_0 | | | | | | | |
| n_1 | | | | | 3 | | |
| \bar{Y}_1 | | | | | 101.36 | | |
| n_2 | | | | | | | 3 |
| \bar{Y}_2 | | | | | | | 100.06 |

$$d1 = 101.36 - 100.51 = 0.85 \%$$

$$d2 = 100.06 - 100.51 = 0.45 \%$$

| Criterio de aceptación | |
|---------------------------------|-------------------|
| Cromatográfico y volumétricos | $d_i \leq 2.0 \%$ |
| Químicos o espectrofotométricos | $d_i \leq 3.0 \%$ |

En la tabla 29 se muestra los parámetros evaluados, criterios de aceptación, resultados obtenidos y dictamen en la validación de la determinación de capsaicina en plasma humano por FLD.

Tabla 29. Resumen de resultados de la validación

| CAPSAICINA EN PLASMA | | | | | |
|--------------------------------------|---|-----------------|---------------------|---|----------|
| Parámetros de desempeño | Criterio aceptación | | Resultados | | Dictamen |
| Adecuabilidad del sistema | C.V. | $\leq 5\%$ | 0.58 | % | cumple |
| Especificidad | la respuesta del método debe ser únicamente debida al analito | | | | cumple |
| Exactitud y Repetibilidad del método | % recobro | 60% - 102% | 72.97 | % | cumple |
| | C.V. recobro | $\leq 15.0\%$ | 1.82 | % | cumple |
| Linealidad del método | r^2 | ≥ 0.98 | 0.9940 | | cumple |
| | IC(\square_1) | incluye 1 | (1778.78 ,1442.21) | | cumple |
| | C.V. x/y | $\leq 2.0\%$ | 0.40 | % | cumple |
| | % recobro | 98% - 102% | 99.40 | % | cumple |
| | C.V. recobro | $\leq 2.0\%$ | 0.81 | % | cumple |
| Estabilidad temp. 2-8°C | di | $\leq 2.0\%$ | 1.065 | % | cumple |
| Estabilidad temp. Ambiente | di | $\leq 2.0\%$ | 0.0905 | % | cumple |
| Tolerancia | C.V. | $\leq 15.0\%$ | 2.16 | % | cumple |
| Robustez temperatura | di | $\leq 5.0\%$ | 2.16 | % | cumple |
| | di | $\leq 5.0\%$ | 2.14 | % | cumple |
| robustez buffer | di | $\leq 5.0\%$ | 2.56 | % | cumple |
| | di | $\leq 5.0\%$ | 2.46 | % | cumple |
| Límite de cuantificación | r^2 | ≥ 0.98 | 0.999 | | cumple |
| | IC(\square_1) | no incluye el 0 | (846.05 ,1296.45) | | cumple |

IV.3. Análisis de voluntarios

Resultados de muestras plasmáticas de voluntarios sanos.

De las tablas 13 a la 27 se presentan los resultados obtenidos de los 14 voluntarios a los cuales se les administro capsaicina oral. Haciendo la observación que no se obtuvo ninguna respuesta al tratar de determinar concentraciones plasmáticas de capsaicina.

IV.3.1 Adecuabilidad del sistema

| FÓRMULAS: | | |
|------------------------------|--|----------------------------------|
| Promedio | Desviación estándar | Coefficiente de variación |
| $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$ | $s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ | $C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$ |

N = número de muestras de contenido/potencia/valoración

Por día de trabajo se inyecta capsaicina en solución, para verificación de que el sistema analítico opera con base a criterios preestablecidos por el proveedor, que permitan asegurar un desempeño óptimo y la confiabilidad de los resultados de un método analítico, como se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 30. Adecuabilidad del sistema

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
| 1 | 0.1250 | 40.338 | 563.77 | 0.071550963 |
| 2 | | 39.968 | 556.17 | 0.071863436 |
| 3 | | 40.666 | 575.76 | 0.070629756 |
| 4 | | 39.961 | 565.18 | 0.070705033 |
| 5 | | 39.667 | 567.99 | 0.06983762 |
| 6 | | 40.187 | 572.16 | 0.070237101 |
| SUMATORIA | | | | 0.42 |
| N | | | | 6.00 |
| PROMEDIO | | | | 0.070803985 |
| DESV. EST. | | | | 0.000771463 |
| % C. V. | | | | 1.089576312 |
| CRITERIOS DE ACEPTACIÓN | | | | |
| CV | | | ≤ 2 % | |

IV.3.2 Linealidad del método

| FÓRMULAS: | | |
|---|---------------------------------------|---|
| Pendiente | Ordenada al origen | Coefficiente de determinación |
| $\beta_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$ | $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$ | $r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$ |

n= número de mediciones (Concentración - Respuesta analítica).

| INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE | | |
|---|------------------|--|
| $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$ | $t_{0.975, n-2}$ | $S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ |
| | | $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$ |

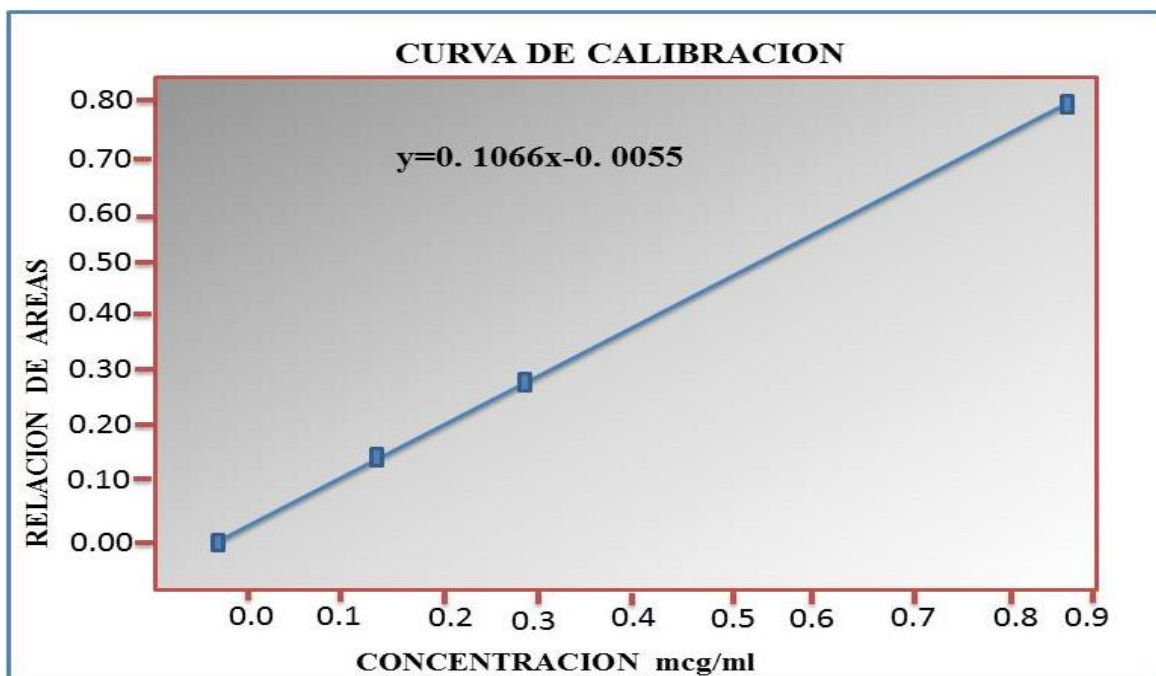
0.975 = Se refiere al valor de t de Student de tablas (Anexo 11)

En la siguiente se tabla se muestra el análisis de 5 muestras plasmáticas de diferente nivel de concentración para la curva de calibración. Se prepara, procesa e inyecta por día de trabajo, el cual se utiliza para la determinación de Capsaicina interpolando las áreas obtenidas de muestras plasmáticas de los voluntarios.

Tabla. 31. Linealidad del método

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | RELACION DE ÁREAS | CONCENTRACION RECUPERADA (µg/mL) | % DESVIACION ABSOLUTA |
|------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0.03 | 13.757 | 321.419 | 0.0428008 | 0.0206869 | 31.04359 |
| 2 | 0.06 | 31.525 | 371.789 | 0.0847927 | 0.0652252 | -8.708619 |
| 3 | 0.12 | 49.521 | 334.341 | 0.1481152 | 0.1323875 | -10.32295 |
| 4 | 0.18 | 73.898 | 397.26 | 0.1860192 | 0.17259 | 4.1166704 |
| 5 | 0.21 | 82.84 | 375.774 | 0.2204517 | 0.2091104 | 0.4236308 |
| Sumatoria | | | 0.682180 | | | |
| Promedio | | | 0.136436 | | | |
| n | | | 5 | | | |
| Pendiente (m) | | | 0.942828 | | | |
| Intercepto (b) | | | 0.023297 | | | |
| Coef. Correl.(r) | | | 0.993165 | | | |

Figura 7. Grafica de linealidad del método



IV.3.3. Muestras de control en plasma

IV.3.3.1 Muestra de concentración media

En la tabla 32 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración baja, preparadas de manera individual. Estas muestras son intercaladas durante el análisis de los voluntarios por día, para evaluar la precisión y repetibilidad del método durante la corrida analítica. (ver Tabla 8. Cronograma de análisis de voluntarios).

Tabla 32. Resultados estadísticos muestra concentración Baja

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] | % DESVIACION ABSOLUTA |
|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0.09 | 47.612 | 408.04 | 0.12 | 0.0991 | -10.06 |
| 2 | 0.09 | 49.686 | 443.225 | 0.11 | 0.0942 | -4.65 |
| 3 | 0.09 | 37.781 | 316.331 | 0.12 | 0.1020 | -13.30 |
| SUMATORIA | | 135.079 | 1167.596 | 0.3482 | 0.2952 | -28.0096 |
| N | | 3 | | | | |
| PROMEDIO | | 45.0263 | 389.1987 | 0.116 | 0.0984 | -9.3365 |
| DESV. EST. | | 6.3598 | 65.5116 | 0.004 | 0.0039 | 4.3663 |

IV.3.3.2 Muestra de concentración media

En la tabla 33 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración Media, preparadas de manera individual. Estas muestras son intercaladas durante el análisis de los voluntarios por día, para evaluar la precisión y repetibilidad del método durante la corrida analítica. (ver Tabla 8. Cronograma de análisis de voluntarios).

Tabla 33. Resultados estadísticos muestra concentración media

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] | % DESVIACION ABSOLUTA |
|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0.15 | 63.271 | 348.914 | 0.1813 | 0.1676 | -11.75 |
| 2 | 0.15 | 61.614 | 344.373 | 0.1789 | 0.1651 | -10.04 |
| 3 | 0.15 | 61.251 | 337.643 | 0.1814 | 0.1677 | -11.80 |
| SUMATORIA | | 186.136 | 1030.93 | 0.5417 | 0.5004 | -33.5860 |
| N | | 3 | | | | |
| PROMEDIO | | 62.0453 | 343.6433 | 0.181 | 0.1668 | -11.1953 |
| DESV. EST. | | 1.0769 | 5.6708 | 0.001 | 0.0015 | 1.0029 |

IV.3.3.3 Muestra concentración alta

En la tabla 34 se observa el análisis de 3 muestras plasmáticas del mismo nivel de concentración Alta, preparadas de manera individual. Estas muestras son intercaladas durante el análisis de los voluntarios por día, para evaluar la precisión y repetibilidad del método durante la corrida analítica.(ver Tabla 8. Cronograma de análisis de voluntarios).

Tabla 34. Resultados estadísticos muestra concentración alta

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y - b)/m] | % DESVIACION ABSOLUTA |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---|-----------------------|
| 1 | 0.19 | 79.726 | 352 | 0.2265 | 0.2155 | -13.43 |
| 2 | 0.19 | 81.184 | 370.734 | 0.2190 | 0.2076 | -9.24 |
| 3 | 0.19 | 78.728 | 347.313 | 0.2267 | 0.2157 | -13.53 |
| SUMATORIA | | 239.638 | 1070.047 | 0.6722 | 0.6388 | -36.2024 |
| N | | 3 | | | | |
| PROMEDIO | | 79.8793 | 356.6823 | 0.224 | 0.2129 | -12.0675 |
| DESV. EST. | | 1.2352 | 12.3927 | 0.004 | 0.0047 | 2.4513 |

IV.3.4 Resultados y cromatograma de voluntarios

Tabla 35. Resultado de voluntario A (todos los tiempos de muestreo) En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario A en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 244.494 | 0.0000 | -0.0283 |
| 2 | 0 | 0 | 249.752 | 0.0000 | -0.0283 |
| 3 | 0 | 0 | 253.202 | 0.0000 | -0.0283 |
| 4 | 0 | 0 | 247.908 | 0.0000 | -0.0283 |
| 5 | 0 | 0 | 240.484 | 0.0000 | -0.0283 |
| 6 | 0 | 0 | 246.18 | 0.0000 | -0.0283 |
| 7 | 0 | 0 | 246.09 | 0.0000 | -0.0283 |
| 8 | 0 | 0 | 309.827 | 0.0000 | -0.0283 |
| 9 | 0 | 0 | 247.144 | 0.0000 | -0.0283 |
| 10 | 0 | 0 | 323.479 | 0.0000 | -0.0283 |
| 11 | 0 | 0 | 251.426 | 0.0000 | -0.0283 |
| 12 | 0 | 0 | 245.809 | 0.0000 | -0.0283 |
| 13 | 0 | 0 | 220.373 | 0.0000 | -0.0283 |
| 14 | 0 | 0 | 266.432 | 0.0000 | -0.0283 |
| SUMATORIA | | | 3592.6 | 0.0000 | -0.3961 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | 256.6143 | 0.0000 | -0.0283 |
| DESV. EST. | | | 27.3256 | 0.0000 | 0.0000 |
| % CV | | | 10.6485 | 0.0000 | 0.0000 |

Figura 6. Cromatograma de voluntario A (tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

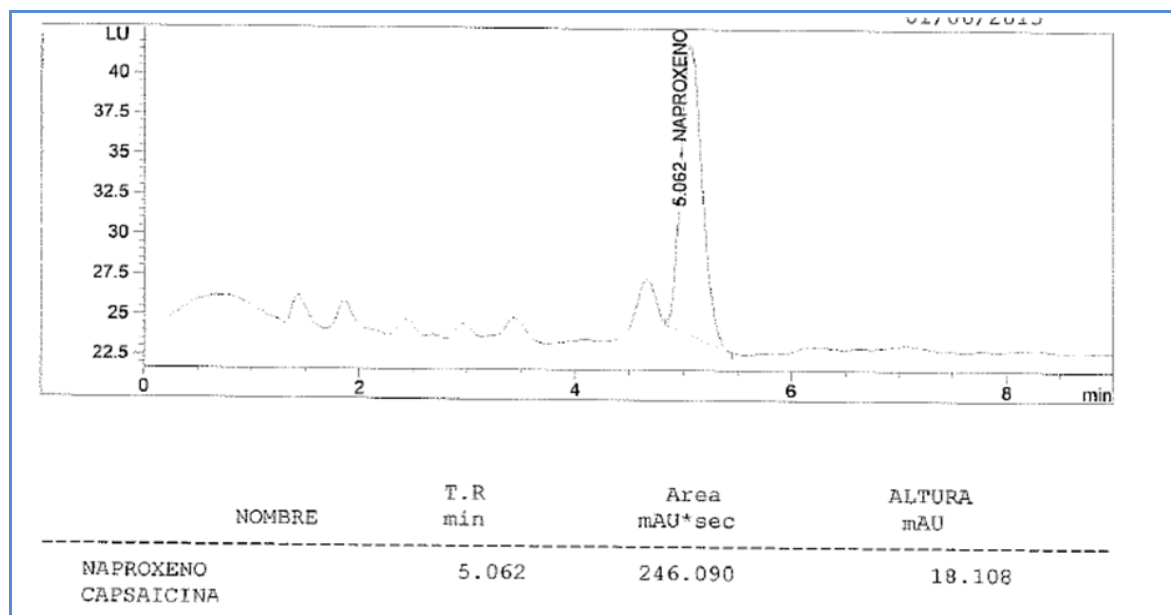


Tabla 36. Resultado de voluntario B

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración extrapolada de capsaicina del voluntario B en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|----------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 225.39 | 0.0000 | -0.0276 |
| 2 | 0 | 0 | 326.682 | 0.0000 | -0.0276 |
| 3 | 0 | 0 | 244.785 | 0.0000 | -0.0276 |
| 4 | 0 | 0 | 284.486 | 0.0000 | -0.0276 |
| 5 | 0 | 0 | 275.526 | 0.0000 | -0.0276 |
| 6 | 0 | 0 | 324.952 | 0.0000 | -0.0276 |
| 7 | 0 | 0 | 258.714 | 0.0000 | -0.0276 |
| 8 | 0 | 0 | 216.413 | 0.0000 | -0.0276 |
| 9 | 0 | 0 | 232.519 | 0.0000 | -0.0276 |
| 10 | 0 | 0 | 296.924 | 0.0000 | -0.0276 |
| 11 | 0 | 0 | 299.577 | 0.0000 | -0.0276 |
| 12 | 0 | 0 | 235.032 | 0.0000 | -0.0276 |
| 13 | 0 | 0 | 318.554 | 0.0000 | -0.0276 |
| 14 | 0 | 0 | 247.695 | 0.0000 | -0.0276 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3787.24 | 0.0000 |
| N | | | A | 9 | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 270.517 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 38.4070 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 14.1976 | 0.0000 |

