



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

2
24

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INFLUENCIA DE LA INGESTA DE
CHILE (Capsicum annum) SOBRE LA
FARMACOCINETICA DE LA ASPIRINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS DE
LA MAESTRIA EN FARMACIA, CONTROL
DE MEDICAMENTOS

P R E S E N T A

Q.F.B. LETICIA CRUZ ANTONIO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNANDEZ



TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F.

262023

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A Dios :

*Por darme la oportunidad de vivir, acompañarme en cada momento
y brindarme la fortaleza para alcanzar una meta más.*

A mis padres:

*Por el gran amor, comprensión y ternura que siempre me han
brindado, y haciendo también suyo este logro.*

*A mis hermanos, cuñadas y sobrinos:
Por el apoyo y amor que siempre me
han ofrecido.*

A mis amigos y personal de la sección de terapéutica experimental

del CIVESTAV:

*De quienes solo he recibido palabras de aliento, e incondicional
apoyo para la realización experimental de este trabajo.*

*Al Dr. Navarrete y al Dr. Castañeda
Con un agradecimiento especial, por confiar en mí para realizar este
trabajo, por brindarme su amistad y paciencia y por motivar en mí
un espíritu emprendedor.*

ESTA TESIS SE DESARROLLO EN LA SECCIÓN DE
TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL DEL DEPARTAMENTO
DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA, DEL CENTRO DE
INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

INDICE

| | página |
|--|----------|
| Resumen | 1 |
| I. Introducción | 2 |
| II. Fundamento | 4 |
| 2.1. Farmacocinética | 4 |
| 2.2. Etapas de la farmacocinética | 6 |
| 2.2.1. Absorción | 6 |
| 2.2.2. Distribución | 8 |
| 2.2.3. Biotransformación | 9 |
| 2.2.4. Eliminación | 10 |
| 2.3. Influencia de los alimentos en la biodisponibilidad de fármacos | 11 |
| 2.3.1. Flujo sanguíneo | 13 |
| 2.3.2. Vaciamiento gástrico y motilidad gastrointestinal | 14 |
| 2.3.3. Secreción gástrica | 15 |
| 2.4. Factores alimenticios que influyen en la absorción | 15 |
| 2.4.1. Influencia de la fibra | 16 |
| 2.4.2. Influencia de los carbohidratos, las proteínas y las grasas | 16 |
| 2.4.3. Influencia de las vitaminas y los minerales | 17 |
| 2.4.4. Influencia de la mala nutrición | 17 |
| 2.4.5. Influencia de los vegetales crucíferos | 18 |
| 2.4.6. Influencia de las dietas vegetarianas | 19 |
| 2.4.7. Influencia de la ingesta de chile (capsaicina) | 19 |
| 2.5. Chile (<i>capsicum annuum</i>) | 19 |
| 2.5.1. Química | 20 |
| 2.5.2. Efectos farmacológicos y fisiológicos causados por la capsaicina..... | 21 |
| 2.5.3. Toxicidad de los Capsaicinoides | 24 |
| 2.5.4. El papel de la activación metabólica de la toxicidad inducida por Capsaicina | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6 Aspirina | 27 |
| 2.6.1. Mecanismos y sitio de acción | 27 |
| 2.6.2. Farmacocinética | 28 |
| 2.6.3 Absorción | 28 |
| 2.6.4 Distribución | 29 |
| 2.6.5. Biotransformación y metabolismo | 30 |
| 2.6.6 Eliminación | 30 |
| 2.7 Validación | 32 |
| 2.7.1. Especificidad | 32 |
| 2.7.2 Intervalo lineal y Función respuesta | 33 |
| 2.7.3. Exactitud y Precisión | 33 |
| 2.7.4. Límite de cuantificación | 34 |
| 2.7.5. Límite de detección | 34 |
| 2.7.6 Estabilidad de la muestra | 35 |
| III. Justificación | 36 |
| IV. Hipótesis | 37 |
| V. Objetivos | 38 |
| 5.1. Objetivo general | 38 |
| 5.2. Objetivos específicos | 38 |
| VI. Materiales y Métodos | 39 |
| 6.1. Primera fase Validación del método | 41 |
| 6.1.1 Condiciones cromatográficas | 41 |
| 6.1.2. Procedimiento general para el análisis de muestras para la validación | 41 |
| 6.1.2.1 Muestras blanco para la validación | 42 |
| 6.1.3 Procedimiento general para la análisis de muestras obtenidas de los tratamientos | 42 |
| 6.1.3.1. Muestras blanco para cada tratamiento | 42 |
| 6.1.4 Validación del método | 42 |
| 6.1.4.1 Especificidad | 42 |
| 6.1.4.2. Intervalo lineal y Función Respuesta | 43 |

| | |
|---|----|
| 6.1.4.3. Exactitud y precisión | 43 |
| 6.1.4.4. Límite de cuantificación | 44 |
| 6.1.4.5 Límite de detección | 44 |
| 6.1.4.6. Estabilidad de la muestra | 44 |
| 6.1.4.6.1. Estabilidad del AAS, AS y AG en sangre de rata | 44 |
| 6.1.4.6.2. Estabilidad del AAS, AS y AG en muestras procesadas | 45 |
| 6.2. Segunda fase. Estudios farmacocinéticos | 45 |
| 6.2.1. Animales de experimentación | 45 |
| 6.2.2. Estudio agudo | 45 |
| 6.2.3. Estudio crónico | 46 |
| 6.3. Toma de muestras sanguíneas | 47 |
| 6.4. Cálculos farmacocinéticos | 48 |
| 6.5. Análisis estadístico | 48 |
| VII. Resultados | 49 |
| 7.1. Primera fase Validación del método | 49 |
| 7.2. Segunda fase. Estudios farmacocinéticos | 65 |
| VIII. Discusión de resultados | 73 |
| IX. Conclusión | 83 |
| X. Bibliografía | 84 |

RESUMEN

Por la variabilidad y complejidad de los alimentos o los componentes de éstos, no es posible hacer una predicción del efecto sobre la biodisponibilidad de los medicamentos sin estudiar específicamente el factor alimenticio y el tipo de fármaco en particular. Uno de los componentes más frecuentes de la dieta mexicana es el chile, cuyo agente pungente es la capsaicina. La capsaicina produce un incremento en la secreción gástrica, flujo sanguíneo e inhibición de la motilidad gastrointestinal. El efecto del chile sobre la farmacocinética de medicamentos se ha estudiado con la antipirina, el cual aumenta el ABC y la vida media de eliminación. En contraste, el chile disminuye significativamente la absorción de la glucosa y no altera la farmacocinética de la teofilina y la quinina.

El propósito del presente trabajo fue el estudio del efecto de la ingesta de chile sobre la farmacocinética de la aspirina. Pimeramente se validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar ácido acetilsalicílico (AAS), ácido salicílico (AS) y ácido genticónico (AG) en muestras de sangre de rata.

Para el estudio agudo se administraron 2 dosis de un extracto estandarizado de chile de 100 mg/kg y 300 mg/kg (equivalente a 10 y 30 mg/kg de peso de capsaicina) por vía oral a ratas macho wistar de 200 a 250 g, simultáneamente con una dosis de AAS de 20 mg/kg de peso. Para el estudio crónico el extracto de chile fue administrado diariamente a las mismas dosis como en el estudio agudo durante 4 semanas, al final de las cuales se administró una única dosis de AAS de 20 mg/kg. En cada estudio se incluyó un grupo control el cual fue tratado con el vehículo (carboximetilcelulosa 0.5%). Para cada tratamiento se tomaron muestras de sangre durante 6 horas después de la administración del AAS, las cuales fueron analizadas por el método analítico validado previamente.

Los niveles plasmáticos de AAS y AS en cada tiempo fueron menores en los animales que recibieron el extracto de chile tanto en el estudio agudo como en el crónico.

Para el caso del AAS se obtuvo una disminución drástica en la absorción de éste al no detectarse concentraciones sanguíneas de AAS en los animales tratados con la dosis de 300 mg/kg del extracto de chile en el estudio agudo, y fue más evidente en el estudio crónico en donde en ninguno de los animales tratados con la dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg de extracto de chile logra detectarse el AAS.

En tanto que para el AS el efecto de las dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg del extracto de chile se presenta una disminución en el ABC y C_{max} de manera dosis-dependiente, tanto en el estudio agudo como en el crónico.

Los resultados obtenidos indican que la magnitud de la absorción para el AAS y AS en ratas es disminuida por la ingestión aguda y crónica de un extracto de chile. Lo que puede ser relevante para considerar las posibles implicaciones clínicas de la eficiencia de los medicamentos en la población mexicana por el consumo de chile.

I. INTRODUCCIÓN

El tipo y modo de alimentación varía grandemente entre los individuos. Tales variaciones pueden atribuirse a varios factores, incluyendo las preferencias por los alimentos, su disponibilidad, controles dietéticos en un intento por llegar a ganar o perder peso, variaciones de tipo estacional o religiosas o por razones terapéuticas. Estos factores pueden tener algún efecto sobre la absorción y farmacocinética de los medicamentos. Sin embargo, este efecto es impredecible y está en función de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del mecanismo por el cual se absorbe. El potencial de las interacciones fármaco-alimento es tan grande que en la actualidad la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, solicita que se realicen estudios de la influencia de los alimentos como parte de la caracterización biofarmacéutica de los medicamentos administrados por vía oral, como un requisito para su registro (Gibaldi, 1991)

A pesar de la importancia creciente para conocer los efectos de los alimentos sobre la absorción y/o farmacocinética de los fármacos, como uno de los muchos controles que se deben realizar a éstos, existe poca información sobre lo que ocurre en nuestra población. La mayoría de los estudios referentes a la influencia de los alimentos en la absorción de medicamentos (Fagan, 1987, Kappas *et al.*, 1979, Krishnaswamy, 1981; Brodie, 1980, Chandler y Blouin, 1990), se han realizado de acuerdo a condiciones y necesidades propias del país de origen, y cuyos resultados y conclusiones no necesariamente corresponden y pueden ser extrapolables a las condiciones e idiosincrasia del pueblo mexicano.

Ante la poca disponibilidad de estudios descritos en la literatura sobre el efecto de los alimentos y estado nutricional sobre la biodisponibilidad y farmacocinética de fármacos, en la población mexicana (Castañeda *et al.*, 1992, Lares *et al.*, 1992), el propósito del presente trabajo fue determinar la influencia del chile, (ingrediente usual en la dieta

mexicana) sobre la farmacocinética de la aspirina en ratas.

Primeramente se validó el método analítico para cuantificar de manera confiable los niveles en sangre de ácido acetilsalicílico (AAS), ácido salicílico (AS) y ácido gentísico (AG).

Posteriormente se realizó el estudio para obtener los parámetros farmacocinéticos del AAS y AS en ratas Wistar a las que se les administró por vía oral una dosis de 20 mg/kg de peso de AAS en presencia de un extracto estandarizado de chile a las dosis de 100 y 300 mg/kg de peso junto con un grupo control al que sólo se les administró el vehículo. El estudio se realizó en forma aguda (una sola administración del extracto de chile) y en forma crónica por administración diaria del extracto de chile por un lapso de cuatro semanas.