Figura 7. Cromatograma de voluntario B (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

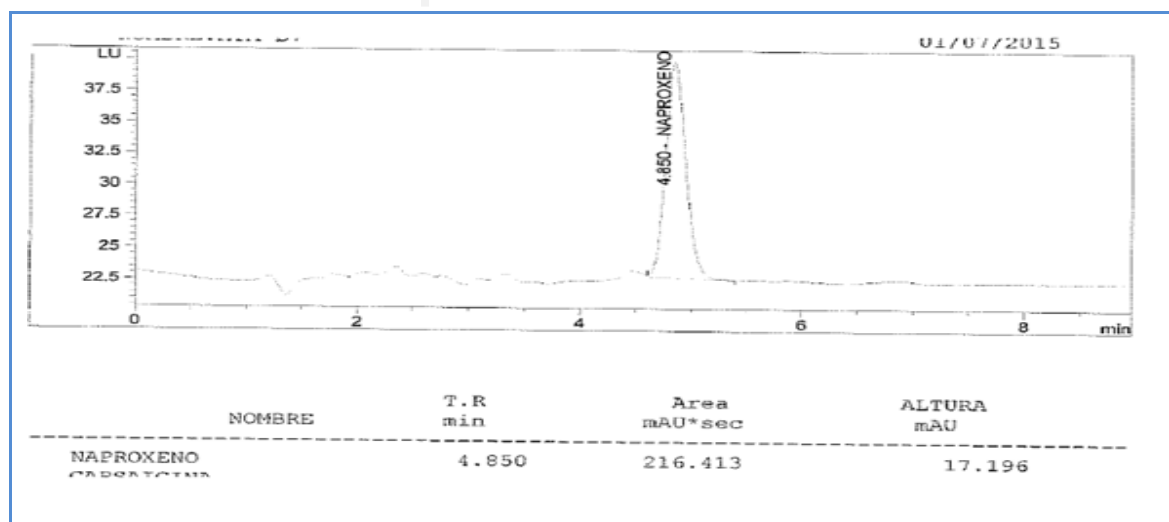


Tabla 37. Resultado de voluntario C

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario C en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 338.267 | 0.0000 | -0.0195 |
| 2 | 0 | 0 | 318.728 | 0.0000 | -0.0195 |
| 3 | 0 | 0 | 316.811 | 0.0000 | -0.0195 |
| 4 | 0 | 0 | 315.817 | 0.0000 | -0.0195 |
| 5 | 0 | 0 | 324.013 | 0.0000 | -0.0195 |
| 6 | 0 | 0 | 320.239 | 0.0000 | -0.0195 |
| 7 | 0 | 0 | 333.362 | 0.0000 | -0.0195 |
| 8 | 0 | 0 | 305.71 | 0.0000 | -0.0195 |
| 9 | 0 | 0 | 334.341 | 0.0000 | -0.0195 |
| 10 | 0 | 0 | 321.1 | 0.0000 | -0.0195 |
| 11 | 0 | 0 | 320.021 | 0.0000 | -0.0195 |
| 12 | 0 | 0 | 246.732 | 0.0000 | -0.0195 |
| 13 | 0 | 0 | 322.337 | 0.0000 | -0.0195 |
| 14 | 0 | 0 | 320.751 | 0.0000 | -0.0195 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 4438.229 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 317.0164 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 21.8709 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 6.8990 | 0.0000 |

Figura 8. Cromatograma de voluntario C (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

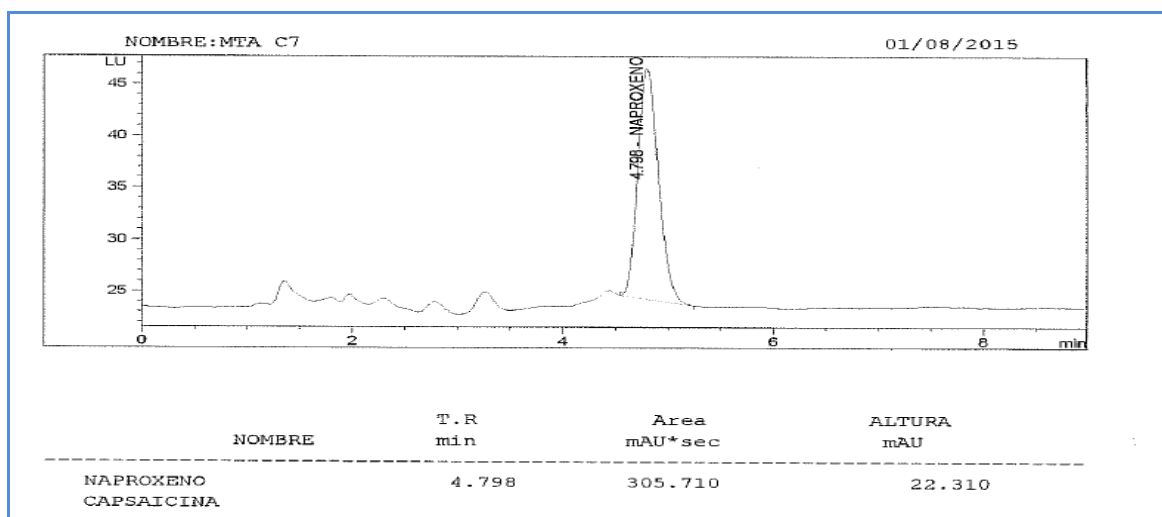


Tabla 38. Resultado de voluntario D

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario D en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 273.081 | 0.0000 | -0.0070 |
| 2 | 0 | 0 | 275.218 | 0.0000 | -0.0070 |
| 3 | 0 | 0 | 314.952 | 0.0000 | -0.0070 |
| 4 | 0 | 0 | 321.507 | 0.0000 | -0.0070 |
| 5 | 0 | 0 | 307.955 | 0.0000 | -0.0070 |
| 6 | 0 | 0 | 275.263 | 0.0000 | -0.0070 |
| 7 | 0 | 0 | 304.254 | 0.0000 | -0.0070 |
| 8 | 0 | 0 | 326.305 | 0.0000 | -0.0070 |
| 9 | 0 | 0 | 306.503 | 0.0000 | -0.0070 |
| 10 | 0 | 0 | 293.767 | 0.0000 | -0.0070 |
| 11 | 0 | 0 | 263.011 | 0.0000 | -0.0070 |
| 12 | 0 | 0 | 293.966 | 0.0000 | -0.0070 |
| 13 | 0 | 0 | 306.696 | 0.0000 | -0.0070 |
| 14 | 0 | 0 | 303.988 | 0.0000 | -0.0070 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 4166.466 | 0.0000 |
| N | | | A | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 297.6047 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 19.3675 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 6.5078 | 0.0000 |

Figura 9. Cromatograma de voluntario D (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

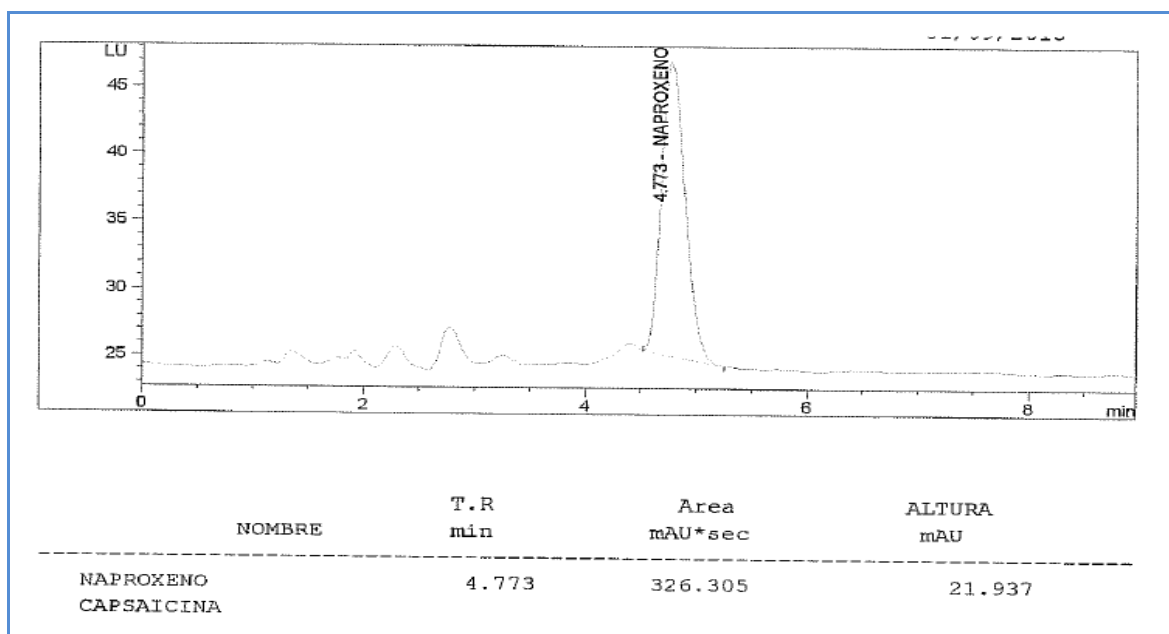


Tabla 39. Resultado de voluntario E

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario E en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 340.625 | 0.0000 | -0.0070 |
| 2 | 0 | 0 | 339.164 | 0.0000 | -0.0070 |
| 3 | 0 | 0 | 316.849 | 0.0000 | -0.0070 |
| 4 | 0 | 0 | 333.075 | 0.0000 | -0.0070 |
| 5 | 0 | 0 | 346.106 | 0.0000 | -0.0070 |
| 6 | 0 | 0 | 318.191 | 0.0000 | -0.0070 |
| 7 | 0 | 0 | 369.888 | 0.0000 | -0.0070 |
| 8 | 0 | 0 | 321.339 | 0.0000 | -0.0070 |
| 9 | 0 | 0 | 360.437 | 0.0000 | -0.0070 |
| 10 | 0 | 0 | 336.516 | 0.0000 | -0.0070 |
| 11 | 0 | 0 | 346.756 | 0.0000 | -0.0070 |
| 12 | 0 | 0 | 316.066 | 0.0000 | -0.0070 |
| 13 | 0 | 0 | 329.438 | 0.0000 | -0.0070 |
| 14 | 0 | 0 | 302.258 | 0.0000 | -0.0070 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 4676.708 | 0.0000 |
| n | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 334.0506 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 18.4562 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 5.5250 | 0.0000 |

Figura 10. Cromatograma de voluntario E (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

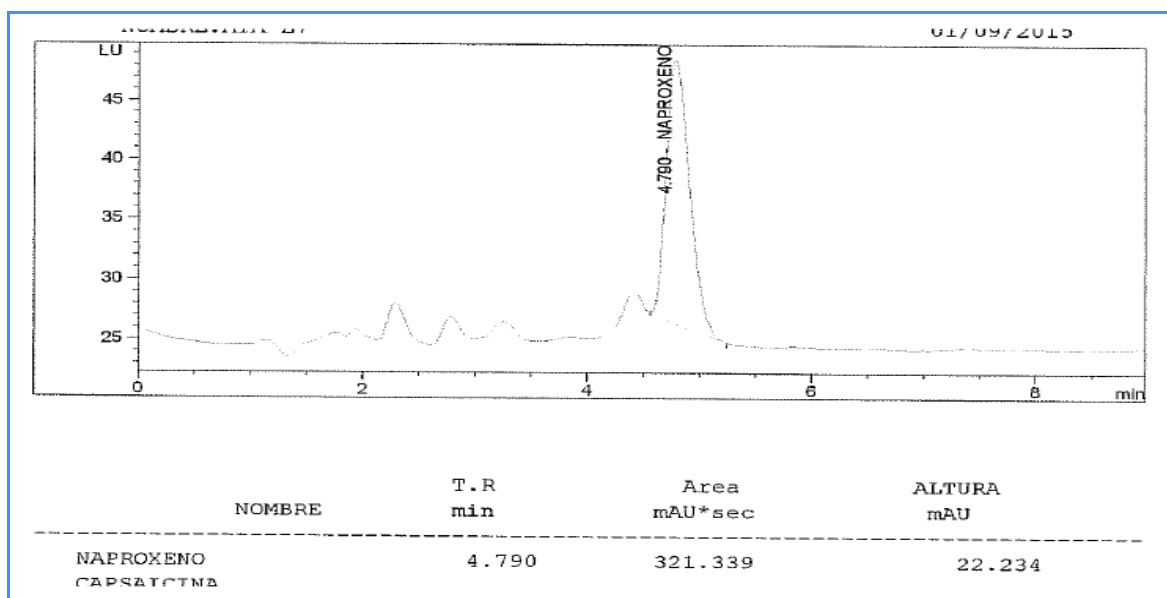


Tabla 40. Resultado de voluntario F

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario F en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 226.547 | 0.0000 | -0.0066 |
| 2 | 0 | 0 | 248.882 | 0.0000 | -0.0066 |
| 3 | 0 | 0 | 187.573 | 0.0000 | -0.0066 |
| 4 | 0 | 0 | 234.082 | 0.0000 | -0.0066 |
| 5 | 0 | 0 | 221.066 | 0.0000 | -0.0066 |
| 6 | 0 | 0 | 209.019 | 0.0000 | -0.0066 |
| 7 | 0 | 0 | 235.42 | 0.0000 | -0.0066 |
| 8 | 0 | 0 | 164.797 | 0.0000 | -0.0066 |
| 9 | 0 | 0 | 239.765 | 0.0000 | -0.0066 |
| 10 | 0 | 0 | 221.792 | 0.0000 | -0.0066 |
| 11 | 0 | 0 | 201.54 | 0.0000 | -0.0066 |
| 12 | 0 | 0 | 247.897 | 0.0000 | -0.0066 |
| 13 | 0 | 0 | 202.692 | 0.0000 | -0.0066 |
| 14 | 0 | 0 | 248.562 | 0.0000 | -0.0066 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3089.634 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 220.6881 | 0.0000 |
| DES. EST. | | | DES. EST. | 25.0466 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 11.3493 | 0.0000 |

Figura 11. Cromatograma de voluntario F (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

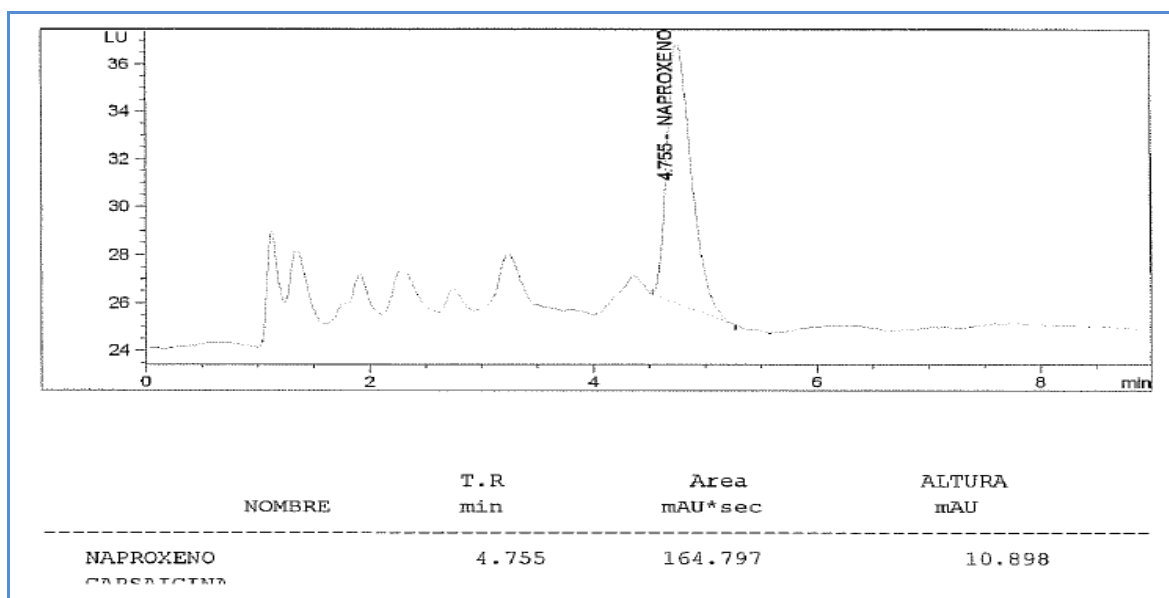


Tabla 41. Resultado de voluntario G

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario G en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/MI) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 287.502 | 0.0000 | -0.0066 |
| 2 | 0 | 0 | 236.494 | 0.0000 | -0.0066 |
| 3 | 0 | 0 | 257.462 | 0.0000 | -0.0066 |
| 4 | 0 | 0 | 257.95 | 0.0000 | -0.0066 |
| 5 | 0 | 0 | 261.746 | 0.0000 | -0.0066 |
| 6 | 0 | 0 | 215.23 | 0.0000 | -0.0066 |
| 7 | 0 | 0 | 234.103 | 0.0000 | -0.0066 |
| 8 | 0 | 0 | 211.589 | 0.0000 | -0.0066 |
| 9 | 0 | 0 | 228.172 | 0.0000 | -0.0066 |
| 10 | 0 | 0 | 263.169 | 0.0000 | -0.0066 |
| 11 | 0 | 0 | 265.711 | 0.0000 | -0.0066 |
| 12 | 0 | 0 | 241.83 | 0.0000 | -0.0066 |
| 13 | 0 | 0 | 241.995 | 0.0000 | -0.0066 |
| 14 | 0 | 0 | 238.553 | 0.0000 | -0.0066 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3441.506 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 245.8219 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 20.9338 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 8.5159 | 0.0000 |

Figura 12. Cromatograma de voluntario G (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

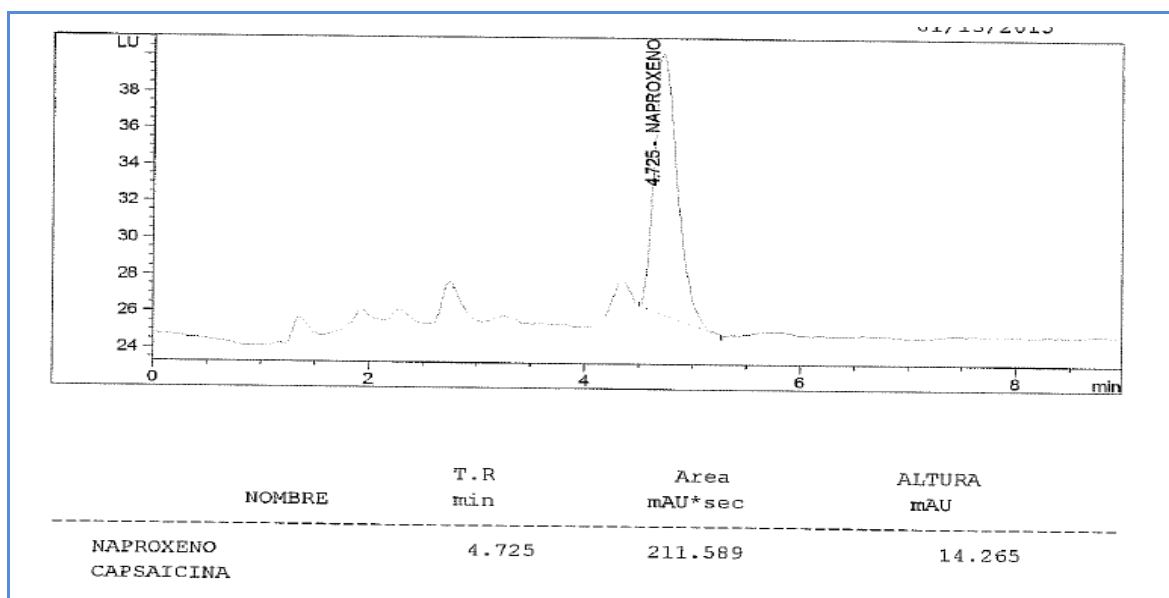


Tabla 42. Resultado de voluntario H

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario H en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 276.701 | 0.0000 | -0.0107 |
| 2 | 0 | 0 | 299.23 | 0.0000 | -0.0107 |
| 3 | 0 | 0 | 269.857 | 0.0000 | -0.0107 |
| 4 | 0 | 0 | 286.434 | 0.0000 | -0.0107 |
| 5 | 0 | 0 | 249.478 | 0.0000 | -0.0107 |
| 6 | 0 | 0 | 354.895 | 0.0000 | -0.0107 |
| 7 | 0 | 0 | 292.606 | 0.0000 | -0.0107 |
| 8 | 0 | 0 | 264.054 | 0.0000 | -0.0107 |
| 9 | 0 | 0 | 219.174 | 0.0000 | -0.0107 |
| 10 | 0 | 0 | 261.356 | 0.0000 | -0.0107 |
| 11 | 0 | 0 | 281.249 | 0.0000 | -0.0107 |
| 12 | 0 | 0 | 269.832 | 0.0000 | -0.0107 |
| 13 | 0 | 0 | 231.365 | 0.0000 | -0.0107 |
| 14 | 0 | 0 | 293.64 | 0.0000 | -0.0107 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3849.871 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 274.9908 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 32.6184 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 11.8616 | 0.0000 |

Figura 13. Cromatograma de voluntario H (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

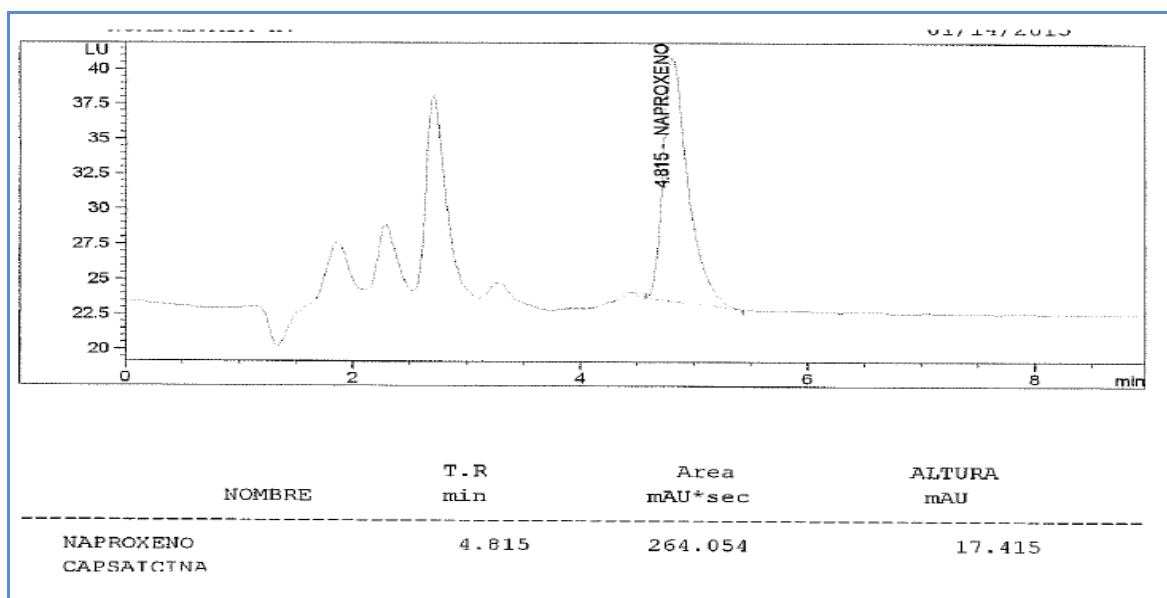


Tabla 43. Resultado de voluntario I

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario I en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 270.429 | 0.0000 | -0.0107 |
| 2 | 0 | 0 | 220.031 | 0.0000 | -0.0107 |
| 3 | 0 | 0 | 270.957 | 0.0000 | -0.0107 |
| 4 | 0 | 0 | 356.093 | 0.0000 | -0.0107 |
| 5 | 0 | 0 | 222.173 | 0.0000 | -0.0107 |
| 6 | 0 | 0 | 238.664 | 0.0000 | -0.0107 |
| 7 | 0 | 0 | 293.6 | 0.0000 | -0.0107 |
| 8 | 0 | 0 | 311.084 | 0.0000 | -0.0107 |
| 9 | 0 | 0 | 253.919 | 0.0000 | -0.0107 |
| 10 | 0 | 0 | 190.672 | 0.0000 | -0.0107 |
| 11 | 0 | 0 | 266.108 | 0.0000 | -0.0107 |
| 12 | 0 | 0 | 285.175 | 0.0000 | -0.0107 |
| 13 | 0 | 0 | 298.355 | 0.0000 | -0.0107 |
| 14 | 0 | 0 | 270.187 | 0.0000 | -0.0107 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3747.447 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 267.6748 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 42.0161 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 15.6967 | 0.0000 |

Figura 14. Cromatograma de voluntario I (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

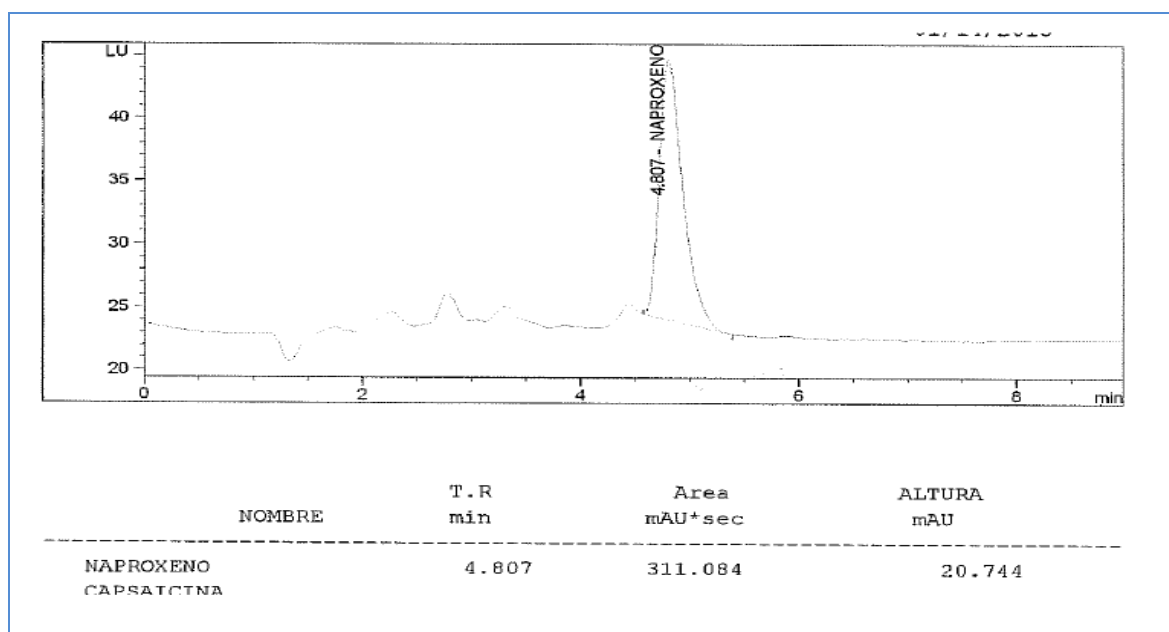


Tabla 44. Resultado de voluntario J

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario J en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 276.402 | 0.0000 | -0.0107 |
| 2 | 0 | 0 | 284.574 | 0.0000 | -0.0107 |
| 3 | 0 | 0 | 269.808 | 0.0000 | -0.0107 |
| 4 | 0 | 0 | 273.949 | 0.0000 | -0.0107 |
| 5 | 0 | 0 | 296.839 | 0.0000 | -0.0107 |
| 6 | 0 | 0 | 249.044 | 0.0000 | -0.0107 |
| 7 | 0 | 0 | 287.06 | 0.0000 | -0.0107 |
| 8 | 0 | 0 | 258.74 | 0.0000 | -0.0107 |
| 9 | 0 | 0 | 311.843 | 0.0000 | -0.0107 |
| 10 | 0 | 0 | 306.888 | 0.0000 | -0.0107 |
| 11 | 0 | 0 | 275.921 | 0.0000 | -0.0107 |
| 12 | 0 | 0 | 221.381 | 0.0000 | -0.0107 |
| 13 | 0 | 0 | 271.266 | 0.0000 | -0.0107 |
| 14 | 0 | 0 | 220.153 | 0.0000 | -0.0107 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3803.868 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 271.7049 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 27.4596 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 10.1064 | 0.0000 |

Figura 15. Cromatograma de voluntario J (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