II.FUNDAMENTO

2.1 Farmacocinética

Para producir sus efectos característicos, un fármaco debe alcanzar una concentración adecuada en los sitios donde está en posición de interactuar con sus receptores para realizar su efecto biológico, sea terapéutico o tóxico. La farmacocinética, es la ciencia que describe cuantitativamente las velocidades de las varias etapas de la disposición de un fármaco, estas etapas incluyen la absorción del fármaco, su distribución a varios órganos y tejidos y su eliminación por biotransformación y excreción (Endrenyi, 1989). Es de vital importancia establecer que las concentraciones logradas en el sitio de acción por un fármaco, a pesar de que están en función de la dosis del producto administrado, también dependen de la magnitud y la tasa de absorción, distribución, unión o localización a tejidos, biotransformación y excreción (Benet *et al.*, 1996)

De un modo ideal, debería existir una relación constante entre la dosis administrada y la concentración plasmática y la tisular, y entre la tisular y el efecto terapéutico o tóxico, sin embargo no es así, en primer lugar, existen diferencias entre unas personas y otras con relación a los procesos de absorción, distribución y eliminación, lo que hace que una dosis determinada origine efectos diversos en individuos distintos. En conjunto, gran parte de las diferencias interindividuales en la respuesta a una dosis media o estándar se debe a las diferencias en los procesos farmacocinéticos, lo que repercute en los niveles plasmáticos alcanzados. De aquí que la determinación del nivel plasmático de los fármacos sea un procedimiento útil para detectar estas diferencias e individualizar un tratamiento. No obstante, existen también factores que pueden alterar el significado de nivel plasmático, haciendo que un mismo nivel origine efectos distintos (Endrenyi, 1989, Nies y Spielberg, 1996)

Como ya se mencionó, la farmacocinética estudia los procesos y factores que determinan

la cantidad de fármaco presente en el sitio en que debe ejercer su efecto biológico en cada momento, a partir de la aplicación del fármaco sobre el organismo vivo. Ello requiere el análisis de las concentraciones de fármacos y sus metabolitos en los líquidos orgánicos. El movimiento de los fármacos está sometido a leyes formulables por modelos matemáticos donde sus representaciones facilita la descripción del curso temporal de la disposición de un fármaco en el organismo y su conocimiento proporciona importante información para valorar o predecir la acción terapéutica o tóxica de un fármaco (Endrenyi,1989; Arms y Trovis,1988).

Es posible seguir la evolución de un fármaco en el organismo a través de la curva de sus niveles plasmáticos. Esta curva describe las variaciones sufridas por la concentración de un fármaco en el plasma, desde su administración hasta su desaparición del organismo. Tras la administración oral de un fármaco (Figura 2.1), la concentración plasmática inicialmente, alcanza un máximo y luego desciende. Esta variación temporal se debe a la intervención de los diversos procesos farmacocinéticos, que actúan con intensidad diferente. Así al inicio predomina la velocidad de absorción sobre la distribución y la eliminación, y cuando la intensidad de la eliminación supera a la de absorción, la curva desciende (Seeman y Kalant,1989). Parámetros tales como la concentración máxima (C_{max}), el tiempo requerido para alcanzar esta concentración (t_{max}), el área bajo la curva (ABC), y la vida media terminal ($t_{1/2}$), son fácilmente obtenidos cuando el fármaco se administra por vía oral (p o), como se presenta en la figura 2.1, mientras que parámetros tales como el volumen de distribución (Vd) y la depuración (Cl) sólo pueden obtenerse cuando el fármaco se administra por vía intravenosa (i.v) (Endrenyi, 1989). La magnitud de la absorción de un fármaco es referida al cálculo matemático del ABC, que permite una estimación de la biodisponibilidad, la cual es un índice del grado con el que un fármaco llega a su sitio de acción. La velocidad de absorción es observada por la C_{max} y el tiempo requerido para esta (t_{max}) puede ser también empleado (Endrenyi *et al.*, 1991) El Vd aparente indica la distribución de un fármaco en el organismo y el Cl indica el volumen de sangre que queda libre del fármaco por unidad de tiempo (Gibaldi,1991)

La interpretación de los datos experimentales para describir el curso temporal de las concentraciones de un fármaco, se realiza generalmente con la ayuda de modelos basados en compartimentos. Estos modelos usualmente se ajustan bien para la administración i.v., en la que se aprecian las fases de distribución y eliminación, pues no hay absorción. Sin embargo, para las vías extravasculares, por lo general se prefiere el uso de modelos no compartimentales, ya que el poder caracterizar adecuadamente la fase de absorción es difícil, sobre todo cuando se trata de fármacos administrados por vía oral y que se absorben muy rápido. Para este tipo de fármacos los parámetros farmacocinéticos aceptados para indicar biodisponibilidad son la C_{max} y el ABC (Pabst y Jaeger, 1990).

2.2 Etapas de la Farmacocinética

2.2.1 Absorción.

La absorción puede describirse como la velocidad a la que un fármaco deja su sitio de administración y el grado o la medida en que lo hace. Muchos factores, además de la estructura y composición de la membrana, determinan la facilidad con la que un fármaco se absorbe (Seeman y Kalant, 1989). El proceso de absorción comprende la penetración de los fármacos en el organismo a partir del sitio inicial de la administración, los mecanismos de transporte (difusión pasiva o transporte activo), las características de cada vía de administración y sus factores que la condicionan, y las circunstancias que pueden alterar esta absorción (Gibaldi, 1991).

La mayoría de los fármacos se absorben a través de membranas por difusión pasiva. Este sistema de transporte se hace a favor de un gradiente de concentración, donde el fármaco se mueve de una región de mayor concentración a una de menor concentración, sin requerimiento de gasto energético e implicando un sistema no saturable. La velocidad de difusión sigue la ley de Fick: depende del gradiente de concentración, del tamaño y de la naturaleza de la molécula y de su liposolubilidad (Gibaldi, 1991). Los fármacos liposolubles

atravesan las membranas biológicas, mientras que los fármacos solubles en agua penetran la membrana celular a través de canales acuosos (Rowland y Tozer, 1989).

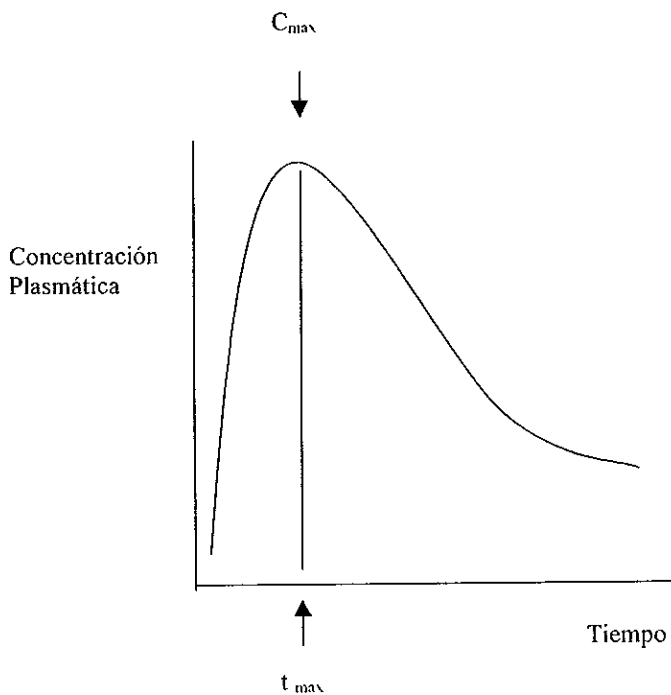


Figura 2 1. Curva de niveles plasmáticos: evolución que sigue la concentración de fármaco en el plasma después de administrar una dosis extravascular. C_{max} : concentración máxima. t_{max} : tiempo en el que se alcanza la C_{max} y ABC: área bajo la curva.

El transporte activo, es la forma de transporte en la que el fármaco atraviesa la membrana en contra de un gradiente de concentración. Para ello requiere de consumo de energía procedente del metabolismo celular y la utilización de una o varias proteínas de membrana con función transportadora, alguna de las cuales suelen tener función enzimática. Por definición, el transporte es saturable cuando se ocupa la totalidad de los puntos de fijación a la proteína transportadora (Seeman y Kalant, 1989).

La magnitud y velocidad de la absorción de un fármaco son dependientes también de la ruta de administración. Por cualquier otra vía que no sea la intravenosa, (en la cual la absorción es completa, ya que el total de dosis alcanza la circulación sistémica), puede haber una parte de fármaco administrado que no llegue a la circulación sistémica. En general, la absorción será tanto más rápida cuanto mayor y más prolongado sea el contacto con el área de absorción. Algunas de estas características, que dependen de la vía de administración (oral, intramuscular, subcutánea, etc.) son: la superficie y espesor de la membrana, el flujo sanguíneo, en el caso de administración oral, el pH del medio, la motilidad gastrointestinal y el paso a través del hígado antes de llegar a la circulación sistémica (Seeman y Kalant, 1989).

2.2.2 Distribución.

La distribución comprende los procesos de transporte del fármaco dentro del compartimento sanguíneo y su posterior penetración en los tejidos, diluido en los líquidos intersticiales y celulares (Rowland y Tozer, 1989). La distribución de un fármaco es generalmente referida como rápida y reversible, contemplando un equilibrio dinámico (entre fármaco en torrente sanguíneo y fármaco en tejidos), donde cambios en la concentración de fármaco en el plasma son indicativos de cambios en el nivel del fármaco en otros tejidos, incluyendo los sitios del efecto farmacológico (Gibaldi, 1991).

La distribución de los fármacos del torrente sanguíneo a los tejidos del organismo ocurre a

varias velocidades y en varias magnitudes. Algunos factores que determinan la distribución del fármaco incluyen la liberación del fármaco al tejido, la habilidad del fármaco para atravesar las membranas del tejido, y la unión del fármaco tanto a proteínas plasmáticas como a componentes tisulares (Rowland y Tozer, 1989). De tal forma, que los patrones de distribución del fármaco reflejan algunos factores fisiológicos y propiedades fisicoquímicas de las formas farmacéuticas. Existe una fase inicial de distribución, que refleja la intervención del gasto cardíaco y el flujo sanguíneo regional. El corazón, el hígado, el encéfalo y otros tejidos altamente irrigados reciben gran parte del fármaco a los primeros minutos de haberse absorbido, mientras que en músculos, piel y grasa la distribución es más lenta, necesitando de minutos u horas para alcanzar un equilibrio dinámico, en dichos tejidos. Una vez logrado éste, una segunda fase de distribución puede distinguirse, la cual también está limitada por el flujo sanguíneo e incluye una fracción mucho mayor de masa corporal que la primera fase (Benet *et al.*, 1996). Es muy frecuente que los fármacos puedan unirse a proteínas plasmáticas por lo que cualquier factor que altere significativamente esta unión modificara su distribución y excreción sobre todo en aquellos fármacos que se unen en más de un 80 % a las proteínas del plasma, ya que esta unión limita la concentración de fármacos en los tejidos y en el sitio de acción ya que sólo la forma libre está en equilibrio a través de las membranas (Endrenyi, 1989). Por otro lado, los fármacos pueden acumularse en los tejidos en concentraciones más elevadas que lo esperado, en función del equilibrio de difusión, como resultado de gradientes de pH, fijación a constituyentes intracelulares o partición de lípidos (Benet *et al.*, 1996)

2.2.3. Biotransformación.

En términos generales, las reacciones de biotransformación generan metabolitos inactivos más polares, que se excretan fácilmente al exterior. Sin embargo, en algunos casos se producen metabolitos con potente actividad biológica o con propiedades tóxicas (Benet, 1996). Los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación de muchos fármacos están principalmente localizados en la fracción microsomal de las células hepáticas (Kalant, 1989 y Gibaldi, 1991). Muchos tejidos en el organismo son capaces de metabolizar

a los fármacos (riñón, pulmones y epitelio gastrointestinal) y tienen también un papel importante en la cinética de algunos fármacos (Kalant, 1989).

Las enzimas metabolizadoras de los fármacos, oxidan, reducen, hidrolizan o conjugan compuestos. La reducción, oxidación y reacciones de hidrólisis (Reacciones de Fase I o de biotransformación) resultan en metabolitos con grupos funcionales con características de mayor polaridad que pueden ser conjugados con acetatos, sulfatos, glicina o ácidos glucorónicos (Reacciones de Fase II o de biosíntesis), conjugados que suelen ser inactivos y se excretan con rapidez en orina y heces (Benet *et al.*, 1996; Gibaldi, 1991)

Después de una administración enteral de un fármaco, una parte importante de la dosis sufre mecanismos metabólicos en el hígado o enzimas del epitelio gastrointestinal, antes de llegar a la circulación general, este metabolismo de primer paso limita en gran medida la disponibilidad de fármacos ya que el metabolito resultante puede ser farmacológicamente inactivo, menos activo o, en ocasiones, más activo que la molécula inicial. (Benet *et al.*, 1996).

2.2.4. Eliminación.

La eliminación ocurre por excreción y biotransformación. Algunos fármacos son excretados por vía biliar. Otros, particularmente sustancias volátiles, son excretados por los pulmones. Para muchos fármacos, sin embargo la excreción ocurre predominantemente por los riñones (Rowland y Tozer, 1989).

Los órganos de excreción, excluidos los pulmones, eliminan con mayor eficiencia compuestos polares que sustancias de gran liposolubilidad. Los riñones son los órganos más importantes para la eliminación de los fármacos y sus metabolitos. Las sustancias excretadas en heces son principalmente fármacos que no se absorbieron por la vía oral o metabolitos excretados en la bilis, que no se resorbieron en las vías gastrointestinales

La excreción renal es la vía más importante de excreción de fármacos, siendo éste un fenómeno complejo que involucra uno o más de los siguientes procesos: filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción pasiva. Dependiendo de cual de éstos procesos es dominante, el aclaramiento renal de un fármaco puede ser un componente importante o despreciable para su eliminación (Gibaldi, 1991).

La excreción de fármacos y sus metabolitos por la bilis sigue en importancia a la excreción urinaria. La fracción eliminada por la bilis en relación con la eliminación total es muy variable de un fármaco a otro, ya que algunos se eliminan en gran parte por esta vía mientras que otros no la utilizan en absoluto. El proceso de excreción biliar se relaciona estrechamente con el proceso de biotransformación, ya que la eficacia del hígado como órgano de excreción de conjugados de glucoronido se ve limitada enormemente por la hidrólisis enzimática que éstos experimentan después de que la bilis se mezcla con el contenido del yeyuno-íleon, y que el fármaco original se reabsorbe en el intestino. De esta manera, dichos compuestos pueden someterse a un "ciclaje" biliar extenso, para ser excretados finalmente por los riñones (Benet, 1996)

2.3 Influencia de los alimentos en la biodisponibilidad de fármacos.

Un fármaco administrado por vía oral puede absorberse en el tracto gastrointestinal (GI) con una magnitud y velocidad adecuada para alcanzar niveles plasmáticos suficientes para producir una respuesta farmacológica de duración y magnitud deseable. La eficiencia con la cual un fármaco se absorbe está en función de muchos factores (Welling, 1977). La *biodisponibilidad* es un término utilizado para indicar la cantidad del fármaco que alcanza la circulación y la velocidad a la cual lo hace después de la administración de la forma farmacéutica (Gibaldi, 1991). Lo anterior indica que los factores que modifican la absorción de un fármaco pueden alterar su biodisponibilidad y tal vez su efecto farmacológico y terapéutico.

En general, la absorción gastrointestinal de fármacos y nutrientes es favorecida por un estómago vacío (Welling, 1977; Toothaker y Welling 1980), pero la interacción entre el alimento y los fármacos durante un tratamiento regular con medicación oral es casi inevitable. Además, no todos los fármacos se deben ingerir en ayunas, algunos son irritantes y deberán ser administrados después de la ingestión de un alimento.

Los alimentos pueden influir en la absorción de fármacos como resultado de los cambios fisiológicos en el tracto GI o interacciones químicas o físicas entre un componente particular del alimento y las moléculas del fármaco. Dependiendo del tipo y grado de interacción, la absorción del fármaco puede reducirse, retardarse, incrementarse o no sufrir alteración alguna por la ingestión concomitante de alimentos (Toothaker y Welling, 1980)

Los cambios clínicamente significativos en la absorción del fármaco, dependerán del tipo de fármaco y la magnitud del cambio. Ciertamente para algunos fármacos una alteración pequeña en las características de absorción podrá no tener importancia para un fármaco, no así para fármacos con un índice terapéutico estrecho (Welling, 1977; Toothaker y Welling, 1980).

Según Welling (1977), Toothaker y Welling (1980) y Gibaldi (1991), existen evidencias considerables de que algunas veces los alimentos tienen un marcado pero impredecible efecto sobre la velocidad y magnitud de la absorción del fármaco. Los alimentos tienden a disminuir la velocidad de vaciamiento del estómago, lo que a menudo retarda la velocidad de absorción del fármaco. Los alimentos tienden a incrementar el pH gástrico, el cual puede disminuir o incrementar la disolución o la degradación química de algunos fármacos. Existen evidencias que ciertos alimentos interactúan directamente con algunos fármacos para aumentar o para reducir la magnitud de la absorción. Los alimentos estimulan las secreciones gastrointestinales, las cuales pueden facilitar la disolución de los fármacos, así como estimular el flujo sanguíneo hepático, lo cual puede tener implicaciones en la

biodisponibilidad de los fármacos sujetos a un metabolismo hepático del primer paso El potencial de las interacciones entre los alimentos y los fármacos es lo suficientemente importante que la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, en la actualidad, solicita estudios del efecto de los alimentos sobre la absorción de fármacos como parte de la caracterización biofarmacéutica de casi todos los fármacos nuevos formulados para administración oral (Gibaldi, 1991). Siendo también este requerimiento aplicable a nuevas formas farmacéuticas de fármacos ya establecidos

Los mecanismos de absorción de los fármacos y factores fisiológicos que influyen en la biodisponibilidad de las formas farmacéuticas orales se han estudiado extensamente (Gibaldi, 1991, Chandler y Blouin, 1990) En los párrafos siguientes se describirá de manera general como la ingestión de alimentos influye en la fisiología gastrointestinal y como esto puede en su momento, afectar a la absorción del fármaco Mencionándose sólo al flujo sanguíneo, la motilidad y vaciamiento gástrico

2.3 1. Flujo sanguíneo

Aunque la absorción de algunos compuestos ocurre por la vía del sistema linfático, la vía más importante de absorción es por la transferencia directa del lumen del tracto gastrointestinal hacia las capas epiteliales y la red de capilares adyacentes de la circulación porta (Welling, 1977; Gibaldi, 1993) De acuerdo a la primera ley de Fick, la velocidad (dD/dt) por la cual un compuesto difunde a través de la membrana capilar esta en función del gradiente de concentración a través de la membrana ($C_{LUMEN\ GI} - C_{SANGRE}$) y por lo tanto de la velocidad de flujo de la sangre a través de los capilares. Cualquier cambio en el flujo sanguíneo, que pueda ser provocado por la ingestión de alimento, puede esperarse que tenga influencia sobre la eficiencia de absorción de componentes alimenticios o cualquier otro componente disponible para la absorción (Welling, 1977; Toothaker y Welling 1980)

2.3.2. *Vaciamiento gástrico y motilidad gastrointestinal*

Después de la administración oral de los medicamentos que se absorben en el intestino en condiciones óptimas, según Gibaldi (1991), el principio del efecto terapéutico dependerá de la velocidad con la que el fármaco abandone el estómago y llegue al duodeno. La tardanza en el vaciamiento gástrico puede retardar seriamente el inicio del efecto terapéutico de los fármacos, siendo también importante en la absorción de fármacos inestables en el estómago debido al pH bajo o a la actividad enzimática existente en ese órgano. La temperatura de los alimentos, su composición, la posición del individuo al ingerir el medicamento así como el estado mental (ansiedad) del paciente pueden influir en la velocidad de vaciado gástrico.

La ingestión de alimentos puede por lo tanto, retardar el vaciamiento gástrico y puede influir en la absorción de fármacos en forma variable, ya que la presencia de alimento en el tracto GI puede disminuir la cantidad de líquido biológico disponible para la disolución del fármaco, disminuyendo su velocidad de disolución. El aumento del tiempo de residencia de fármacos en el estómago puede causar una reducción total en la eficiencia de absorción para fármacos lábiles a ácidos o sensibles a la acción de enzimas gástricas. Por otro lado, los fármacos absorbidos en sitios específicos del intestino, o por mecanismos de transporte activo, pueden exhibir un incremento en la absorción con un vaciamiento gástrico aumentado debido a que el fármaco llegará más rápido al sitio de absorción (Gibaldi, 1991; Toothaker y Welling, 1980).

Una vez que el alimento pasa del estómago a la parte superior del intestino, tiene un efecto estimulador en la motilidad intestinal lo que acelera la disolución de partículas sólidas.(Gibaldi, 1993; Toothaker y Welling, 1980; Welling, 1977)

La motilidad intestinal también tiene influencia en la absorción medicamentosa. Los movimientos rítmicos peristálticos del intestino distribuyen la solución del fármaco y proporcionan un contacto más íntimo con un área mayor de la mucosa, este contacto, junto

con las ondas peristálticas, facilitan la absorción del fármaco (Welling, 1977)

Los efectos de los alimentos en la absorción de fármacos son muy variables y frecuentemente dependen de las propiedades fisicoquímicas del medicamento y del mecanismo por el cual se absorbe. Como ya se mencionó, generalmente la presencia de alimento en el tracto gastrointestinal reduce la velocidad o la magnitud de la absorción del medicamento (Welling, 1977)

2.3.3. Secreción gástrica.

La ingestión de alimentos incrementa la secreción gástrica de ácido clorhídrico y también de muchas enzimas que pueden afectar la disolución y degradación del fármaco. Suficientes iones hidronio pueden ser secretados durante la digestión para provocar la alcalinidad de la sangre y de la orina. Este fenómeno es referido a como un ambiente postprandial alcalino y puede afectar el pasaje de compuestos ionizables a través de la membrana luminal. Un incremento de la bilis después de la ingestión de alimento puede acelerar la disolución de compuestos poco solubles (Toothaker y Welling, 1980). Sin embargo, la absorción puede ser impedida por un incremento en el flujo biliar debido a la complejación de sales biliares-fármaco (Gibaldi, 1991).

2.4 Factores alimenticios que influyen en la absorción

Generalmente, los alimentos son una mezcla de carbohidratos, grasas, vitaminas, fibras y proteínas. La mayoría de las investigaciones están diseñadas para estudiar la influencia de la dieta sobre la absorción de los fármacos en los individuos, con dietas en las cuales un macronutriente es incrementado o disminuido, y donde el contenido total calórico es tomado como constante (Chandler y Blouin, 1990). Recordando que dada la variabilidad y complejidad que los alimentos o componentes de éstos pueden tener en la absorción de fármacos, el efecto neto del factor alimenticio sobre la biodisponibilidad de fármacos no

puede ser predicha exactamente sin estudiar específicamente el factor y el fármaco en cuestión.