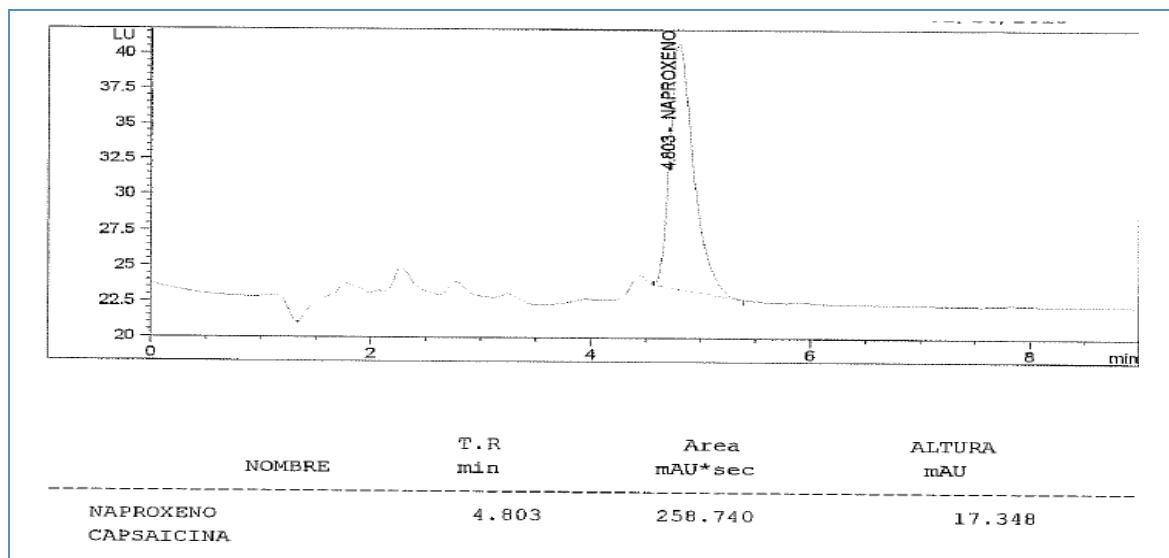


Tabla 45. Resultado de voluntario K

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario K en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 259.112 | 0.0000 | -0.0014 |
| 2 | 0 | 0 | 224.527 | 0.0000 | -0.0014 |
| 3 | 0 | 0 | 271.519 | 0.0000 | -0.0014 |
| 4 | 0 | 0 | 214.407 | 0.0000 | -0.0014 |
| 5 | 0 | 0 | 200.89 | 0.0000 | -0.0014 |
| 6 | 0 | 0 | 211.347 | 0.0000 | -0.0014 |
| 7 | 0 | 0 | 220.069 | 0.0000 | -0.0014 |
| 8 | 0 | 0 | 135.311 | 0.0000 | -0.0014 |
| 9 | 0 | 0 | 220.403 | 0.0000 | -0.0014 |
| 10 | 0 | 0 | 251.418 | 0.0000 | -0.0014 |
| 11 | 0 | 0 | 286.154 | 0.0000 | -0.0014 |
| 12 | 0 | 0 | 258.154 | 0.0000 | -0.0014 |
| 13 | 0 | 0 | 213.972 | 0.0000 | -0.0014 |
| 14 | 0 | 0 | 164.186 | 0.0000 | -0.0014 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3131.469 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 223.6764 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 40.7900 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 18.2362 | 0.0000 |

Figura 16. Cromatograma de voluntario K (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

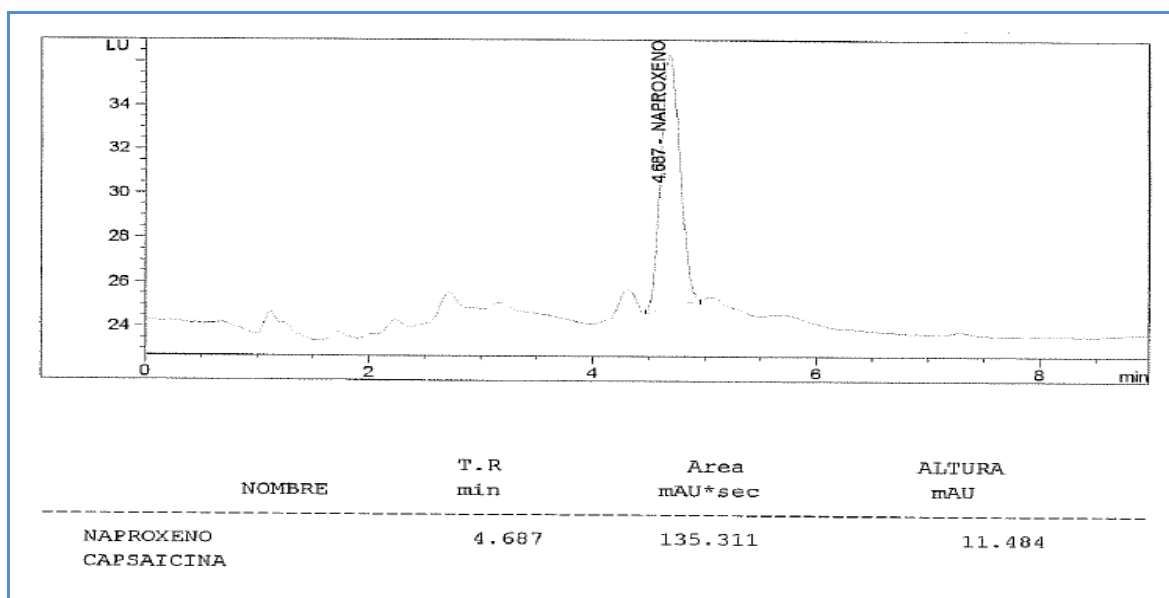


Tabla 46. Resultado de voluntario L

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario L en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 194.461 | 0.0000 | -0.0014 |
| 2 | 0 | 0 | 223.262 | 0.0000 | -0.0014 |
| 3 | 0 | 0 | 214.561 | 0.0000 | -0.0014 |
| 4 | 0 | 0 | 238.496 | 0.0000 | -0.0014 |
| 5 | 0 | 0 | 281.063 | 0.0000 | -0.0014 |
| 6 | 0 | 0 | 271.005 | 0.0000 | -0.0014 |
| 7 | 0 | 0 | 240.658 | 0.0000 | -0.0014 |
| 8 | 0 | 0 | 266.746 | 0.0000 | -0.0014 |
| 9 | 0 | 0 | 244.446 | 0.0000 | -0.0014 |
| 10 | 0 | 0 | 224.417 | 0.0000 | -0.0014 |
| 11 | 0 | 0 | 293.279 | 0.0000 | -0.0014 |
| 12 | 0 | 0 | 279.29 | 0.0000 | -0.0014 |
| 13 | 0 | 0 | 229.519 | 0.0000 | -0.0014 |
| 14 | 0 | 0 | 226.916 | 0.0000 | -0.0014 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3428.119 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 244.8656 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 29.0373 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 11.8585 | 0.0000 |

Figura 17. Cromatograma de voluntario L (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

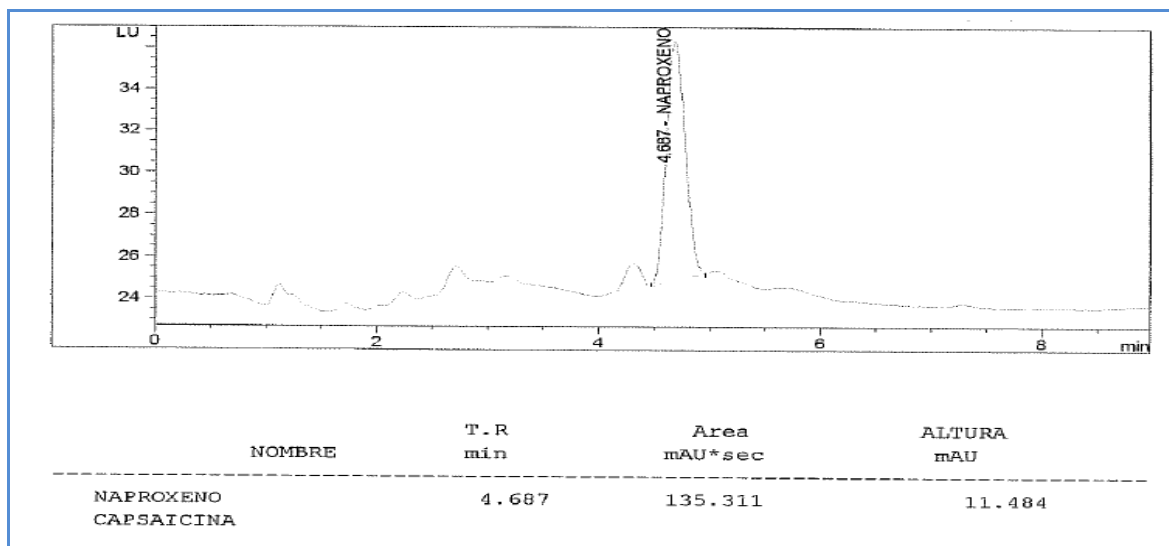


Tabla 47. Resultado de voluntario M

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario M en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 332.564 | 0.0000 | -0.0014 |
| 2 | 0 | 0 | 273.039 | 0.0000 | -0.0014 |
| 3 | 0 | 0 | 276.059 | 0.0000 | -0.0014 |
| 4 | 0 | 0 | 279.126 | 0.0000 | -0.0014 |
| 5 | 0 | 0 | 277.877 | 0.0000 | -0.0014 |
| 6 | 0 | 0 | 201.662 | 0.0000 | -0.0014 |
| 7 | 0 | 0 | 239.063 | 0.0000 | -0.0014 |
| 8 | 0 | 0 | 312.821 | 0.0000 | -0.0014 |
| 9 | 0 | 0 | 296.662 | 0.0000 | -0.0014 |
| 10 | 0 | 0 | 298.03 | 0.0000 | -0.0014 |
| 11 | 0 | 0 | 285.143 | 0.0000 | -0.0014 |
| 12 | 0 | 0 | 290.18 | 0.0000 | -0.0014 |
| 13 | 0 | 0 | 303.508 | 0.0000 | -0.0014 |
| 14 | 0 | 0 | 285.892 | 0.0000 | -0.0014 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3951.626 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 282.2590 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 31.5873 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 11.1909 | 0.0000 |

Figura 18. Cromatograma de voluntario M (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).

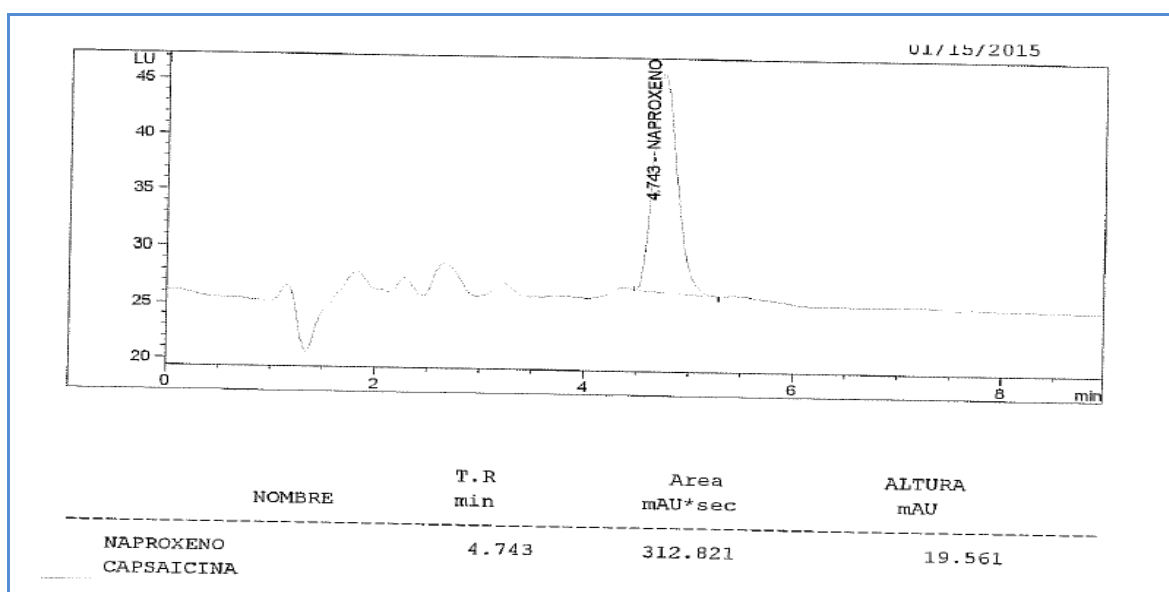
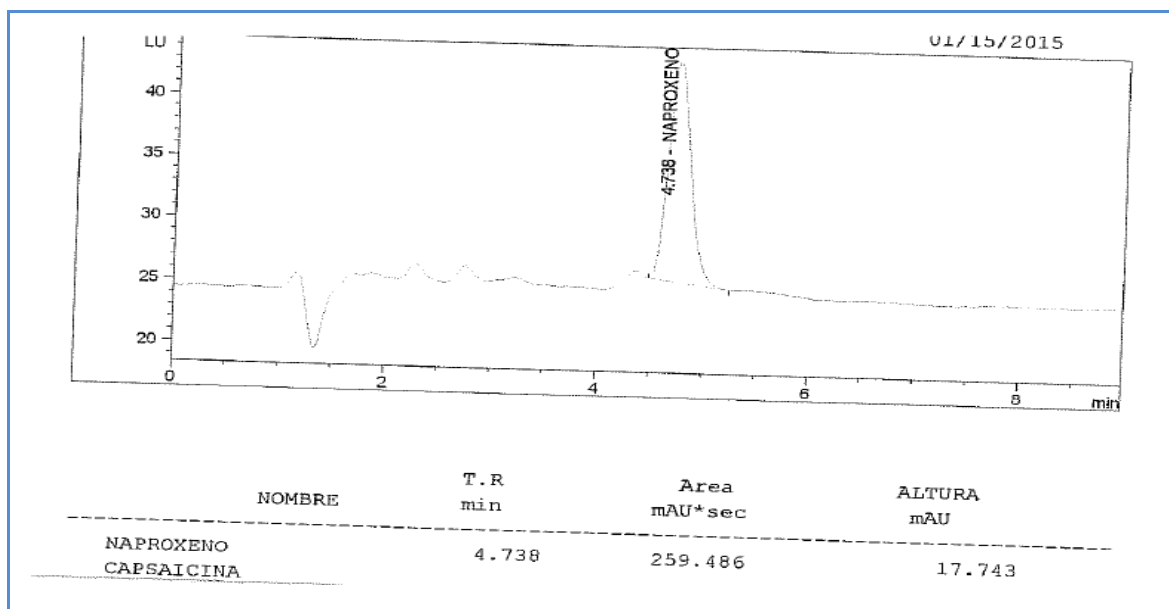


Tabla 48. Resultado de voluntario N

En la siguiente tabla se muestran los resultados de concentración obtenida de capsaicina del voluntario N en todos los tiempos de muestreo.

| DATOS | CONC. ADICIONADA DEL ESTÁNDAR (µg/mL) | ÁREA DEL ESTÁNDAR | ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO | REL. DE ÁREAS | CONC. EXTRAPOLADA µg/mL [X = (Y-b)/m] |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 295.29 | 0.0000 | -0.0014 |
| 2 | 0 | 0 | 280.748 | 0.0000 | -0.0014 |
| 3 | 0 | 0 | 256.8 | 0.0000 | -0.0014 |
| 4 | 0 | 0 | 251.916 | 0.0000 | -0.0014 |
| 5 | 0 | 0 | 257.772 | 0.0000 | -0.0014 |
| 6 | 0 | 0 | 236.745 | 0.0000 | -0.0014 |
| 7 | 0 | 0 | 265.274 | 0.0000 | -0.0014 |
| 8 | 0 | 0 | 259.486 | 0.0000 | -0.0014 |
| 9 | 0 | 0 | 235.854 | 0.0000 | -0.0014 |
| 10 | 0 | 0 | 253.568 | 0.0000 | -0.0014 |
| 11 | 0 | 0 | 281.292 | 0.0000 | -0.0014 |
| 12 | 0 | 0 | 279.523 | 0.0000 | -0.0014 |
| 13 | 0 | 0 | 289.243 | 0.0000 | -0.0014 |
| 14 | 0 | 0 | 302.018 | 0.0000 | -0.0014 |
| SUMATORIA | | | SUMATORIA | 3745.529 | 0.0000 |
| N | | | | | |
| PROMEDIO | | | PROMEDIO | 267.5378 | 0.0000 |
| DESV. EST. | | | DESV. EST. | 20.7724 | 0.0000 |
| % CV | | | % CV | 7.7643 | 0.0000 |

Figura 19. Cromatograma de voluntario N (Tiempo 2.0 hrs de muestreo después de la ingesta oral de capsaicina).



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

V.1 Validación de metodología

Análisis de Datos

Por cada día de trabajo se incluyó en la corrida analítica Adecuabilidad del sistema y Curva de calibración. El método demostró ser Lineal ($r^2 = 0.9999$), Exacto ($CV = 0.26$) y Reproducible ($CV = 0.72$ inter-días y con diferente analista).