2.4.1. Influencia de la Fibra.

En general según Chandler y Blouin (1990), una dieta rica en fibra disminuye la absorción de fármacos. Un ejemplo está dado por Lutz y colaboradores (1987), quienes demostraron que una dieta rica en fibra incrementa la velocidad de absorción de la amoxicilina pero disminuye considerablemente la cantidad de fármaco absorbido. La fibra incrementa el vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal. Sin embargo, parte del fármaco no puede estar disponible para la absorción, debido a que es atrapado en la fibra (Lutz *et al.*, 1987). Es importante que se reconozca el efecto potencial de la fibra sobre el proceso de absorción de los fármacos, particularmente en sociedades que se mueven hacia una era de medicina preventiva y en las cuales se promueven las dietas ricas en fibras (Chandler y Blouin, 1990).

2.4.2. Influencia de los carbohidratos, las proteínas y las grasas.

La influencia nutricional sobre el metabolismo oxidativo también ha sido demostrado en varios estudios clínicos (Kappas *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 1979). En general, las dietas altamente proteicas se han asociado con un metabolismo oxidativo acelerado en los seres humanos, mientras que las dietas ricas en carbohidratos (y bajas en proteínas) parecen tener el efecto opuesto. Por otro lado, la sustitución de grasa por carbohidratos parece no tener un efecto significativo sobre la velocidad de absorción de los fármacos (Kappas *et al.*, 1979).

Los mecanismos por los cuales las dietas ricas en proteínas y carbohidratos influyen en el metabolismo oxidativo en los seres humanos no son claros. En animales, una dieta incrementada en proteínas mejora el contenido microsomal de citocromo P450, mientras que a los carbohidratos se le asocia un efecto opuesto. Además, un nivel proteico bajo en una dieta se ha correlacionado directamente con una disminución en el aclaramiento del fenobarbital y a una anestesia prolongada en ratas (Chandler y Blouin, 1990). Algunos

efectos de factores dietéticos sobre el metabolismo de los fármacos se resumen en la Tabla 2.1

2.4.3. *Influencia de las vitaminas y los minerales.*

Los efectos de las vitaminas y minerales sobre la absorción y metabolismo se han estudiado extensamente en animales (Chandler y Blouin, 1990). Por ejemplo, los estudios en animales demostraron que el sistema oxidasa de función múltiple del citocromo P450 es afectado por rivoftamina, tiamina, vitamina A, C, ácido fólico, hierro, cobre, zinc y metales pesados (Yang y Yoo, 1988)

En los seres humanos, el efecto de micronutrientes sobre la disposición de los fármacos no se ha estudiado bien. Aunque los efectos en la deficiencia de la vitamina C sobre el metabolismo de los fármacos se ha considerado en numerosos estudios clínicos, los hallazgos son ambiguos. Por ejemplo, algunos estudios demuestran un cambio en el aclaramiento de la antipirina (Yang y Yoo, 1988; Tranvouez *et al.*, 1985), mientras que otros no indican cambios significativos (Wilson, 1976).

2.4.4. *Influencia de la mala nutrición*

Los efectos de la mala nutrición sobre el metabolismo de fármacos han sido un foco de atención de numerosos estudios clínicos, (Chandler y Blouin, 1990). En general y aún con gran variabilidad interpaciente, con una forma de desnutrición moderada o suave el metabolismo oxidativo de fármaco es normal o está aumentado en algunos casos, mientras que en los cuadros severos de mala nutrición el metabolismo de fármacos está disminuido (Chandler y Blouin, 1990; Polasa, 1984; Krishnaswamy 1981; Lares *et al.*, 1992).

La mala nutrición sobre la absorción de fármacos está determinada por un número de factores tales como el grado, y duración de la mala nutrición, así como también por otros

factores concomitantes como son el medio ambiente y la influencia fisiológica (Chandler y Blouin, 1990).

TABLA 2.1. RESUMEN DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES DIETETICOS EN EL METABOLISMO DE FARMACOS EN SERES HUMANOS (Chandler y Blouin, 1990)

| Factor | Fármaco | Dirección del efecto sobre el metabolismo ^a |
|-----------------|---------------------------------------|--|
| ↑ Proteínas | Antipirina Teofilina Propanolol | ↑ |
| ↑ Carbohidratos | Antipirina Teofilina Propanolol | ↑ |
| ↑ Grasas | Antipirina Teofilina | → |
| ↓ Calorías | Antipirina | ↓ |

^a ↑=Incremento, ↓=Disminución, → = Sin efecto

2.4.5. Influencia de los vegetales crucíferos

Ciertos vegetales crucíferos (ejemplo col y bretones) contienen indoles, los cuales estimulan el metabolismo oxidativo de la antipirina y la fenacetina y la conjugación del acetaminofén (Pantuck *et al.*, 1979 y 1984). Una dieta que contenía coles y bretones incremento el aclaramiento de antipirina en un 11 %, el volumen de distribución no se modifico y el tiempo de vida media disminuyó en un 13%, en sujetos sanos (Pantuck *et al.*, 1979). Una dieta rica en coles de bruselas disminuyó la concentración plasmática e incrementó la velocidad de aclaramiento metabólico del acetaminofén en seres humanos (Pantuck *et al.*, 1984)

2.4.6. Influencia de las dietas vegetarianas

Los estudios en sujetos Asiaticos vegetarianos sugieren que la reducción del aclaramiento de la antipirina observada en relación con sujetos no vegetarianos es principalmente debido a su bajo contenido proteico, y no a la carencia de carne o cualquier diferencia en el contenido de grasas (Chandler y Blouin, 1990). Esto es corroborado por la observación de que los vegetarianos caucásicos no metabolizan a la antipirina, al acetaminofén, y a la fenacetina en forma similar a como lo hacen los caucásicos no vegetarianos. Esto se debe a que el consumo diario de proteínas de los vegetarianos caucásicos es similar a los no vegetarianos. El contenido proteico, más que la carne parece ser el responsable de la diferencia en la disposición de los fármacos (Brodie y Berg, 1980).

2.4.7. Influencia de la mgesta de chile (capsaicina).

Existen pocos estudios sobre la influencia de este condimento a pesar de la información que existe sobre la influencia que tiene la capsaicina (principio pungente del chile) sobre el tracto gastrointestinal. Wanwimolruk y colaboradores (1993), investigaron la influencia de la capsaicina (25 mg/kg) administrada p o diariamente por una semana sobre la farmacocinética de la antipirina, teofilina y quinina en ratas, encontrando que el ABC y la vida media de eliminación se incrementan significativamente en los animales tratados con capsaicina en la cinética de la antipirina, mientras que no encuentran diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos de la teofilina y la quinina. Udupihille en 1993, también describe una reducción significativa en la absorción de glucosa y alanina cuando, en segmentos del intestino delgado se realiza una perfusión de la capsaicina previamente.

2.5 Chile (*Capsicum annum*)

Se aplica el nombre de chile a numerosas variedades y formas de la planta herbácea

Capsicum annuum, de la familia de las solanáceas, aunque algunas corresponden a la especie arbustiva perene Capsicum frutescens (Evans, 1990). Todas las especies se incluyen en el género Capsicum, el cual tiene cerca de 20 especies, todas ellas confinadas a América hasta el descubrimiento del continente (Macrae, 1993). Actualmente las especies predominantes son cinco: Capsicum annuum, Capsicum frutescens, Capsim chinense, Capsicum baccatum y Capsicum pubescens (Evans, 1990).

En México y Centroamérica, las formas silvestres de C. annuum y C. frutescens generalmente se mezclan y se conocen como chile piquín

En México se conocen varias especies de chile en la dieta normal de la población y son producidas cerca de 650,000 toneladas de chile anualmente, del cual el 95% es consumido localmente. El consumo percapita es de cerca de 20 g (una pieza de chile) por día (López-Carrillo *et al* , 1994)

Desde el punto de vista nutricional, el chile aporta (aunque en pequeñas cantidades) proteínas, grasas, carbohidratos, calcio, retinol y particularmente, es una fuente importante de ácido ascórbico, siendo éste aún mayor en chiles frescos que en secos (Macrae, 1993)

A pesar de ser una fuente importante de ácido ascórbico, el principal uso del chile se debe primordialmente a sus características de condimento, dado su sabor picante característico, el cual se ha utilizado para distinguir taxonómicamente al género Capsicum. El significado biológico del sabor picante no se conoce, pero si su efecto sensorial que se produce por un grupo de compuestos conocidos como Capsaicinoides, entre los cuales predominan la capsaicina y la dihidrocapsaicina (Macrae, 1993)

2 5 1. Química

La capsaicina (vanilil-amida del ácido isodecenóico) tiene una fórmula empírica de $C_{18}H_{27}NO_3$, un peso molecular de 305 4, y una estructura química como la que se presenta

en la Figura 2.2. Con un punto de fusión de 65°C y es prácticamente insoluble en agua fría, aunque es fácilmente soluble en etanol, éter, benceno y cloroformo (Evans, 1990; Holzer, 1991; Carter, 1991)

La capsaicina produce un ardor persistente en la lengua en una dilución de 1:100,000, mientras que una dilución 1:1,000,000, imparte solamente una sensación de ardor (Carter, 1991)

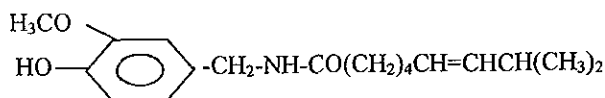


Figura 2 2 Estructura química de la Capsaicina (Vainilil-amida de ácido isodecenóico)

2 5.2. Efectos farmacológicos y fisiológicos causados por la capsaicina.

La capsaicina, ejerce sus efectos farmacológicos principales sobre la parte periférica del sistema nervioso sensorial particularmente, sobre las neuronas aferentes primarias (Surh y Lee, 1995). Estas neuronas transmiten información nociceptiva al sistema nervioso central y sus terminaciones periféricas son sitios de liberación para una variedad de neuropéptidos pro-inflamatorios tales como el péptido gen-relacionado a la calcitonina, o la sustancia P. La excitación por capsaicina de estas neuronas es seguida por un estado refractario largo y duradero, referido como desensibilización y bajo ciertas condiciones puede inducir neurotoxicidad en el tratamiento neonatal, (Szallasi y Blumberg, 1996, Holzer, 1990). Aunque estas neuronas tienden a compartir ciertas características con otras neuronas, presentan una heterogeneidad en sus marcadores neuroquímicos y propiedades funcionales

y en realidad, la susceptibilidad a la capsaicina es lo que las diferencia de otras neuronas primarias (Szallasi y Blumberg, 1996).

La capsaicina ha sido empleada por décadas como una herramienta farmacológica para identificar neuronas sensoriales y para explorar la función de esta clase de neuronas en organismos sanos o su contribución a estados patológicos del mismo. En principio los tres efectos característicos de la capsaicina (excitación/ desensibilización/ neurotoxicidad), pueden ser usados terapéuticamente, la desensibilización a la capsaicina es particularmente interesante, como una nueva aproximación para mitigar el dolor neuronal insensible a los tratamientos tradicionales como los opioides (Szallasi y Blumberg, 1996) y por lo tanto es considerada frecuentemente como un agente innovador para el manejo de pacientes con dolor artrítico (Carter, 1991), mientras que por sus características de neurotoxicidad se ha implicando también como un factor etiológico en actividades de mutagenicidad, carcinogenicidad (Surh y Lee, 1995; López-Carrillo *et al.*, 1994) y enfermedades gastrointestinales, (Limlomwongse *et al.*, 1979; Dugani y Glavin, 1986).

Se conoce poco de los efectos de la capsaicina sobre la absorción gastrointestinal de nutrientes. Se han observado efectos específicos tales como la respuesta motora y vasodilatadora provocados por la capsaicina en el intestino delgado y grueso aislados. Estos efectos son similares a los producidos por el péptido vaso activo intestinal (VIP). Además se produce la liberación consistente de VIP del intestino aislado en seres humanos, cuando se expone a la capsaicina. Se dispone de información que indica que el sistema nervioso autónomo del tracto gastrointestinal contiene neuronas aferentes primarias sensibles a la capsaicina (NAPSC). Estas NAPSC están involucradas en la activación de la regulación de los reflejos de motilidad gastrointestinal en el duodeno e intestino delgado. Las NAPSC pueden liberar péptidos tales como el péptido vasoactivo intestinal (VIP), sustancia P y péptido gen-relacionado a calcitonina de sus terminaciones nerviosas en el tracto gastrointestinal, éstos péptidos así como otras hormonas del intestino influyen en el transporte de agua y electrolitos (Nassar *et al.*, 1995).

También se ha asociado la estimulación de las NAPSC con el efecto gastroprotectivo del daño causado por aspirina acidificada, según mencionan Holzer y colaboradores (1989) o del daño causado por etanol (Kang *et al* , 1995).

La capsaicina produce algunos otros cambios en el tracto gastrointestinal como la inhibición de la motilidad gástrica y el aumento en el flujo sanguíneo intestinal en ratas (Takeuchi *et al* , 1991 y Holzer y Lippe, 1988). Así como un incremento en el volumen del fluido gástrico con la consecuente dilución luminal (Hatakeyama *et al.*,1995). La administración crónica y aguda de polvo de chile a las dosis de 200 mg en dosis única o 200 mg diariamente por cuatro semanas, incremento el contenido de moco tanto en el jugo gástrico como en la mucosa (Kang, Teng y Chen,1995). Así mismo, incrementa la secreción gástrica y flujo sanguíneo de la mucosa en forma dosis dependiente (Limlomwongse y colaboradores, 1979). El aumento de la secreción gástrica provocado por la capsaicina es inhibida por el tratamiento con antagonistas de los receptores H₂ de la histamina, lo que indicaría que la capsaicina influye en el proceso de secreción mediado por la histamina (Mann, 1977).

Otros autores, como Szoleszanyi y Barthó (1981), proponen que la capsaicina puede ejercer una acción dual en el estómago, donde la administración oral aguda de dosis bajas de capsaicina pueden proteger a las ratas en contra del desarrollo de úlcera inducida por el ligado del píloro. Sin embargo, una administración subcutánea crónica de capsaicina, la cual por si misma no producirá daño gástrico produce una desensibilización. Se ha sugerido que un tratamiento agudo con capsaicina facilita la liberación de la sustancia P de las terminaciones nerviosas sensoriales, lo cual puede mejorar el flujo sanguíneo de la mucosa y amortiguar el exceso de secreción gástrica Sin embargo, la desensibilización por un régimen crónico de capsaicina daría como resultado una disminución de la liberación a partir de las terminaciones nerviosas sensoriales, reduciendo el grado de vasodilatación gástrica y aumentando la formación de úlcera (Szoleszanyi y Barthó,1981)

2.5.3. Toxicidad de los Capsaicinoides.

Considerando el consumo frecuente de la capsaicina en varias especies de Chile, como un condimento alimenticio y su uso frecuente para propósitos terapéuticos, es importante considerar sus efectos tóxicos posibles (Surh y Lee, 1995).

La toxicidad aguda de la capsaicina se ha determinado en varias especies de animales. La DL50 de la capsaicina administrada por varias vías en ratones albinos suizos, son (en mg/kg de peso): 765 (i.p.); 0.56 (i.v.); 7.80 (i.m.); 9.0 (s.c.) y 190 (p.o.). La baja toxicidad por vía oral de la capsaicina parece estar asociada con la actividad enzimática gastrointestinal, la cual puede hidrolizar al compuesto (Surh y Lee, 1995). El efecto letal de la capsaicina no se ha elucidado completamente, pero se considera que puede involucrar una parálisis respiratoria también se han determinado, la toxicidad subcrónica de los capsaicinoides o de los extractos de varias especies de Chile. La administración de capsaicinoides o extractos de Chile bajo un régimen de dosificación subcrónica por 60 días no presentaron ningún cambio patológico mayor en muchos de los órganos examinados. Solamente se ha observado una hiperemia ligera sin hemorragia en los hígados de los grupos tratados. Sin embargo también se ha descrito que la ingestión de capsaicina en forma subcrónica causa cambios histopatológicos y bioquímicos incluyendo erosión de la mucosa gástrica y necrosis hepática (Surh y Lee, 1995).

También se han descrito algunos estudios para determinar el potencial carcinogénico de la capsaicina. En experimentos exploratorios se describe que una dieta con capsaicina produce tumores duodenales (en baja incidencia) en ratones albinos suizos. Sin embargo, la importancia de estos resultados es discutible debido al número de animales empleados (cuatro para cada grupo) y la ausencia de un efecto dosis-dependiente. En estudios posteriores usando un gran número de animales, se encontró que en ratones hembras suizas, dándoles 0.03125 % de capsaicina en una dieta semisintética de por vida, se desarrollaron adenomas polipoides en el ciego con una incidencia del 22%, la cual fue significativamente distinta con respecto al grupo control (Surh y Lee, 1995). Por otro lado,

en ratas alimentadas con dietas que contenían 1% o 3% de chile, se detectó una incidencia de cáncer gástrico inducido por N-metil-N'-nitrosoguanidina (MNNG), estos hallazgos sugieren que la capsaicina puede actuar como un promotor tumoral (Surh y Lee, 1995). En un estudio de casos y controles desarrollado en el área metropolitana de México, se encontró una correlación entre el consumo de chile y la incidencia de cáncer gástrico en la población mexicana (López-Carrillo *et al.*, 1994)

2.5.4. El papel de la activación metabólica en la toxicidad inducida por Capsaicina

No existe un único mecanismo que pueda explicar la toxicidad provocada por la capsaicina. Se ha considerado que la bioactivación hacia un intermediario electrofílico de la capsaicina con la subsecuente modificación covalente de macromoléculas celulares críticas tales como DNA, RNA y proteínas, participa en la etiología de la inducción de la toxicidad de la capsaicina en la que se incluye la mutagenicidad y carcinogenicidad así como también la muerte celular (Surh y Lee, 1995). Se han postulado las siguientes vías de activación por las cuales pueden ocurrir los daños celulares inducidos por la capsaicina (Figura 2.3).

- 1 La epoxidación catalizada por el Citocromo P450 del anillo vainilil para producir un oxirano
- 2 La oxidación por un electrón del grupo hidroxilo del anillo aromático para formar el radical fenóxilo.
- 3 La desmetilación del anillo aromático y la subsecuente oxidación del catecol resultante hacia los derivados semiquinona o quinona

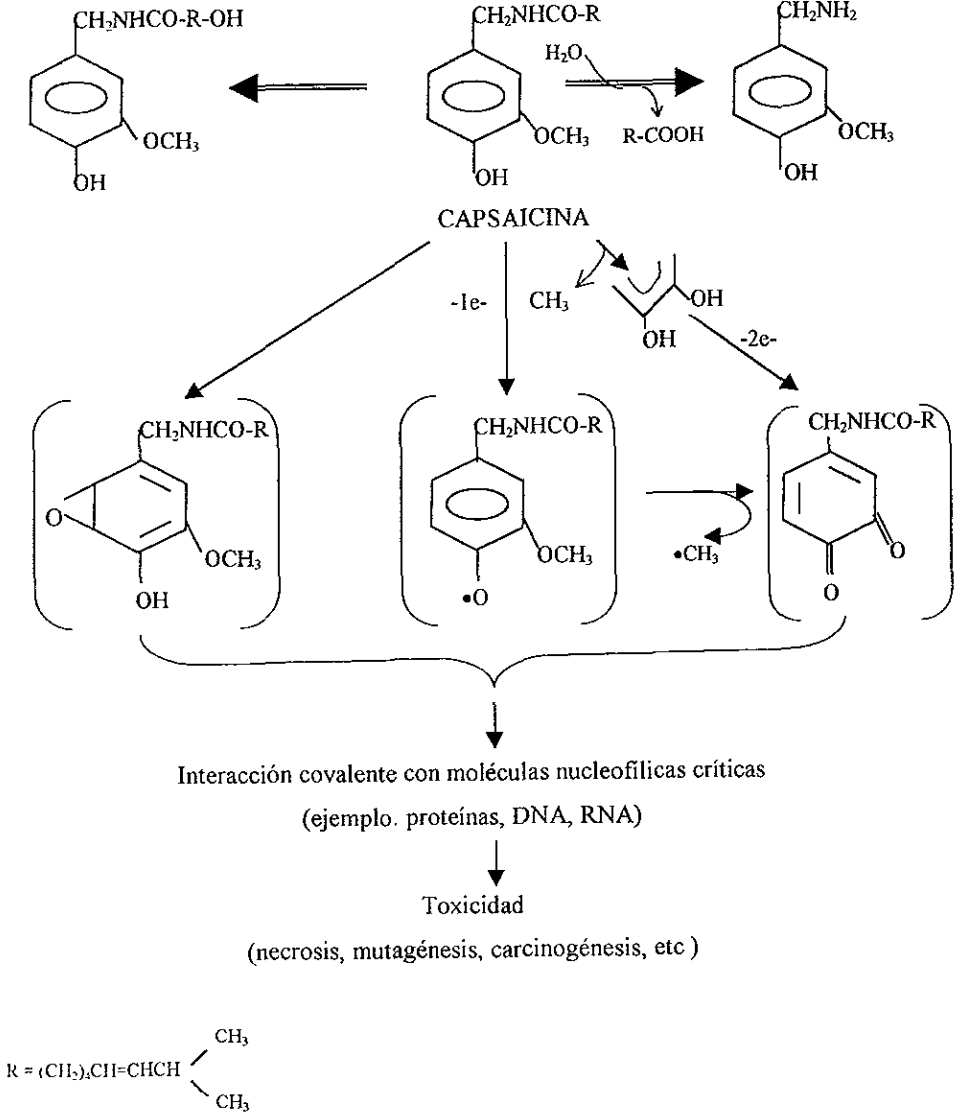


Figura 2.3. Representación esquemática del papel de la activación metabólica en la toxicidad inducida por la Capsaicina

2.6 Aspirina

A pesar de la introducción de nuevos fármacos, el ácido acetilsalicílico (aspirina) es el antiinflamatorio y analgésico-antipirético más recetado y constituye el compuesto estándar en la comparación y evaluación de otros productos. La aspirina es el analgésico “casero” más común, aunque dado que es posible conseguirlo sin problemas, a menudo se subestima. A pesar de la eficacia e inocuidad de la aspirina como analgésico y antirreumático, es importante saber que puede intervenir en el síndrome de Reye y constituye una causa común de intoxicación letal en niños de corta edad (Insel, 1996).