La prueba de especificidad demostró que no hay Interferencia en compuestos endógenos y exógenos. La estabilidad en solución demostró ser estable por al menos 8 días en los días de duración de la Validación de capsaicina con un coeficiente de variación menor del 2.0%. El método demostró ser robusto en los cambios realizados, coeficientes de variación menor al 3.0%. Con base en los resultados obtenidos en cada parámetro de desempeño se aprueba la validación del método por Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia, para la determinación ó Valoración de Capsaicina en plasma Humano.

V.2 Análisis de voluntarios

Por cada día de trabajó se preparó: Adecuabilidad del sistema C.V. menor del 2%, Curva de Calibración r^2 mayor 0.99 y muestras control con una desviación Absoluta menor del 15% Con respecto a los resultados obtenidos en la prueba de valoración por método CLAR-FLD para la determinación de Capsaicina en plasma humano no se obtuvo respuesta del análisis de 14 muestras por Voluntario sano, por lo que no se determinó capsaicina en plasma humano.

Para descartar algún error en el proceso analítico se incluyó en la corrida analítica muestras control (muestras a concentración Baja, Media y Alta) intercaladas con las muestras de los voluntarios por día de análisis. Las muestras control cumplen con criterios de aceptación. Creemos basado en los resultados obtenidos que la administración de ranitidina IV fue un factor que bloqueó al receptor TPRV1 y antagonizó la absorción de capsaicina la cual no permitió realizar cálculos de parámetros farmacocinéticos.

V.3 Administración de la tableta de capsaicina

Se concluye que la administración oral en presentación oral de tabletas no es una alternativa para prescribir capsaicina, pues todos los voluntarios manifestaron dolor epigástrico de leve a grave. Se confirma que capsaicina presenta una buena absorción local la cual favorece a una depletación masiva de neuropeptidos en forma regional la cual origina una hiperexcitación de terminaciones dolorosas locales que explican el dolor presentado por todos los voluntarios.

Este dolor la pirosis y náuseas están asociados a la estimulación de los receptores TPRV1 que se encuentran en la región de tercio inferior de esófago y parte alta de estómago. Al tratar de determinar concentraciones plasmáticas no fue posible esto debido a los siguientes factores.

Por las manifestaciones clínicas de dolor epigástrico se administró ranitidina el cual es un antagonista de los receptores H₂ de la histamina en células parietales de estómago.

Esto abre la oportunidad de que los receptores TRPV1 fueron también antagonizados por la ranitidina, y otra que estos receptores que promueven inflamación neurogenica por la liberación de neuropeptidos específicamente el P fue tan masiva a nivel local que origina una reacción inflamatoria tan intensa que evito la absorción sistema de capsaicina, un ejemplo de esto es el voluntario que se manejó con prednisona.

Se realizara otro ensayo clínico con capsaicina en voluntarios sanos pero se elaborara una presentación farmacéutica basada en un sistema de liberación controlada. Las nano partículas lipídicas protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, presentan una mejor biodisponibilidad y podrían ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua, al incorporarlas en la matriz lipídica sólida.

La neuropatía diabética por su etiología multifactorial es de esperarse que el manejo de la misma sea muy complejo, puesto que se deben de abordar líneas de manejo que incluyan desde los aspectos nutricionales, psicológicos y farmacológicos. En este tenor el manejo farmacológico debe de ser muy amplio pues no nada más se maneja el control de las glucemias que ya se ha visto que es esencial, sino el manejo del dolor, el cual presenta un aspecto de tipo subjetivo. En casos de neuropatía dolorosa esta puede producir un dolor intenso e invalidante.

Se están investigando medios farmacológicos en este momento tales como factores de crecimiento nervioso y otros que posiblemente puedan utilizarse en los próximos años. Sí se han producido notables avances en el control del dolor asociado a algunos de estos casos, que en ocasiones es de una intensidad altísima y no responde a medidas habituales.

Razón por la cual debemos de buscar alternativas con principios activos como la capsaicina la cual presenta un mecanismo de acción muy preciso mediante la depletación de neuropeptidos asociados íntimamente con la transmisión del dolor. Sin embargo se requiere de más estudios para determinar si capsaicina administrada por vía oral es efectiva para tratar neuropatía dolorosa analizando su indicación terapéutica para este rubro.

REFERENCIAS

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2010. *Diabetes Care* 2010; 33(Suppl. 1):S11–S61
- Attuquayeffio V.K, Buckle K.A, Rapid sample preparation, method for HPLC analyses of capsinoids in capsicum fruits and oleoresins. *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 777-779
- Bansal V, Kalita J, Misra UK. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J.* 2006; 82(964):95-100.
- Bernaard, K, Ubakata, R, Mihara, Y, Sato, H, Nemoto. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XI: Pharmacokinetics and tissue distribution study of 14-c dihydrocapsiate and metabolites in rats. *Intern. J. of Toxicol.* 2010, 29: 3S.
- Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, et al. Studies of the toxicological potential of capsinoids IX: teratology studies of dihydrocapsiate in rats and rabbits. *Int. J. of Toxicol.* 2008; 27(suppl 3):119-136
- Bode A, Dong Z. The two faces of capsaicin. *American Association for Cancer Research. Cancer Res* 2011; 2809-2814
- Buenrostro M. y Barros C. Chile. *Cuadernos de Nutricion.* 2001 (24) 6: 255-259
- Cameron NE, Cotter MA. The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications. *Diabetologia* 10:1994: 189-224
- Capsaicina 8% parches en dolor neuropático periférico. Informe para la Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía. 30/06/2011
- Chad D, Aronin N, Lundstrom R, McKenon P, Moltich M et al. Does capsaicin relieve the pain of diabetic neuropathy? *Pain* 1990; 42:387-388
- Chhabra N., Aseri ML., Goyal V., and Sankhla S. Capsaicin: A promising therapy-A critical reappraisal. *Inter. Jou. Nut: Vol. 2, Issue 1, 2012: 8-15*
- Chhabra N., Aseri ML., Goyal V., Sankhla S. Capsaicin: A promising therapy. A critical reappraisal. *Inter. Jou. Nut: Vol. 2, Issue 1, 2012: 8-15,*
- Clinical Policy Bulletin: Diabetic Neuropathy: Selected Treatments http://www.aetna.com/cpb/medical/data/700_799/0729.html Consultado; Agosto 2012
- Consensus statement Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetes neuropathy. *American Diabetic Association. American Academy of Neurology. Diabetes Care* 1988. 1159-597. 597

Diabetes care, ADA, 1988, Thomas PK, Review, Pub Med, 1997, Said G, Diabetes Care, Suppl. 2010

DendaM, Fuziwaras.InoueK.Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin barrier homeostasis.J Invest Dermatol 2003; 121(2):362-367.

De WittD.The nature of capsaicin.<http://www.fieryfoods.com/dave/capsaicin.asp>

EdwardsJE, VincentAM, ChengHT, FeldmanEM.Diabetic Neuropathy: Mechanisms to management.Pharmacology & Therapeutics.Vol.120: Issue 1; 2008; 1-34

FreemanR, Durso-DecruzE, EmirB.Efficacy, safety and tolerability of pregabalin treatment for painful diabetic peripheral neuropathy: findings from seven randomized, controlled trials across a range of doses. Diabetes Care 2008;31:1448-1454.

Garcia CM., GuzmanF., MoraE., BuitragoG., Reyes LE., GomezA.Capsaicin intravesical: una alternativa en pacientes con vejiga hiperactiva idiopática de difícil manejo.Revista Med. 2005 13(1) : 70-74

Garcia CM., GuzmanF., MoraE., BuitragoG., ReyesLE., GomezA.Capsaicin intravesical: una alternativa en pacientes con vejiga hiperactiva idiopática de difícil manejo.Revista Med. 2005

GarciaMA., Ruelas X., Hernandez M., RebolosoO.Determinación de compuestos capsaínicos en salsas tradicionales de Saltillo, Coah. PENDIENTE

Gomez A., MelucciJC., QuirogaP., MandrileE.Capsaicin.Acta Farm.Bonarense 1995 14(1):63-70

Harati Y, GoochC, Swanson M et al. Aintence of the long term effectiveness of tramadol in treatment of the pain of diabetic neuropathy.JDiabetes Complications 2000 ;14 ;65 70

HelyesZs, ANemeth, JJakab, BPinter, EBanvolgyi, AKKereskai, JSzolcanyi. Anti-inflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat.Arthr.Rheuma.50,1677-1685,2004.

Herman WH, KennedyL. For the GOAL AIC study group. Physician perception of neuropathy in a large diabetes type 2 population (GOAL AIC study) confirms under diagnosis of neuropathy in everyday clinical practice.Diabetologia 2003.46(suppl 2)A71

HolzerP.Capsaicin: Cellular Targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurons.Pharmacologic Reviews: Vol. 43.No.2; 1991, 143-201

Jie Lu, Michael Cwik (1997) Determination of capsaicin and zucacapsaicin in human serum by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection. University of Illinois at Chicago. 701: 135-139

Journal of Neurology, Neosurgery&Psichiatriy 2003; 74:ii3-ii8
doi:10.1136/jnnp.74.suppl_2_ii3

JSzolcsanyi.Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology.Neropeptide 38. (2004) : 377-384.Elsevier

KennedyWR.Wendelshafer-CrabbG, JohnsonT.Quntitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. Neurology 1996.471042-1048.1048

KodamaT, WatanabeE, Tsubuku S, et al.Studies of the toxicological potential of capsinoids, VII. A 13-week gavage toxicity study of dihydrocapsiate in rats.Int.J.of Toxicol.2008; 27(suppl 3); 79-100

LindsayRM, HarmarAJ, Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons.Nature 1989; 337:362-4.

LunnMP, HughsRA, WiffenPJ.Duloxetine for treating painfull neuropathy or chronic pain. Cochrane Database Syst Rev 2009; 7:CD007115

Macho A, CalzadoM, Muñoz-Blanco J, Gomez-Diaz C, GajateC, MollineidoF, NavasP, MuñozE.Selective induction of apoptosis in transformed cells: the role of recative oxygen and calcium. Cell death and Differentiation (6): 1999; 155-165.<http://www.stocktonpress.co.uk/cdd>

McCartneyCJ, SinhaA, Katz J.A qualitivesystemativ review of the role N methyl D aspartate receptor antagonist in preventive analgesia. AnesthAnalg 2004; 98; 1385 1400

McQuay H,CarrolD,Jadad AR et al.Anticonvulsant drugs for the management of pain A systematic review.BMJ 1995: 311; 1047 1052

McQuayH, TramerM, Nye BA. Systematic review antidepressants in neuropathic pain. Pain 1996; 68; 217 227

MillerMS, BuckSH, SipesIG, YamamuraHI, BurksTF.Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. Brain Res 1982; 250:193-6.

Moznik GY, VinczeA, SzocsanyiJ.Four response of capsaicin sensitive primary afferent neurons to capsaicin and its analogs. Gastric acid secretion, gastric mucosa; damage and protection.J.Gastroenterol.Hepatol.2001;16: 193-197

NolanaM, SimoneDA,WandelschaferCrabbG, JohnsonTHazenE, and KennedyWR.Topicalcapsicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. Pain 1999; 81:135-45.

NOM-177-SSA 1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse terceros autorizados que realicen las pruebas.

NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.

OyagbemiAA, SabaAB, AzeezOI.Capsicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying mechanism of action. Indian J Cancer.2010; 47:53-8

OyagbemiiA, SabaAB, AzeezOI.Capsaicin: a novel chemo preventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. Indian J Cancer 2010;47: 53-58

PamplonaRJ.Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo. Tratado de Bromatología y Dietoterapia.2004 :340

PeierAM,ReeveAJ,AnderssonDA,MoqrichA,EarleyTJ,HergardenAC,StoryGM,ColleyS,Ho geneschJB,McIntyre P et al:Ahett-sensitive TRP cannel expressed in keratinocytes.Sciencie 2002,296(5575):2046-2049

Pershing LH.;Reilly CA.; Corlett JL.; Crouch DJ.:Effects of vehicule on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo.Toxicol.Appl.Pharmacol.200,2004,73-81

Petruzzi M, Lauritano D, De Benedittis M, Baldoni M, and Baldoni M, Serpico R. Systemic capsaicin for burning mouth syndrome: short-term results of a pilot study. J Oral PatholMed2004; 33: 111-4.

Qinghao Zhang, Jimping Hu, Li Sheng , Yan Li Simultaneous quantification of capsaicin and dihidrocapsaicin in rat plasma using Hplc Coupled with tandem mass spectrometry.(2010)Peking Union Medical College, Beijing 100050, china 878:2292-2297

Quatraro A, Roca P, Donzella C, Acampora R, Marfella R, GiuglianoD.Acetyl-l-carnitineforsymptomaticdiabeticneuropathy.Diabetologia 38: 1995 : 123

Revista International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V.doi:10.1016./j.pain.2004.12.010

Revista International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V.doi:10.1016./j.pain.2004.12.010.

Said G. Diabetic neuropathy--a review. *Nat ClinPract Neurol.* 2007 Jun;3(6):331-40. Review. PubMed PMID: 17549059.

SartoT,Wiffin PJ. Antideressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD005454

SchefflerNM,SheitelPL,LiptonMN.Treatmente of painful diabetec neuropathy with capsaicin 0.075%.*J Am Podiatr Med Assoc* 1991; 81 (6): 288-293

SonnettTE,SetterSM,CampbellRK.Pregabalin for the treatment of painfullneuropathy.*Expert Rev Neurother* 2006;6:1629 1635

SuhrYJ,LeeSS.Capsaicin, a double-edged sword:Toxicity,metabolism and chemopreventpotential.*LifeSci* 1995;1845-5531.

Suresh D.:SrinivassanK.;Tissue distribution and eleimination of capsaicin,piperine and curcumin following oral intake in rats.*IndianJ.med Res.*2010;131,682-691

SuzikiYJ,Tsuchiya M, Packer L.Thiocitic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants wich interact with reactive oxygen species.*Free Rad Res Comms* 15:1991:255-263

JSzolcsanyi.Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology.*Neropeptide* 38. (2004) : 377-384.Elsevier

Szolcsanyi J,BarthoL.Impared defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin-desensitized rat.*Advanced in Physiological Sciences Vol.29,Gastrointestinal Defense Mechanism,Mozsik,Hanninan,Javor (Eds)1981,39-51.Pergamon Press,Oxford-AkademiaiKiado,Budapest*

Szolcsanyi J.Capsaicin sensitive chemoprotective neural system with dual sensory-afferent function.*SzolcsanyiJ,Lembeck F. (Eds) Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation.1984,27-56.Akademiai Kiado,Budapest*

T.Takanohashi,M.Isaka,K.Ubakata,RMihara,B.Bernard.Studies of the toxicological potential of capsinoids , XIII:Inhibitory effects of capsicin and capsinoids on Cytochrome P450 in human liver microsomes.*Intern.J.ofToxicol* ,2010 ,29: 22S.

Tandan R, LewisG, KrusinskiP, BadgerG, TimothyJ.Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy:effect on sensory function.*Diabetes care* 1992 ; 15(1) : 8-14

TandanR, LewisG, BadgerG, TimoJ.Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy: effect on sensory function. *Diabetes Care* 1992 ; 15(1) : 15-18

Tesfaye S., Boulton A., Dyck P., Freeman R., Kempler P., Lauria G., Malik R., Spallone V., Vinik A., Bernardi L., Valensi P., Diabetic Neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity and treatments. *Diabetes Care*, Volume 33, Number 10, October 2010

The capsaicin study group. Effect of treatment with capsaicin on daily activities of patients with painful diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1992; 15: 159-165

The capsaicin study group. Effect of treatment with capsaicin on daily activities of patients with painful diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1992; 15: 159-165

T. Kodama, T. Masuyama, T. Kayara, S. Tsubuku, T. Ohishi, B. Wagner, B. Bernard. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XIV: A 26-week gavage toxicity study of dihydrocapsiate in rats. *Intern. J. of Toxicol.*, 2010, 29: 27S.