2.6.1. Mecanismos y sitio de acción

Las acciones analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias del Ácido Acetilsalicílico empleado para el dolor leve y/o moderado (Insel, 1996), son atribuidas primeramente a su habilidad para inhibir la producción enzimática de prostaglandinas, tanto en el sitio de la inflamación como en las plaquetas, cuando el AAS es usado a dosis bajas, a través de impedir la conversión del ácido araquidónico al intermediario endoperóxido inestable, PGG₂, reacción que cataliza la enzima ciclooxigenasa (COX), donde el mecanismo de inhibición de la COX por parte del AAS es por acetilación de la serina en el sitio activo de la enzima (Vane, 1994; Insel, 1996).

La contribución del AAS en estados patológicos de inflamación y fiebre puede ser explicada también por su propiedad de inhibir prostaglandinas en la periferia y en el centro termoregulador, en este último las pruebas de tales fenómenos incluyen la propiedad de las prostaglandinas y en especial la PGE_{2m} de producir fiebre cuando se introduce en goteo a los ventrículos cerebrales o se inyecta en el hipotálamo (Insel, 1996).

Por otro lado, la cualidad del uso a baja dosis como agente antitrombótico del AAS, es debida a que las plaquetas son especialmente sensibles a la inactivación irreversible de la ciclooxigenasa mediada por la aspirina porque poseen escasa o nula habilidad para la biosíntesis de proteínas, y de ese modo, no regeneran la enzima ciclooxigenasa (Insel,

1996).

2.6.2. *Farmacocinética.*

La farmacocinética de los salicilatos es compleja por los siguientes motivos: a) es distinta la manera de utilizarlos, como analgésicos (generalmente dosis pequeñas) o como antiinflamatorios (dosis elevadas), b) las diversas formas farmacéuticas que existen con el fin de mejorar su absorción, reducir su toxicidad gástrica o de prolongar el nivel plasmático, c) es preciso distinguir entre el AAS y el ion salicilato que de él se deriva. El AAS es más activo como analgésico aunque el salicilato mantiene su capacidad antiinflamatoria, y d) el metabolismo es saturable, por lo que la vida media es dosis dependiente (Flórez, 1992).

2.6.3 *Absorción.*

El AAS se absorbe como tal muy bien en el estómago y duodeno, puesto que su pKa es de 3.5, en el medio ácido del estómago gran parte se encuentra en forma no ionizada, lo que facilita su absorción por difusión pasiva (Dromgoole y Furst, 1992, Insel, 1996) La absorción a partir de tabletas y cápsulas convencionales se lleva a cabo de 2 a 4 horas y la velocidad de absorción esta determinada por las características físicas de la formulación. La intolerancia gastrointestinal a los salicilatos tiende a reducirse por el empleo de formulaciones con recubrimientos entéricos o sustancias amortiguadoras o cambiando la forma farmacéutica (Dromgoole y Furst, 1992). Por sus características químicas el AAS, durante el proceso de absorción por vía oral se hidroliza en la mucosa gastrointestinal y posteriormente en el hígado, antes de llegar a la circulación general (Iwamoto *et al* , 1982 y Hatori *et al* , 1984), lo que hace que su vida media a dosis bajas sea de aproximadamente de 15 a 20 min (Kadar, 1989, Insel, 1996). La hidrólisis se lleva a cabo rápidamente a ácido salicílico (AS) como efecto del primer paso según reportes de Iwamoto *et al.*, (1982) y Hatori *et al* , (1984). La absorción óptima de los salicilatos en el estómago ocurre en un rango de pH de 2.5 a 4.0. La aspirina y el ácido salicílico son absorbidos en la misma

magnitud en el estómago; sin embargo, el intestino delgado es el sitio óptimo para una absorción rápida por su mayor área de superficie. Los antiácidos y alimentos pueden afectar la absorción de la aspirina en el tracto gastrointestinal. Los alimentos prolongan significativamente el tiempo medio de residencia de la aspirina así como también el tiempo al que se alcanza la concentración máxima de salicilatos (Dromgoole y Furst, 1992).

2.6.4. Distribución.

Una vez absorbidos los salicilatos se distribuyen en todos los tejidos corporales y líquidos transcelulares, por procesos pasivos que dependen del pH (Dromgoole y Furst, 1992). Los compuestos son transportados activamente por un sistema saturable de baja capacidad, por el líquido cefalorraquídeo a través del plexo coroideo. El fármaco cruza fácilmente la barrera placentaria (Insel, 1996).

Los volúmenes de distribución de dosis comunes de aspirina y salicilato sódico en sujetos normales son de 170 ml/kg de peso corporal promedio, a dosis altas, dicho volumen aumenta en promedio 500 ml/kg por la saturación de los sitios de unión en proteínas plasmáticas. La aspirina después de ingerida, se absorbe mayoritariamente en su forma no ionizada pero parte penetra en la circulación general en forma de ácido salicílico. La aspirina se detecta en el plasma por un lapso breve, y ello es consecuencia de la hidrólisis en el plasma, hígado y eritrocitos; por ejemplo, 30 minutos después de ingerir una dosis de 0.65 g solamente se detecta el 27% de AAS, como consecuencia, las concentraciones plasmáticas del fármaco son siempre bajas con las dosis terapéuticas ordinarias y generalmente no exceden de 20 µg/ml (Insel, 1996).

De las concentraciones utilizadas en clínica, del 80 a 90% del salicilato se une a proteínas plasmáticas, y en particular a la albúmina, dicha fracción disminuye conforme aumentan las concentraciones en plasma (Insel, 1996).

2.6.5. *Biotransformación y metabolismo.*

El hígado es el principal sitio de biotransformación de los salicilatos por enzimas micosomales y mitocontriales. El Acido acetilsalicílico es primeramente hidrolizado a ácido salicílico como se presenta en la figura 2.4 y entonces convertido a ácido salicilúrico (conjugado con glicina), el glucorónido de éter o fenólico, y el glucorónido de éster o acilo. Además, se oxida una pequeña fracción hasta dar ácido gentísico (ácido 2,5,-dihidroxibenzoico) y ácidos 2,3-dihidroxibenzoico y 2,3,5-trihidroxibenzoico; formandose también a ácido gentisúrico que es el conjugado glicínico del ácido gentísico (Kadar, 1989; Dromgoole y Furts, 1992 e Insel, 1996)

2.6.6. *Eliminación.*

El ácido acetilsalicílico en humanos se excreta por la orina en forma de ácido salicílico libre (10%), ácido salicilúrico (75%), los glucorónidos fenólico (10%), acílico (5%) y como ácido gentísico (menos del 1%) Sin embargo, la excreción de salicilato libre es muy variable y depende de la dosis y del pH de la orina (Insel,1996). La eliminación del ácido salicílico involucra dos procesos que son saturables y siguen una cinética del tipo de Michaelis-Menten (ácido salicilúrico y glucorónido fenólico salicílico) y tres procesos lineales de primer orden, todos ellos actuando en paralelo (Dromgoole y Furst, 1992).

La vida media de la aspirina es de unos 15 minutos en plasma; del salicilato es de dos a tres horas a dosis bajas, y de unas 12 h a las dosis antiinflamatorias usuales. La vida media de los salicilatos puede ser incluso de 15 a 30 h a dosis terapéuticas altas o en casos de intoxicación. Incrementos pequeños en las dosis pueden ocasionar aumentos desproporcionados en los valores plasmáticos de salicilatos. La eliminación dosis-dependiente ocasiona que a dosis altas se excreta por orina una mayor proporción de fármaco inalterado debido a la capacidad limitada del hígado para formar ácido salicilúrico y glucorónido fenólico (Insel, 1996).

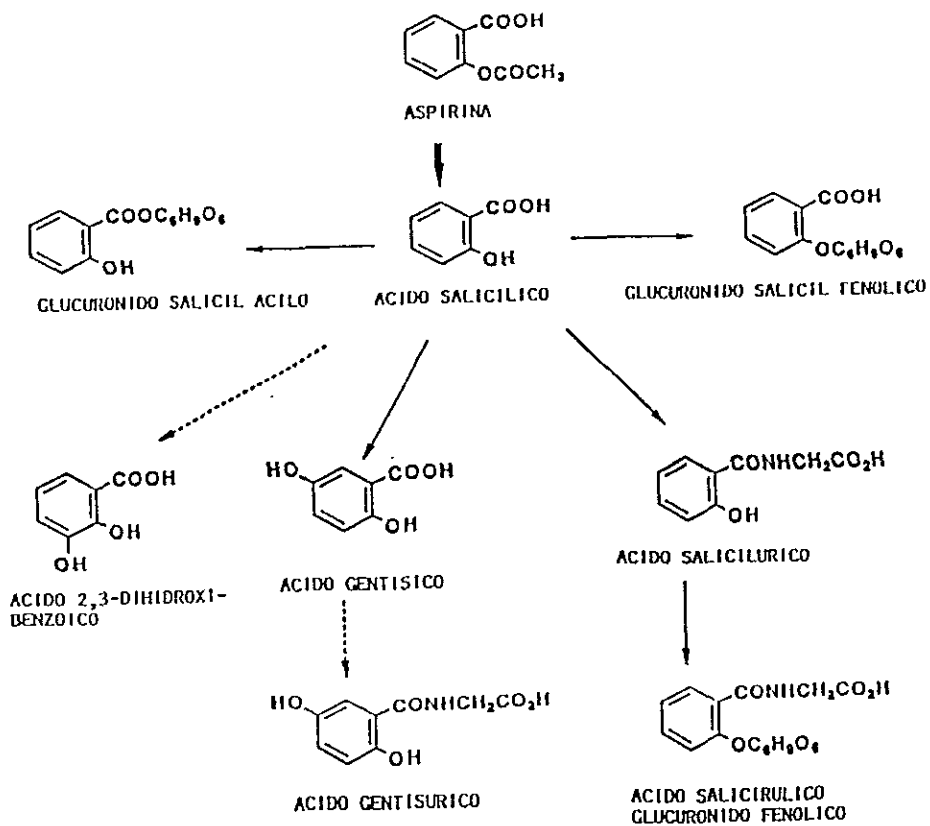


Figura 2 4 Metabolismos del Acido acetilsalicilico (Dromgoole y Furst, 1992)

2.7 Validación

La validación de métodos analíticos para estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método particular para la determinación cuantitativa de la concentración de la sustancia de interés o serie de sustancias de interés en una matriz biológica particular es confiable para la aplicación deseada a través de la evaluación de parámetros analíticos. Algunas de las técnicas bioanalíticas más comúnmente empleadas son: 1) métodos químicos (ejem. cromatografía de gases o líquidos de alta resolución y varios procedimientos con espectrofotometría de masas directa o en combinación con otras técnicas) y 2) métodos biológicos, basados éstos en procedimientos de inmunoensayos (ejem. Técnica enzimática de inmunoensayo multiplicativa, métodos microbiológicos, etc). (Shah *et al.*,1992 y CIPAM,1991). Muchos de los principios, procedimientos y requerimientos son comunes para todos los tipos de métodos analíticos (CIPAM, 1991; Shah *et al.*,1992; ICH,1997) Los parámetros esenciales para asegurar la aceptabilidad del método analítico son establecer la estabilidad de la sustancia de interés en la matriz bajo las condiciones en que se llevará a cabo el estudio, la precisión y exactitud, la especificidad y el intervalo lineal de la de función-respuesta en que se está trabajando. (Shah *et al.* , 1992).

2.7.1. Especificidad.

Es la demostración de que el método tiene la habilidad de diferenciar al compuesto de interés de metabolitos o compuestos endógenos de la matriz biológica y productos de degradación conocidos.

Se evalúa al probar por lo menos seis fuentes independientes de la misma matriz biológica verificando que no se presente interferencia alguna al analizarse con los metabolitos con la técnica propuesta o bien analizando muestras de sujetos que recibieron el fármaco de interés para comprobar que no interferirán sus metabolitos o productos endógenos en el análisis

2.7.2. Intervalo lineal y Función respuesta.

El intervalo lineal de un método analítico está definido por las concentraciones del producto o productos de interés comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior en el que será determinado el producto de interés.

Se determina por la evaluación de muestras patrón en el fluido a analizar, las cuales definen la curva de calibración, la que será construida típicamente por 6 a 8 puntos de calibración (excluyendo blancos e incluyendo la concentración mínima cuantificable) y definirá la función lineal que indicará la relación *concentración-respuesta*, la cual puede ser obtenida directamente o por medio de una transformación matemática bien definida y su ajuste deberá ser estadísticamente probado

Criterio de aceptación

- a Coeficiente de determinación (r^2) Mayor a 0.98 para una recta generada empleando el método de mínimos cuadrados

2.7.3. Exactitud y Precisión.

La exactitud es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, expresada en por ciento y está referida como la desviación que se tiene del valor teórico

La precisión se define como la cercanía de los resultados experimentales de la valoración del producto de interés determinados repetidamente. La precisión es establecida como la precisión dentro de un día (precisión intra análisis) y precisión entre días (precisión inter análisis) las cuales son expresadas comúnmente como coeficientes de variación (CV)

La determinación de la exactitud y precisión puede llevarse a cabo por el análisis de un conjunto de replicas de muestras de la sustancia de interés de concentración conocidas en la

matriz biológica, considerando tres concentraciones como mínimo, contempladas dentro del rango de la curva patrón: una cerca del límite de cuantificación (LC), una cerca del centro y otra cercana al límite superior de cuantificación. Se recomienda realizar los análisis mínimo por duplicado durante tres días para establecer la precisión inter análisis y mínimo por quintuplicado en un día para establecer la precisión intra análisis empleando las concentraciones antes mencionadas

Criterio de aceptación.

Para cada concentración analizada el valor promedio deberá estar dentro del intervalo de $\pm 15\%$ del valor real, excepto para el valor de la concentración mínima cuantificable en el cual puede ser del $\pm 20\%$ y un coeficiente de variación (CV) menor al 15% y un CV menor al 20% en la concentración mínima cuantificable

2.7.4. Limite de cuantificación.

Es la concentración mas baja del intervalo lineal que puede ser determinada con exactitud y precisión Se determina analizando la concentración mínima a cuantificar, la cual debe de cumplir con el criterio de tener un CV menor al 20%.

2.7.5 Limite de detección

Es la concentración más baja que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada por el método de análisis. Normalmente se evalúa haciendo diluciones de la muestra y analizandola para determinar la concentración que produce una relación señal-ruido de 2:1 o 3:1

2.7.6. Estabilidad de la muestra.

Se debe asegurar la integridad de la sustancia de interés desde la toma de la muestra hasta su análisis final, por lo tanto, la estabilidad de la muestra es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado. Por lo tanto la estabilidad de la sustancia de interés en la matriz biológicas se debe establecer comparando los resultados del análisis inicial de tres muestras como mínimo a la temperatura(s) a la cual será almacenada con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado bajo esas condiciones. Y posteriormente determinar la influencia de los ciclos de congelamiento y deshielo (un mínimo de dos ciclos a dos concentraciones por duplicado).

Críterio de aceptación

La muestra es estable si la comparación entre los grupos condición/tiempo en las concentraciones determinadas en comparación con la concentración inicial, no presentan *diferencia significativa*

III. JUSTIFICACION

Los trabajos referentes a la influencia de los alimentos en la absorción de medicamentos han sido basados en datos, condiciones y necesidades propias del país de origen, las cuales no necesariamente corresponden a las condiciones e idiosincrasia del pueblo mexicano. Hasta la fecha sólo existen los trabajos de Castañeda-Hernández *et al.*, (1992) y Lares *et al.*, (1992) sobre la influencia de la dieta mexicana y estado nutricional sobre la absorción de medicamentos.

El chile representa un ingrediente importante en la preparación de diversos guisos y es consumido extensamente como un condimento en varias partes del mundo, particularmente en el Suereste de Asia y países de Latinoamérica. En México existe una gran diversidad de estas especies y es muy común que la población consuma dentro de su alimentación diaria alguna de las variedades del chile. Por otro lado, se conoce el efecto del chile sobre la biotransformación (Surh y Lee, 1995), la absorción (Wanwimolruk *et al.*, 1992, Udupihille, 1993) y en el aclaramiento (Lippe *et al.*, 1989) de nutrientes y fármacos. Sin embargo, no se ha estudiado de manera sistemática la influencia del chile sobre la absorción de los fármacos. Por lo que, es necesario determinar si la ingesta de chile (*Capsicum annuum*) de forma aguda o crónica influye en la farmacocinética del ácido acetilsalicílico (aspirina).

IV. HIPÓTESIS

La administración aguda y/o crónica de chile en ratas modificará la absorción de la aspirina debido a los cambios fisiológicos en el tracto gastrointestinal provocados por la capsaicina presente en un extracto de chile estandarizado.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la administración aguda y crónica de un extracto de Chile sobre la farmacocinética de la aspirina en ratas.

5.2 Objetivos Particulares

5.2.1. Validar un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de ácido acetilsalicílico y sus metabolitos (ácido salicílico, ácido gentísico) en sangre de rata

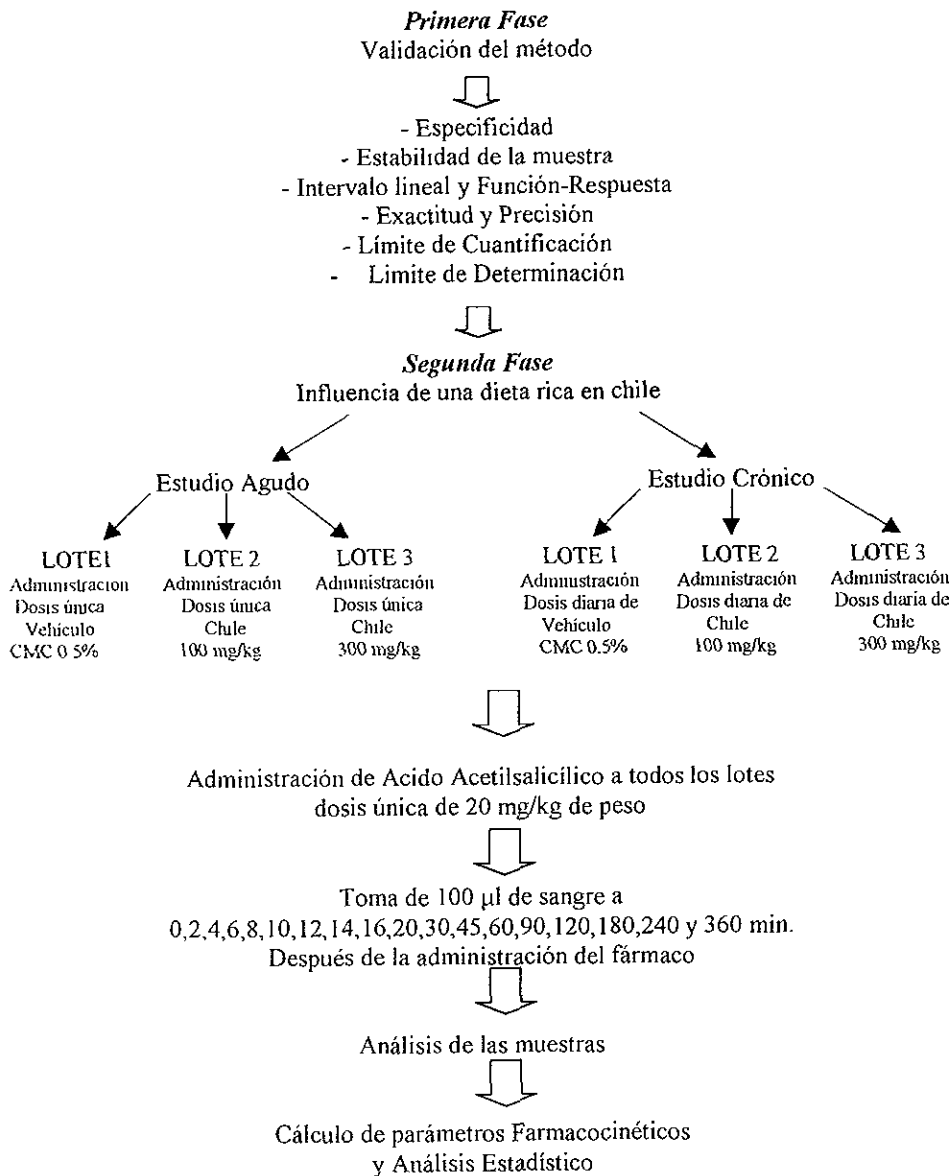
5.2.2. Determinar el efecto de la administración de un extracto de Chile estandarizado a las dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg p.o. sobre los parámetros farmacocinéticos (ABC , C_{max} , t_{max}) del ácido acetilsalicílico y sus metabolitos

5.2.3. Determinar el efecto de la administración durante 6 semanas de un extracto de Chile estandarizado a la dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg sobre los parámetros farmacocinéticos (ABC , C_{max} , t_{max}) del ácido acetilsalicílico y sus metabolitos

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada en este estudio fue realizada en dos fases, la primera consistente en la validación del método cromatográfico para la determinación de ácido acetilsalicílico (AAS), ácido salicílico (AS) y el ácido gálico, y la segunda fase en la determinación del efecto de la ingestión de un extracto de chile en forma aguda o crónica en la farmacocinética del AAS. Esta metodología se presenta en forma general en el siguiente diagrama de flujo

INFLUENCIA DE LA INGESTA DE CHILE (*Capsicum annuum*) SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE LA ASPIRINA.



6.1 Primera fase. Validación del método

6.1.1. Condiciones cromatográficas.

Las siguientes condiciones cromatográficas fueron empleadas para la cuantificación de ácido acetilsalicílico (AAS), ácido salicílico (AS) y ácido gentsílico (AG) y fueron obtenidas tomando como base el método propuesto por Rumble y Roberts (1981) y adecuadas a las condiciones del laboratorio

Como fase estacionaria se empleó una columna de 30 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro empacada con grupos octadesil ($-C_{18}$) unidos a partículas de sílica 10 μ m de tamaño partícula (columna Varian fase inversa MCH-10), como fase móvil se utilizó una mezcla de Agua-Acetonitrilo 65:35 (v/v) a un pH 2.5, el ajuste de pH se realizó con ácido fosfórico, la velocidad de flujo fue de 1 ml/min y las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 230 nm en un cromatógrafo Varian 5000.