The capsaicin study group. Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin: a multicenter, double-blind, vehicle-controlled study. *Arch Intern Med* 1991; 151: 2225-2229

Thomas PK. Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes*. 1997 Sep; 46 Suppl 2: S54-7. Review. PubMed PMID: 9285500.

Tornalley PJ. Glycation in diabetic neuropathy: Characteristics, consequence, causes and therapeutic options. *International Review of Neurobiology*. Vol .50, 2002: 37-57

The Index Merck, Encyclopedia of chemicals, drugs and biological, thirteenth edition, Page. 403, 2001.

USP 28 NF 23. United States Pharmacopeia convention Inc. Canadá 2001.

Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. Edición 2002.

Watanabe E, Kodama T, Masuyama T, Tsubuku S, Nakajima M, Bernard B. Studies of the potential of capsinoids: VI. Single-Dose toxicity study and micronucleus test of commercial-grade dihydrocapsiate. *Int. J. of Toxicol.* 2008; 27: 73-76.

Welke E, Fleischer E, Petsche U, Handwerker HO. Afferent C-fibers in rats after neonatal capsaicin treatment. *Pflugers Arch* 1984; 400: 66-71

Wiffen P, Collins S, McQuay H et al. Anticonvulsant drug for acute and chronic pain. *Cochrane Database Systrev*: 2005; 20 : CD 001133

Winter J, Forbes CA, Stemberg J, Lindsay RM. Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron response to the excitoincapsaicin. *Neuron* 1988; 1: 973-81.

Winter J, Beaven S, Campbell E, Capsaicin and pain mechanism.BrJ.Anaesth.1995;
75:157-168

ANEXOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

"2014 AÑO, DE OCTAVIO PAZ"

Tijuana Baja California, 05 de Noviembre del 2014

Oficio No. 1423/2014-2

M.C GILBERTO QUIÑONES PALACIOS

Presente.-

Por medio de este conducto, me permito informarle que se sometió a revisión a la Comisión de Bioética de esta Facultad, la revisión del proyecto de investigación titulado "ESTUDIO PILOTO CLÍNICO FASE I PARA EVALUAR LOS ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DE CAPSAICINA TABLETAS DE 7.5 MG EN SUJETOS DE INVESTIGACIÓN SANOS DE AMBOS GÉNEROS BAJO CONDICIONES DE AYUNO", el cual tuvo como resultado un dictamen APROBATORIO (se anexa).

Sin más por el momento, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"


DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ
DIRECTOR



C.c.p.- Dra. Adriana C. Vargas Ojeda.- Coord. Posgrado e Investigación FMP
C.c.p.- Dirección
mca

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
Comité de Bioética

Tijuana, Baja California a 4 de Noviembre del 2014.

DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ
DIRECTOR FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
PRESENTE.

Por medio del presente y aprovechando para extenderle un cordial saludo se le notifica que, después de revisar la solicitud de revisión del proyecto de investigación con título:

“Estudio piloto clínico Fase I para evaluar los aspectos farmacocinéticos de capsaicina tabletas de 7.5mg en sujetos de investigación sanos de ambos géneros bajo condiciones de ayuno.”

I.P.: M.C. Gilberto Quiñones Palacios

en comisión específica integrada por la Lic. Psic. Diana Lizeth García y por su servidor Dr. Miguel Ángel Fraga Vallejo, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología, ha decidido el siguiente dictamen:

APROBADO

Los fundamentos para dicha decisión se basan en que es un proyecto clasificado “Categoría III. Con riesgo mayor que el mínimo” de acuerdo al Artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud por haber cumplido con las características para dicho nivel, además de cubrir los requisitos de privacidad y respeto a los sujetos en investigación durante todo el proceso y manejo de la información. Así mismo, el consentimiento informado reúne los requisitos señalados en el Art. 21 de dicha Ley. Por llevarse a cabo con estudiantes universitarios como sujetos de investigación, la terminología del CI es pertinente a dicho grupo y se requiere no reciban ningún tipo de compensación o incentivo académico por su participación.

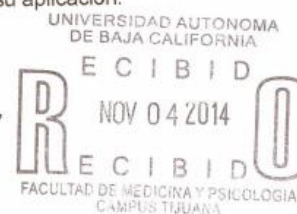
La presente aprobación es para su aplicación en un período no mayor a **DOS AÑOS** a partir de la fecha del dictamen. Para mantener la vigencia del mismo, se requiere entregar a este Comité de Bioética por escrito y en forma inmediata, reporte detallado de incidentes sucedidos en perjuicio de sujetos en investigación. A la vez, cualquier cambio al protocolo requiere de notificación también por escrito antes de su aplicación.

Sin más por el momento, quedo de Usted como su S.S.



Atentamente
“Por la Realización Plena del Hombre”

Dr. Miguel Ángel Fraga Vallejo
 Comité de Bioética FMyP

C.c.p. Archivo Comité de Bioética / D102



ANEXO 3. Formato de reacciones adversas

| | | |
|---|--|---|
|  | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios AVISO DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS DE MEDICAMENTOS |  |
| No. DE INGRESO (USO EXCLUSIVO DE LA COFEPRIS) | No. RUPA | SALUD |
| ANTES DE LLENAR ESTE FORMATO LEA CUIDADOSAMENTE EL INSTRUCTIVO, LA GUÍA Y EL LISTADO DE DOCUMENTOS ANEXOS. LLENAR CON LETRA DE MOLDE LEGIBLE O A MÁQUINA O A COMPUTADORA | | |
| 1 AVISO DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS DE LOS MEDICAMENTOS: | | |
| No. DE NOTIFICACIÓN (de acuerdo a origen) | No. DE NOTIFICACIÓN (general) | No DE NOTIFICACIÓN (laboratorio) |
| 2 DATOS DEL PACIENTE: | | |
| INICIALES DEL PACIENTE | FECHA DE NACIMIENTO | EDAD |
| | AÑO MES DÍA | AÑOS MESES |
| | | SEXO |
| | | <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M |
| | ESTATURA (cm) | PESO (kg) |
| 3 DATOS DE LA SOSPECHA DE REACCIÓN ADVERSA: | | |
| FECHA DE INICIO DE LA REACCIÓN | DÍA | MES |
| | | AÑO |
| DESCRIPCIÓN SOSPECHA DE REACCIÓN ADVERSA (INCLUYENDO LOS DATOS DE EXPLORACIÓN Y DE LABORATORIO) | | |
| CONSECUENCIAS DEL EVENTO | | |
| <input type="checkbox"/> RECUPERADO SIN SECUELA | <input type="checkbox"/> MUERTE-DEBIDO A LA REACCIÓN ADVERSA | <input type="checkbox"/> NO SE SABE |
| <input type="checkbox"/> RECUPERADO CON SECUELA | <input type="checkbox"/> MUERTE-EL FÁRMACO PUDO HABER CONTRIBUIDO | |
| <input type="checkbox"/> NO RECUPERADO | <input type="checkbox"/> MUERTE- NO RELACIONADA AL MEDICAMENTO | |
| 4 INFORMACIÓN SOBRE EL MEDICAMENTO SOSPECHOSO: | | |
| NOMBRE GENÉRICO | DENOMINACIÓN DISTINTIVA | LABORATORIO PRODUCTOR |
| NUMERO DE LOTE | FECHA DE CADUCIDAD | DOSIS |
| VÍA DE ADMINISTRACIÓN | FECHAS DE LA ADMINISTRACIÓN | MOTIVO DE PRESCRIPCIÓN |
| | INICIO TÉRMINO | |
| | DÍA MES AÑO DÍA MES AÑO | |
| ¿SE RETIRÓ EL MEDICAMENTO SOSPECHOSO? | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| ¿DESAPARECIÓ LA REACCIÓN AL SUSPENDER EL MEDICAMENTO? | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| ¿SE DISMINUYÓ LA DOSIS? | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| ¿SE CAMBIÓ LA FARMACOTERAPIA? | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| ¿REAPARECIÓ LA REACCIÓN AL READMINISTRAR EL MEDICAMENTO? | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| SI NO SE RETIRÓ EL MEDICAMENTO. ¿PERSISTIÓ LA REACCIÓN? | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 5 FARMACOTERAPIA CONCOMITANTE: | | |
| MEDICAMENTO | DOSIS | VÍAS DE ADMINISTRACIÓN |
| | | FECHAS |
| | | INICIO TÉRMINO |
| | | DÍA MES AÑO DÍA MES AÑO |
| | | MOTIVO DE PRESCRIPCIÓN |

6 DATOS IMPORTANTES DE LA HISTORIA CLINICA:

Diagnósticos, alergias, embarazo, cirugía previa, datos del laboratorio

7 PROCEDENCIA DE LA INFORMACIÓN:

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL INFORMANTE (LABORATORIO PRODUCTOR O PROFESIONAL).

TELÉFONO

Fecha de recepción en el laboratorio (a)

¿Informado en el período estipulado? (a)

¿Informó esta reacción al laboratorio productor? (b)

Día _____ Mes _____ Año _____

SI NO

SI NO

ORIGEN Y TIPO DEL INFORME

LABORATORIO PRODUCTOR

PROFESIONAL

TIPO DE INFORME:

INICIAL

SEGUIMIENTO

ESTUDIO

TIPO DE INFORME:

INICIAL

SEGUIMIENTO

ORIGEN:

PROFESIONAL DE LA SALUD

PACIENTE

HOSPITAL

ASISTENCIA EXTRAHOSPITALARIA

HOSPITAL

STENCIA EXTRAHOSPITALARIA

NOTA: EL ENVÍO DE ESTE INFORME NO CONSTITUYE NECESARIAMENTE UNA ADMISIÓN DE QUE EL MEDICAMENTO CAUSÓ LA REACCIÓN ADVERSA.

(a) EN CASO DE QUE EL INFORMANTE SEA AL LABORATORIO PRODUCTOR.

(b) EN CASO DE QUE EL INFORMANTE SEA UN PRÓFESIONAL.

LOS DATOS O ANEXOS PUEDEN CONTENER INFORMACIÓN CONFIDENCIAL ¿ESTA DE ACUERDO EN HACERLOS PÚBLICOS?

SI

NO

PARA CUALQUIER ACLARACIÓN, DUDA Y/O COMENTARIO CON RESPECTO A ESTE TRÁMITE, SÍRVASE LLAMAR AL CENTRO DE CONTACTO CIUDADANO (SACTEL) A LOS TELÉFONOS 2000-2000 EN EL D.F. Y ÁREA METROPOLITANA, DEL INTERIOR DE LA REPÚBLICA SIN COSTO PARA EL USUARIO AL 01-800-386-24-66 O DESDE ESTADOS UNIDOS Y CANADÁ AL +800-475-2393, O A LOS TELÉFONOS DE LA COFEPRIS EN EL D.F. DE CUALQUIER PARTE DEL PAÍS MARQUE SIN COSTO EL 01-800-033-5050 Y EN CASO DE REQUERIR EL NÚMERO DE INGRESO Y/O SEGUIMIENTO DE SU TRÁMITE ENVIADO AL ÁREA DE TRAMITACIÓN FORÁNEA MARQUE SIN COSTO AL 01-800-420-4224.

ANEXO 4. Consentimiento Informado.Hoja de informacion al voluntario

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN

Clave del protocolo: PROINVO01V1CUABEC

Título ESTUDIO PILOTO CLINICO FASE I, PARA EVALUAR LOS ASPECTOS FARMACOCINETICOS DE CAPSAICINA TABLETA DE 7.5 mg EN SUJETOS DE INVESTIGACION SANOS,DE AMBOS GENEROS,BAJO CONDICIONES DE AYUNO

Patrocinador: Victory Enterprises, S.A. de C.V.

Investigador principal: M en C.Gilberto Quinonez Palacio

Teléfono: 906-1535 Extensión 208 , de lunes a viernes de 8:00 a 16:00 horas

Teléfono contacto 24 horas: 0456653929089 las 24 horas (Gilberto Quiñones Palacio)

Institución sede: Hospital Virtual, Centro de Ciencias de la Salud, unidad Académica Valle Las Palmas

NATURALEZA Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Se le invita a participar, de manera voluntaria, en un estudio para comparar las concentraciones en su sangre de capsaicina, un medicamento utilizado para el manejo de dolor. Este estudio no tiene como propósito cumplir con un tratamiento, sino conocer el comportamiento del medicamento dentro de su cuerpo.

Objetivo. Determinar los parámetros farmacocinéticos plasmáticos de capsaicina después de la administración oral de una tableta con 7.5 mg, expresados como Área bajo la curva de tiempo cero a la última determinación (ABC 0-1), Concentración plasmática máxima (CP_{máx}), Tiempo en el que alcanza la concentración plasmática máxima (T_{máx}). Vida media de eliminación (T_{1/2}) y Volumen aparente de distribución (V_d).

Justificación. Se ha visto en la actualidad que el manejo analgésico de la Neuropatía Diabética es complejo y que no existe un tratamiento único para esto, razón por la cual se deben instituir manejo con diversos principios activos para lograr una analgesia adecuada en la neuropatía. Tomando en cuenta todos los factores anteriormente expuestos considero que la investigación de este compuesto proporcionara información en el campo de la analgesia para el manejo de la neuropatía diabética.

PROCEDIMIENTOS DE ESTUDIO

Las fases de evaluación para el presente estudio incluyen:

1. Fase de Pre-selección
2. Fase de Selección
3. Fase de Conducción

1. Fase de Pre-selección

En esta visita se le explicará con detenimiento en qué consiste el estudio, se le dará a leer el presente formato de consentimiento y se le explicarán los riesgos y beneficios de su participación. Se hará su historia clínica completa que incluye interrogatorio sobre su estado de salud y un examen físico. Si usted lo desea, se les podrá brindar la información también a sus familiares que lo acompañen. Si usted acepta participar y firma el presente formato de consentimiento informado, en el ingreso se efectuará una valoración clínica que consiste en interrogatorio por aparatos y sistemas con exploración física, con objeto de verificar que el sujeto sigue siendo candidato apto para el estudio. Se tomarán muestras de sangre y orina para los pruebas de embarazo en el caso de las mujeres y para la detección de droga de abuso. Además se realizará una prueba de alcohol en aliento. Al término de la prueba se hace un interrogatorio, exploración física, toma de signos vitales y seguimiento de eventos adversos. Los sujetos deberán reportar al médico cualquier síntoma que presenten desde el ingreso y después de la dosificación, y en caso de manifestarlo se proporcionará la atención al sujeto y se harán las anotaciones en los documentos correspondientes. Dentro de las horas previas a la administración de la dosis, a cada sujeto se le tomará (sentado) la presión arterial, el pulso, la frecuencia respiratoria y la temperatura. Estos valores deben estar dentro de la normalidad para que el sujeto continúe participando en el estudio. En caso de que alguno de los sujetos presente variaciones clínicamente significativas fuera de los rangos de normalidad en sus cifras de presión arterial y pulso en el periodo de confinamiento post-dosis, será vigilado estrechamente por el médico responsable y de persistir esta variación será evaluada su continuidad en el estudio por el investigador principal.

2. Fase de selección

Se revisarán los resultados de su historia clínica, examen físico, estudios de sangre, orina, (pruebas de embarazo mujeres), electrocardiograma en caso de encontrarlos dentro de límites normales, se le confirmará su participación en el estudio.

3. Fase de conducción

Incluye 1 periodo de estancia de aproximadamente 13 horas en el Hospital Virtual del Centro de Ciencias de la Salud de la unidad académica Valle Las Palmas.

Periodo 1

Descripción del Día 1 (Ingreso a Hospital Virtual)

Usted ingresará a la Unidad de Investigación a partir de las 7:00 horas, después de asegurarse de que la cena sea ~~antes~~ de diez horas previas a la administración de la dosis. El médico del Hospital virtual realizará una evaluación clínica a su ingreso para conocer si usted cumplió con las indicaciones para alimentación y restricciones que se le dieron previamente. Llevaran ropa cómoda pants y sudadera.

Previo a su ingreso se realizará una revisión minuciosa y respetuosa de pertenencias por el personal de enfermería, con la finalidad de garantizar que durante el ingreso al Hospital Virtual no se introduzcan alimentos, bebidas, objetos punzocortantes, medicamentos, talcos, pomadas, o cualquier otro objeto que ponga en riesgo su seguridad, la de los otros sujetos de investigación ni del estudio. Posteriormente pasaran los voluntarios a la sala de hospitalización donde se le asignara su cama.

Descripción del Día 1. En este día se realizarán las siguientes actividades:

- A las 7:00 horas aseo personal e ingesta de 250 ml agua e ingesta de 1 tableta de capsaicina de 7.5mg.
- De 7:30 a 8:00 horas instalación del catéter (toma de muestra control o “0”).
- A las 8:00 horas, administración oral del medicamento de prueba con 250 ml de agua a Temperatura ambiente por vía oral.
- De las 8:15 a las 20:00 toma de muestras de acuerdo al cronograma de toma de muestras.
- A partir de las 11:00 horas se realizará un trazo DII largo de electrocardiograma a partir de las 3 horas post-dosis para verificar la función cardiaca, la prueba debe ser sin alteraciones de significancia clínica.
- A partir de las 12:00 horas, desayuno.
- A partir de las 16: horas, comida.
- A partir de las 21:00 horas, alta de la unidad clínica y alta temporal con cita abierta.

Usted dispondrá de cómodas instalaciones y servicios de esparcimiento orientados a hacer su estancia lo más confortable posible. El área de confinamiento cuenta con 300 m² aproximadamente, área para resguardo de pertenencias y facilidades para su aseo. El personal lo atenderá con cortesía y calidad. Los médicos y enfermeras han recibido cursos de investigación farmacológica, buenas prácticas clínicas así como atención de emergencias médicas.

RIESGOS Y POSIBLES MOLESTIAS

El objetivo de este estudio no es mejorar su estado de salud, sino obtener información sobre la absorción del medicamento a estudiar. Las reacciones adversas que pudieran presentarse son:

| Sistema u órgano afectado | Reacción adversa |
|---------------------------|---------------------|
| Gastrointestinal | -Pirosis, Dispepsia |

Le pedimos que cualquier síntoma, por leve que éste sea, que a usted le cause desconcierto o malestar durante el estudio, sobre todo después de la ingestión del medicamento, avise de inmediato a cualquier médico o enfermera presente.

El medicamento **NO** debe administrarse:

- Durante el embarazo o el periodo de lactancia.

Por otro lado, dado que se le colocará un pequeño catéter o dispositivo para obtener las muestras sanguíneas sin picar el brazo en cada ocasión, puede ocurrir dolor, inflamación o moretones leves en el antebrazo. El personal de enfermería está capacitado para reducir al mínimo posible este tipo de complicaciones, aunque pudiera presentarse dolor o moretones en el sitio de las punciones y donde se coloque el catéter. En caso que esto sucediera, usted recibirá indicaciones para llevar a cabo los cuidados necesarios hasta su resolución. En caso de presentarse cualquier efecto secundario al medicamento o por los procedimientos, los costos que se generen por su tratamiento serán totalmente gratuitos para usted y serán cubiertos por el patrocinador. No olvide que en todo momento deberá informar al Investigador Principal, Médico en Investigación a cargo del estudio, cualquier molestia durante la conducción del estudio.

RECOMENDACIONES

Durante su estancia deberá conocer y seguir las siguientes reglas del Hospital Virtual:

- a) Queda estrictamente prohibido a cualquier persona fumar.
- b) No deberá consumir bebidas alcohólicas desde 24 horas antes de cada confinamiento
- c) No deberá fumar desde 24 horas antes del ingreso a confinamiento y deberá abstenerse del mismo durante toda su participación.
- d) No consumir jugo de toronja o de uva, bebidas de cola, chocolate en cualquier presentación (barra, polvo, atole, dulces, mole, licuados, malteadas, helados, etc.) y agua de Jamaica desde 24 horas antes del ingreso a cada confinamiento.
- e) No consumir café o bebidas con cafeína en las 24 horas previas a los confinamientos.
- f) Consumo de alimentos preparados al carbón en las 24 horas previas al ingreso a cada confinamiento.
- g) Está prohibido ingerir otros medicamentos en los periodos señalados por su médico. En caso de haberlo hecho, deberá ser notificado al médico del estudio.
- h) Si usted no cumple con cualquiera de los puntos mencionados anteriormente (a, b, c, d, e, f, g) nos veremos en la necesidad de eliminarlo del estudio puesto que los datos incompletos no serán de utilidad para el estudio.

Lo invitamos a leer cuidadosamente esta información y aceptar solo en caso de tener plena seguridad de poder cumplir con las restricciones que dicta el protocolo de investigación.

- i) El día de su ingreso al Hospital Virtual se le proporcionará un gafete que contendrá su número de identificación en el estudio. Estas medidas son por su seguridad.
- j) Deberá respetar la hora de asignación de consumo de alimentos y las indicaciones para ingerir los mismos.
- k) Deberá respetar la cama que le sea asignada para dormir y descansar.
- l) Si por alguna razón usted requiere tomar algún medicamento, deberá valorarlo el médico encargado y sólo él podrá autorizarlo.
- m) La práctica de ejercicio o actividades extenuantes deberá evitarse desde 24 horas antes de la administración del medicamento y durante su permanencia en la unidad de investigación.
- n) Durante su estancia, usted será cuidado en forma continua por el personal del Hospital virtual; la autorización para abandonar el centro será proporcionada únicamente por el Investigador Principal .
- o) Es importante informar al médico inmediatamente sobre cualquier molestia que pudiera presentar durante el estudio (por ejemplo: antes o después de que haya tomado el medicamento).
- p) *Finalmente, se espera que durante la realización del estudio usted se sujete a todas las reglas e instrucciones que se le proporcionen. Esto es muy importante para que usted se encuentre bien así como para asegurar el éxito y la utilidad del estudio. Si por alguna razón usted no pudiera seguir alguna de las instrucciones indicadas, deberá reportarlo inmediatamente al Investigador.*

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información correspondiente a su estado de salud será manejada de manera estrictamente confidencial. Sin embargo, mediante esta carta usted otorga su aceptación por escrito, para que el laboratorio patrocinador y sus monitores y auditores, miembros del Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación y las autoridades sanitarias que correspondan (en este caso, la Secretaría de Salud) puedan tener acceso a su expediente médico con el fin de verificar la autenticidad de la información, conocer su evolución clínica, así como evaluar la calidad de los servicios que se le proporcionan, sin que su identidad sea revelada. Eventualmente, los resultados podrán ser utilizados para generar una publicación médica, a juicio de los investigadores y del patrocinador. Todas las personas involucradas están comprometidas a guardar la información de manera confidencial y velar por la seguridad física, moral y psicológica de los sujetos de investigación participantes.

PARTICIPACIÓN Y TERMINACIÓN

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene la opción de no aceptar o bien, renunciar en el momento que usted lo desee, sin que esto repercuta en la calidad de la atención médica. En caso de surgir durante el estudio información relevante, se le informará inmediatamente para que pueda evaluar libremente si continúa o no dentro del estudio. El Investigador principal/Coordinador de Estudio, también tiene la libertad de suspender su participación en el estudio en caso de identificar incumplimiento por su parte, o bien, con el fin de proteger su salud. El patrocinador también puede decidir suspender el estudio por convenir así a sus intereses.

PERSONAS A CONTACTAR

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio y desea tener mayor información, por favor llame al **Dr. Gilberto Quinonez Palcioal teléfono 905-1535 Ext. 50208, de lunes a viernes de las 08:00 a las 16:00 horas, y al teléfono de contacto de 24 horas: 045 665 392-9089.**

Si usted desea presentar una queja relacionada con la atención recibida durante su participación en el estudio, deberá indicarlo al Coordinador del Hospital virtual.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Con el fin de garantizar la seguridad de los participantes en el estudio, éste se realizará bajo las recomendaciones de la Asociación Médica Mundial (conforme a la Declaración de Helsinki de 1964 con la enmienda vigente y en apego a la Ley General de Salud, su Reglamento en Materia de Investigación para la Salud, la NOM-177-SSA1-2013, la NOM-004-SSA3-2012, la NOM-220-SSA1-2012 y la NOM-012-SSA3-2012. Además, los procedimientos de este estudio han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética. El presente estudio incluye a un total de 40 sujetos de investigación sanos que libremente acepten participar en él.

El sujeto de investigación puede rehusar a continuar participando, sin que esto sea penalizado o represente pérdida de algún derecho o beneficio y conservará su derecho a los cuidados médicos necesarios, durante su estancia en la Unidad o mientras permanezca en el estudio.

DECLARACIÓN Y FIRMA DE CONSENTIMIENTO DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN

Manifiesto haber leído y entendido completamente el objetivo del estudio, haber tenido la oportunidad de tiempo y espacio para meditar acerca de mi decisión de participar o no, y tiempo y espacio a solas con el médico para aclarar mis dudas, hacer preguntas adicionales y recibir respuestas satisfactorias. Entiendo la razón por la que se requiere recopilar la información de este estudio así como el manejo que se le dará a la misma, con lo cual estoy totalmente de acuerdo.

Así mismo, manifiesto que lo que he expresado en mi historial clínico sobre mi actual estado de salud es veraz y por lo tanto exento de toda responsabilidad legal que surgiera o se ligara a una declaración falsa u omisión de mi parte al Centro de Ciencias de la Salud, unidad académica Valle de Las Palmas de la Universidad Autónoma de Baja California, a su personal, así como el patrocinador del estudio:

ESTUDIO PILOTO CLINICO FASE I, PARA EVALUAR LOS ASPECTOS FARMACOCINETICOS DE CAPSAICINA TABELTA DE 7.5mg EN SUJETOS DE INVESTIGACION SANOS, DE AMBOS GENEROS, BAJO CONDICIONES DE AYUNO.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|---|---|---|--|---|---|---|--|--|---|--|--|--|--|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="display: inline-table; text-align: center;"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table> 0 0 0 0 | | | | | | <table border="1" style="display: inline-table; text-align: center;"><tr><td> </td><td> </td><td>/</td><td> </td><td> </td><td>/</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>D</td><td>D</td><td></td><td>M</td><td>M</td><td>M</td><td>A</td><td>A</td><td>A</td><td>A</td></tr></table> | | | / | | | / | | | | | D | D | | M | M | M | A | A | A | A |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | / | | | / | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | D | | M | M | M | A | A | A | A | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre del sujeto de investigación | Firma | Fecha | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hora | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (Apellido paterno, materno y nombre[s]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Nombre del Testigo I

(Apellido paterno, materno y nombre[s])

Firma

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | / | | | / | | | | |
| D | D | | M | M | M | A | A | A | A |

Fecha

Dirección del Testigo I (Calle, No., Colonia, CP)

Parentesco del testigo I

Nombre del Testigo II

(Apellido paterno, materno y nombre[s])

Firma

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | / | | | / | | | | |
| D | D | | M | M | M | A | A | A | A |

Fecha

Dirección del Testigo II (Calle, No., Colonia, CP)

Parentesco del testigo II

El suscrito, manifiesta haber explicado ampliamente los detalles importantes de este estudio al sujeto de investigación y haber solucionado sus dudas.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | : | | |
| 0 | 0 | | 0 | 0 |

Nombre del Investigador Principal

Firma

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | / | | | / | | | | |
| D | D | | M | M | M | A | A | A | A |

Fecha

ANEXO 5. Formato de Historia Clínica.

Ficha de Identificación.

Nombre: _____

Registro # _____

Sexo _____ Edad _____ Cuarto _____ Sala _____

Ocupación _____

Motivo de Consulta _____

Antecedentes Personales Patológicos. (Detallará los antecedentes de importancia clínica, así como el tratamiento que recibe para cada situación comórbida y su duración)

Cardiovasculares _____ Pulmonares _____ Digestivos _____ Diabetes _____

Renales _____ Quirúrgicos _____ Alérgicos _____ Transfusiones _____

Medicamentos _____

Especifique _____

Antecedentes Personales No Patológicos (se anotará aquí lo relacionado a tabaquismo, uso de alcohol, así como diferentes adicciones y su duración, de igual forma se anotarán aquí, de requerirse, los antecedentes sexuales del paciente.)

Alcohol: _____

Tabaquismo: _____

Drogas: _____

Inmunizaciones: _____

Otros. _____

Antecedentes Familiares:

Padre: Vivo Sí _____ No _____

Enfermedades que padece: _____

Madre: Viva Sí _____ No _____

Enfermedades que padece: _____

Hermanos: ¿Cuántos? _____ Vivos _____

Enfermedades que padecen: _____

Otros: _____

Antecedentes Gineco-obstétricos:

Menarquía _____ Ritmo _____ F.U.M. _____

G _____ P _____ A _____ C _____ I.V.S.A _____

Uso de Métodos Anticonceptivos: Si _____ No _____

¿Cuáles? _____

PEEA. (En éste apartado se integrará lo relacionado con el padecimiento actual que hace que el paciente acuda a nuestro hospital, es de mencionar que de cada uno de los síntomas se solicitará un desglose adecuado en base a calidad, cantidad, cronología, área, agravantes, atenuantes y acompañantes.)

DNR (En este apartado se comentarán los datos negativos relevantes en relación a los síntomas cardinales que hicieron que el paciente acudiera a consulta, por ej.: Si un paciente acude a consulta por hematemesis preguntar sobre datos de síndrome dispéptico, reflujo gastro-esofágico, uso de antiinflamatorios no esteroides.).

DPR (Lo mismo que para datos negativos pero en este caso enfocados a datos positivos relacionados con la enfermedad, ej. Si el paciente acude por hematemesis preguntar sobre pérdida de peso, uso de AINES, etc.).

I.P.A.S.

Exploración física.

Signos Vitales. T.A. _____ (brazo derecho) T.A.(brazo izquierdo) _____ F.C. _____

Frec. Resp. _____ Temp. _____ Peso _____ Talla _____ IMC _____

(IMC= Índice de Masa Corporal)(La Tensión arterial deberá de ser tomada en 2 posiciones ej.: acostado y sentado)

Cabeza y Cuello

Tórax

Abdomen.

Extremidades.

Neurológico y Estado Mental

Nombre y firma del Medico

Cedula Profesional

ANEXO 6. Nota de Evolución.

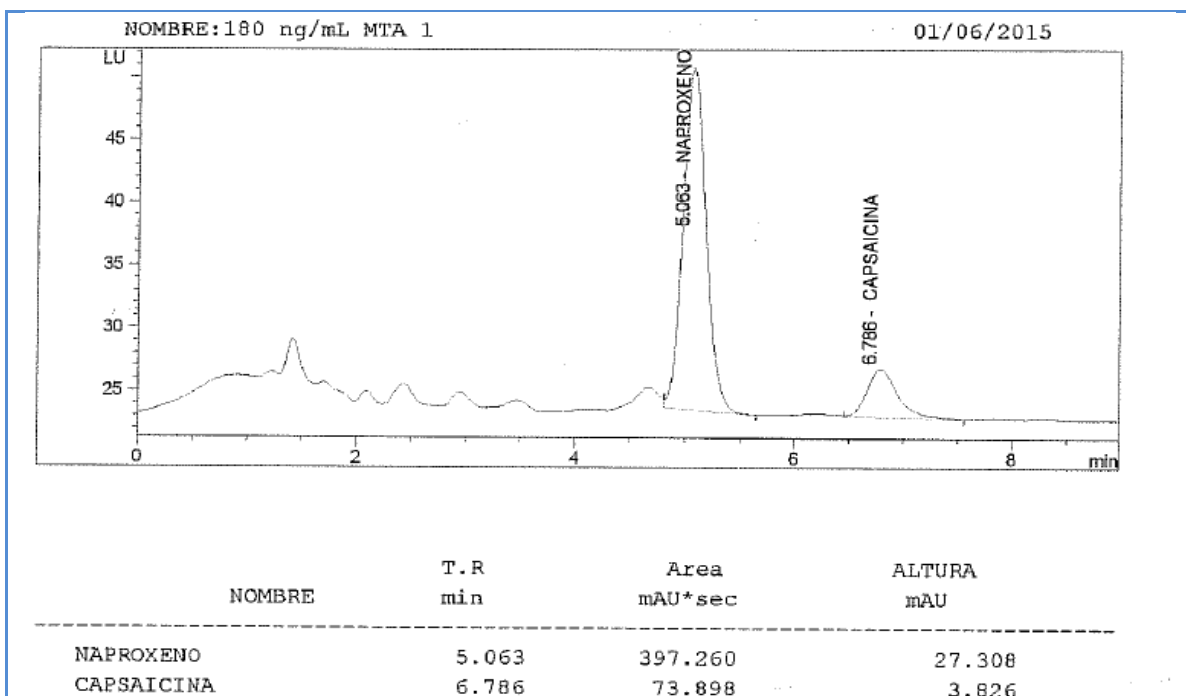
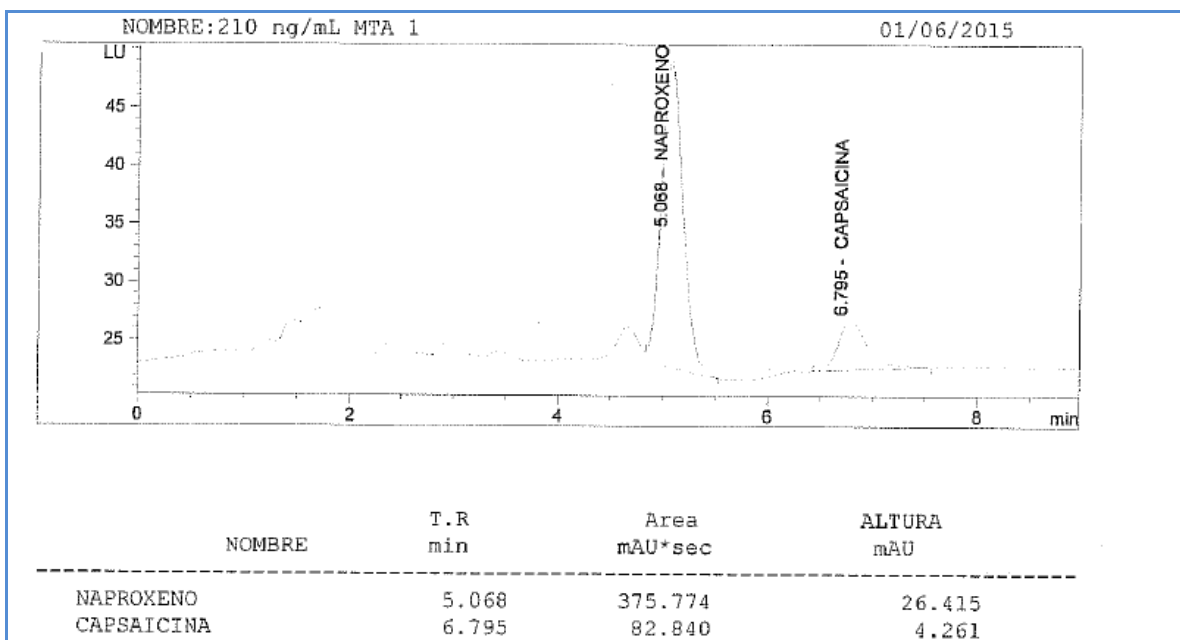
| | | | |
|--|--------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| LUGAR DE CONSULTA: | | <input type="checkbox"/> Consultorio | <input type="checkbox"/> Terreno |
| FECHA | MOTIVO DE CONSULTA | | |
| <p>. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD ACTUAL <u>EXAMEN FÍSICO</u> <u>IMPRESIÓN DIAGNÓSTICA</u> . CONDUCTA Y TRATAMIENTO</p> | | | |

ANEXO 7. Estudio Piloto de Capsaicina Oral

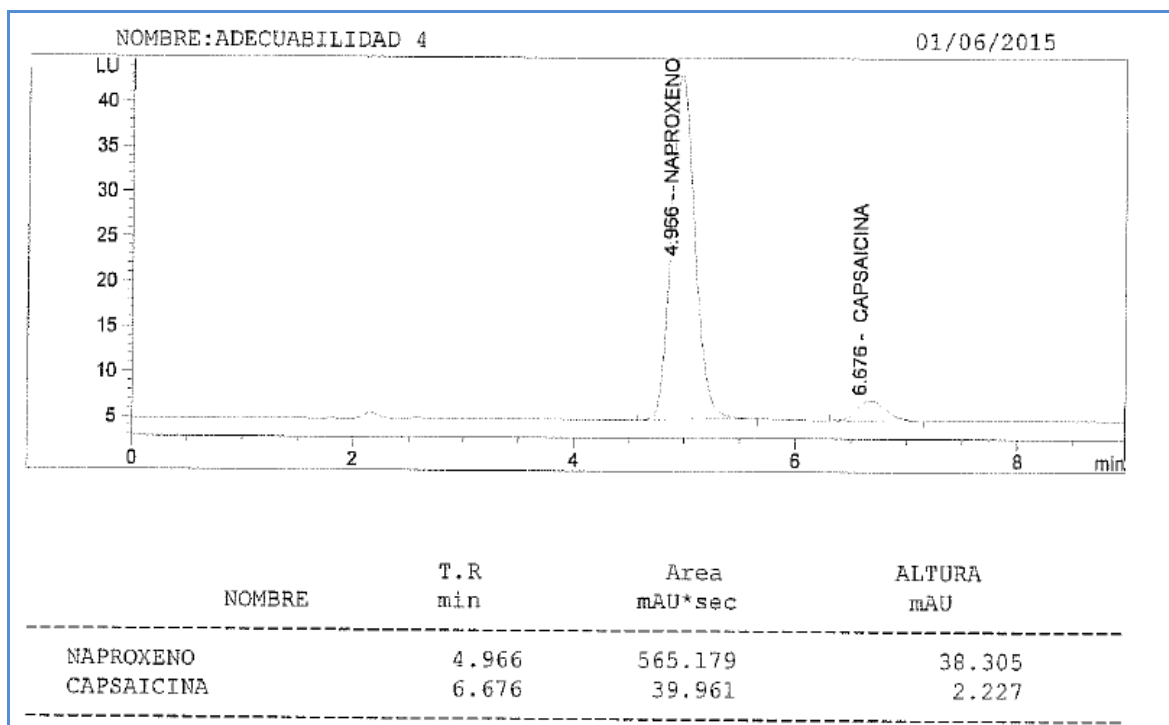
| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-------------------|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | | | | | | | | | | |
| No. | Nombre voluntario | N.Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | | H. toma Mues | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | N.Muestra | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| | | H. toma Mues | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |

ANEXO 8. Cromatograma típico de Adecuabilidad

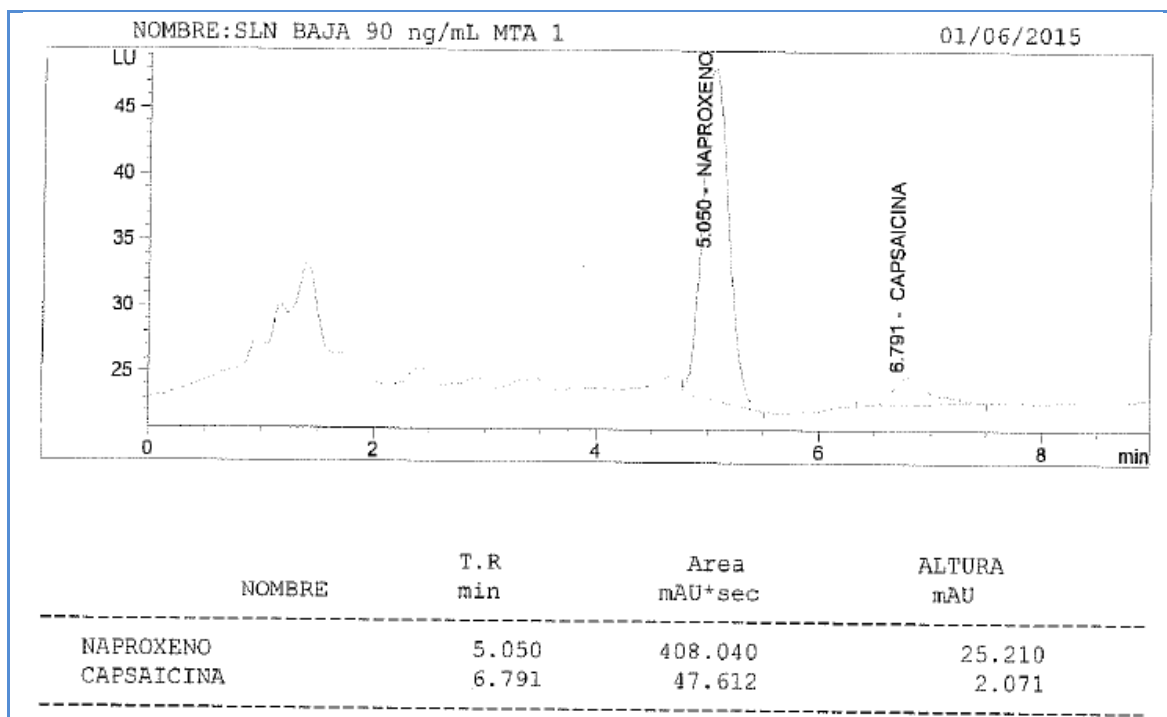
Cromatograma típico de curva de calibración (Capsaicina en plasma)



Cromatograma típico de adecuabilidad del sistema (Capsaicina en Solución)



Cromatograma típico de Muestra Control Baja (Capsaicina en plasma)



Tablas de distribución T de student

| D. of F. | 0.8 | 0.9 | 0.95 | 0.975 | 0.99 | 0.995 | 0.999 |
|----------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| 1 | 1.3764 | 3.0777 | 6.3137 | 12.7062 | 31.8210 | 63.6559 | 318.2888 |
| 2 | 1.0607 | 1.8856 | 2.9200 | 4.3027 | 6.9645 | 9.9250 | 22.3285 |
| 3 | 0.9785 | 1.6377 | 2.3534 | 3.1824 | 4.5407 | 5.8408 | 10.2143 |
| 4 | 0.9410 | 1.5332 | 2.1318 | 2.7765 | 3.7469 | 4.6041 | 7.1729 |
| 5 | 0.9195 | 1.4759 | 2.0150 | 2.5706 | 3.3649 | 4.0321 | 5.8935 |
| 6 | 0.9057 | 1.4398 | 1.9432 | 2.4469 | 3.1427 | 3.7074 | 5.2075 |
| 7 | 0.8960 | 1.4149 | 1.8946 | 2.3646 | 2.9979 | 3.4995 | 4.7853 |
| 8 | 0.8889 | 1.3968 | 1.8595 | 2.3060 | 2.8965 | 3.3554 | 4.5008 |
| 9 | 0.8834 | 1.3830 | 1.8331 | 2.2622 | 2.8214 | 3.2498 | 4.2969 |
| 10 | 0.8791 | 1.3722 | 1.8125 | 2.2281 | 2.7638 | 3.1693 | 4.1437 |
| 11 | 0.8755 | 1.3634 | 1.7959 | 2.2010 | 2.7181 | 3.1058 | 4.0248 |
| 12 | 0.8726 | 1.3562 | 1.7823 | 2.1788 | 2.6810 | 3.0545 | 3.9296 |
| 13 | 0.8702 | 1.3502 | 1.7709 | 2.1604 | 2.6503 | 3.0123 | 3.8520 |
| 14 | 0.8681 | 1.3450 | 1.7613 | 2.1448 | 2.6245 | 2.9768 | 3.7874 |
| 15 | 0.8662 | 1.3406 | 1.7531 | 2.1315 | 2.6025 | 2.9467 | 3.7329 |
| 16 | 0.8647 | 1.3368 | 1.7459 | 2.1199 | 2.5835 | 2.9208 | 3.6861 |
| 17 | 0.8633 | 1.3334 | 1.7396 | 2.1098 | 2.5669 | 2.8982 | 3.6458 |
| 18 | 0.8620 | 1.3304 | 1.7341 | 2.1009 | 2.5524 | 2.8784 | 3.6105 |
| 19 | 0.8610 | 1.3277 | 1.7291 | 2.0930 | 2.5395 | 2.8609 | 3.5793 |
| 20 | 0.8600 | 1.3253 | 1.7247 | 2.0860 | 2.5280 | 2.8453 | 3.5518 |
| 21 | 0.8591 | 1.3232 | 1.7207 | 2.0796 | 2.5176 | 2.8314 | 3.5271 |
| 22 | 0.8583 | 1.3212 | 1.7171 | 2.0739 | 2.5083 | 2.8188 | 3.5050 |
| 23 | 0.8575 | 1.3195 | 1.7139 | 2.0687 | 2.4999 | 2.8073 | 3.4850 |
| 24 | 0.8569 | 1.3178 | 1.7109 | 2.0639 | 2.4922 | 2.7970 | 3.4668 |
| 25 | 0.8562 | 1.3163 | 1.7081 | 2.0595 | 2.4851 | 2.7874 | 3.4502 |
| 26 | 0.8557 | 1.3150 | 1.7056 | 2.0555 | 2.4786 | 2.7787 | 3.4350 |
| 27 | 0.8551 | 1.3137 | 1.7033 | 2.0518 | 2.4727 | 2.7707 | 3.4210 |
| 28 | 0.8546 | 1.3125 | 1.7011 | 2.0484 | 2.4671 | 2.7633 | 3.4082 |
| 29 | 0.8542 | 1.3114 | 1.6991 | 2.0452 | 2.4620 | 2.7564 | 3.3963 |
| 30 | 0.8538 | 1.3104 | 1.6973 | 2.0423 | 2.4573 | 2.7500 | 3.3852 |



CERTIFICATE OF PRESENTATION

The following poster was submitted and presented at the 15th World Congress on Pain, held at the La Rural Convention Center in Buenos Aires, Argentina, October 6-11, 2014.

PW 338

POSSIBLE USE OF ORAL CAPSAICIN LIPID NANOPARTICLES IN SYMMETRIC DIABETIC NEUROPATHY

G. P. QUIÑONEZ.

The 15th World Congress on Pain is organized by the International Association for the Study of Pain.

Presented: 8 OCTOBER 2014

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Srinivasa N. Raja'.

Srinivasa N. Raja, M.D.


Chair, Scientific Program Committee

Sponsored by:



ANEXO 13.

Certificados de publicación en la Revista Electrónica de PortalesMedicos.com- Capsaicina y su uso en neuropatía diabética




Revista Electrónica de Portales Medicos.com






Dr. López González, Director Editorial de la Revista Electrónica de PortalesMedicos.com (ISSN: 1886-8924),
Certifica que:

D./D^a. Gilberto Quiñonez Palacio

ha remitido a la Revista Electrónica de PortalesMedicos.com, como primer/a autor/a, el artículo titulado:
"Capsaicina y su uso en neuropatía diabética",
el cual ha sido aceptado y publicado por su interés sanitario en el [Volumen X, Número 2 - Enero 2015](#)
Y para que así conste, se expide la presente certificación en Cádiz, a 29 de Enero de 2015.



Fdo: Dr. López González
Director Editorial de la Revista Electrónica de PortalesMedicos.com
<http://www.portalesmedicos.com/revista>

Certificado n°: 15105 - http://www.portalesmedicos.com/revista_certificados/15105.html

Imprimir

rtalesmedicos.com/revista_certificados/15105.html