6.1.2. Procedimiento general para el análisis de muestras para la validación.

1. En tubos cónicos de polietileno de alta densidad que contenían 300 μ l de metanol se adicionaron, 100 μ l de la muestra de sangre total y de 150 μ l de la concentración correspondiente de los productos de interés AAS, AS, AG y el estándar interno, 2-acetamidofenol (concentración 10 μ g/ml)
2. Se agitaron inmediatamente por 30 segundos en un agitador mecánico.
3. A cada tubo se le agregaron 100 μ l de estándar interno, 2-acetamidofenol a la concentración de 10 μ g/ml y fueron agitados inmediatamente por 30 segundos en un agitador mecánico
4. Los tubos fueron centrifugados por cinco minutos a 10,000 rpm y los sobrenadantes fueron separados
5. Los sobrenadantes (muestras listas para ser inyectadas) se mantuvieron congelados a -38°C , hasta el momento de ser inyectados.
6. Se inyectaron 50 μ l del sobrenadante, al sistema cromatográfico bajo las condiciones señaladas anteriormente

6 1 2.1. Muestras blanco para la validación.

1 En tubos cónicos de polietileno de alta densidad que contenían 300 µl de metanol se adicionaron, 100 µl de la muestra de sangre total y de 150 µl de agua grado cromatográfico y fueron analizadas siguiendo los pasos 2 al 6 del procedimiento antes descrito.

6 1.3. Procedimiento general para la análisis de muestras obtenidas de los tratamientos.

- 1 En tubos cónicos de polietileno de alta densidad que contenían 300 µl de metanol se adicionaron, 100 µl de la muestra de sangre total.
2. Se agitaron inmediatamente por 30 segundos en un agitador mecánico y se congelaron a -70°C

El día del análisis:

- 3 A cada tubo se le adiciono 100 µl de estándar interno 2-acetamidofenol (concentración de 10 µg/ml) y fueron inmediatamente agitados por 30 segundos en un agitador mecánico.
- 4 Los tubos fueron centrifugados por cinco minutos a 10,000 rpm
- 5 El sobrenadante fue separado y se inyectaron 50 µl del mismo al sistema cromatográfico, bajo las condiciones señaladas anteriormente. Las muestras listas para ser inyectadas al sistema cromatográfico se mantuvieron congeladas a -38°C

6 1 3 1 Muestras blanco de cada tratamiento.

En tubos cónicos de polietileno de alta densidad que contenían 300 µl de metanol se adicionaron 100 µl de la muestra de sangre total obtenidas al tiempo cero del respectivo tratamiento y fueron analizadas siguiendo los pasos 2 al 5 del procedimiento descrito en el punto 6.1 3

6 1 4. Validación del método.

6 1 4 1. Especificidad

Se aplico el método analítico propuesto a seis fuentes independientes de la misma matriz

biológica (sangre total de rata) las cuales contenían AAS, AS y AG verificando que no se presentara interferencia alguna entre los productos de interés al analizarse y/o los productos endógenos de la matriz al ser comparados con sus respectivos blancos (Shah *et al.*, 1992 y CIPAM, 1991)

6.1.4.2 Intervalo Lineal y Función Respuesta

Se evaluaron simultáneamente las muestras patrón que contenían AAS, AS y AG en sangre de rata a seis niveles de concentración, las cuales definieron la curva de calibración (curva patrón) para cada uno de las sustancias en el intervalo lineal que fue establecido para el ASA y AG de 0.5 µg/ml a 16 µg/ml y para el AS de 2.5 µg/ml a 80 µg/ml en sangre de rata

La evaluación de la función respuesta consistió en la verificación de la consistencia de curvas generadas, al determinar el coeficiente de determinación de las rectas generadas, el cual no debería ser menor al 0.98 y los puntos estimados de la curva, deben de cumplir con los criterios de precisión y exactitud (Shah *et al.*, 1992).

6.1.4.3 Exactitud y Precisión

La precisión fue evaluada como precisión intra análisis y precisión inter análisis. Para lo cual, a las muestras de sangre de rata se les adicionó 0.5, 0.75, 3.0 y 12.0 µg/ml para AAS y AG y 2.5, 3.5, 15.0 y 60.0 µg/ml para AS, las muestras fueron procesadas por duplicado durante tres días para la precisión inter análisis y por sextuplicado en un solo día para la precisión intra análisis. Todas las muestras fueron interpoladas en la curva de calibración respectiva.

Para la precisión intra análisis se obtuvo el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones interpoladas de todas las muestras de ese experimento, donde se empleó el siguiente criterio de aceptación (Shah *et al.*, 1992). coeficiente de variación menor al 15% (menor del 20% a las concentraciones de 0.5 y 2.5 µg/ml).

Del mismo modo para la precisión inter análisis, se obtuvo el coeficiente de variación de las

concentraciones interpoladas de todas las muestras obtenidas en los diferentes días en que se efectuó el experimento, aceptándose cuando el coeficiente de variación fue menor al 15% para todas las concentraciones excepto para las concentraciones de 0.5 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ que fue menor al 20% (Shah *et al.*, 1992).

La exactitud se evaluó verificando que el promedio de las concentraciones interpoladas del AAS, AS y AG en ambos experimentos de la precisión no se alejará más del 15% de las concentraciones adicionadas y no más del 20 % para las concentraciones de 0.5 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (Shah *et al.*, 1992).

6.1.4.4 Limite de cuantificación.

Fue determinado por el análisis de las muestras independientes a las concentraciones del 0.5 $\mu\text{g/ml}$ para el caso del AAS y AG y de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ para el AS, las cuales cumplieron con el criterio de aceptación para la exactitud y precisión

6.1.4.5 Limite de detección

Las señales de las muestras de AAS, AS y AG a concentraciones por debajo del límite de cuantificación definido se compararon con muestras blanco y fue establecida la concentración mínima en la cual las sustancias de interés fueron detectadas

6.1.4.6 Estabilidad de la muestra

6.1.4.6.1 Estabilidad del AAS, AS y AG en sangre de rata. Se prepararon muestras de sangre de rata adicionadas con tres niveles de concentración para AAS, AS y AG las cuales fueron agitadas inmediatamente por 30 segundos y almacenadas a -70°C Para posteriormente seguir el procesamiento y análisis a las 0, 24 y 48 horas, empleando un diseño como el siguiente:

| | Inicial | 24 horas/ -70°C | 48 horas/ -70°C |
|-----------------|---------|---------------------------------|---------------------------------|
| Concentración 1 | | | |
| Concentración 2 | | | |
| Concentración 3 | | | |

6.1 4 6.2. Estabilidad del AAS, AS y AG en muestras procesadas. Muestras de sangre de rata adicionadas con tres niveles de concentración para AAS, AS y AG y procesadas hasta el punto 5 del procedimiento 6.1 2. para obtener muestras listas para ser inyectadas, fueron almacenadas en las condiciones del laboratorio (-38°C) y analizadas a las 0, 24 y 48 horas, empleando un diseño como el siguiente.

| | Inicial | 24 horas/-38°C | 48 horas/-38°C |
|-----------------|---------|----------------|----------------|
| Concentración 1 | | | |
| Concentración 2 | | | |
| Concentración 3 | | | |

La estabilidad de los fármacos en muestras procesadas y no procesadas se determinó al realizar la comparación entre el análisis inicial correspondiente contra las muestras de 24 y 48 horas, por la prueba de t de Dunnett, después de un análisis de varianza. Una p igual o menor a 0 05 se consideró significativa.

6.2 Segunda fase. Estudios farmacocinéticos

6.2.1. *Animales de experimentación*

Para el estudio agudo, se utilizaron ratas Wistar macho de 8-10 semanas de edad y con un peso corporal de 200 a 250 g, que fueron alimentados con una dieta normal (Laboratorio RatDiet®) y para el estudio crónico, se utilizaron ratas Wistar macho recién destetadas.

3.2.2 *Estudio Agudo*

Los animales se dividieron en forma aleatoria en tres grupos de 6 animales cada uno, y fueron tratados de la siguiente manera

- A Grupo Control. Ratas que recibieron únicamente una dosis de 20 mg/kg de AAS suspendida en carboximetilcelulosa al 0.5% (vehículo) administrada por vía oral mediante una sonda de polietileno.
- B Grupo 1. Ratas a las cuales se les administró mediante una sonda de polietileno una dosis oral de 100 mg/kg de peso de un extracto de chile (oleoresina de capsico, Laboratorio Mixin, LM-723), equivalente a 10 mg/kg de capsaicina simultáneamente con una dosis de 20 mg/kg de AAS suspendida en carboximetilcelulosa al 0.5%.
- C Grupo 2. Ratas a las cuales se les administró una dosis oral de 300 mg/kg de peso de un extracto de chile, equivalente a 30 mg/kg de capsaicina simultáneamente una dosis de 20 mg/kg de AAS suspendida en carboximetilcelulosa al 0.5% mediante una sonda de polietileno.

A los animales de experimentación 12 horas antes del estudio farmacocinético se les retiró el alimento y se les dejó libre acceso al agua. Este estudio se realizó bajo el siguiente diseño

| Tratamiento | Dosis de AAS p.o | Dosis de Extracto de Chile p.o | Número de ratas |
|---------------|------------------|--------------------------------|-----------------|
| Grupo control | 20 mg/kg | ----- | 6 |
| Grupo 1 | 20 mg/kg | 100 mg/kg* | 6 |
| Grupo 2 | 20 mg/kg | 300 mg/kg** | 6 |

*equivalente a 10 mg/kg de capsaicina. **equivalente a 30 mg/kg de capsaicina

3.2.3 Estudio Crómico.

Los animales recién destetados fueron divididos en forma aleatoria en tres grupos de 6 animales cada uno, y fueron tratados de la siguiente manera

- A Grupo Control. Ratas a las cuales se les administró por vía oral, mediante una sonda de polietileno una solución de carboximetilcelulosa al 0.5% diariamente a razón de 0.5 ml/kg hasta alcanzar un peso entre 200 y 250 g (en general el peso se alcanzó en cuatro

semanas)

- B Grupo 1. Ratas a las cuales se les administró, mediante una sonda de polietileno una dosis oral de 100 mg/kg de peso de un extracto de chile equivalente a 10 mg/kg de capsaicina diariamente hasta alcanzar un peso entre 200 y 250 g.
- C Grupo 2. Ratas a las cuales se les administró, mediante una sonda de polietileno una dosis oral de 300 mg/kg de peso de un extracto de chile equivalente a 30 mg/kg de capsaicina diariamente hasta alcanzar un peso entre 200 y 250 g

Una vez que los animales alcanzaron el peso indicado, se les dejó en ayuno durante 12 horas y se les administró p.o una dosis de 20 mg/kg de AAS simultáneamente con la dosis del extracto de chile siguiendo el diseño siguiente:

| Tratamiento | Dosis de AAS p.o | Extracto de Chile p.o Administrada diariamente | Número de ratas |
|---------------|------------------|--|-----------------|
| Grupo control | 20 mg/kg | Vehículo | 6 |
| Grupo 1 | 20 mg/kg | 100 mg/kg* | 6 |
| Grupo 2 | 20 mg/kg | 300 mg/kg** | 6 |

*equivalente a 10 mg/kg de capsaicina, **equivalente a 30 mg/kg de capsaicina

6.3. Toma de muestras sanguíneas

Los animales fueron colocados en posición decúbito dorsal y se les realizó la canulación de la arteria caudal aproximadamente a 3 cm de la base de la cola, insertando un catéter de polietileno PE-10 directo a la arteria y en el extremo libre se colocó un catéter PE-50 el cual se mantuvo heparinizado para facilitar la toma de muestras

Se tomaron muestras de 100 µl de sangre inmediatamente antes de la administración del fármaco y a los 2,4,6, 8,10,12,14,16,20,30,45,60,90,120,180,240,y 360 minutos, después de la administración del AAS las cuales fueron recibidas en tubos cónicos de polietileno de alta densidad que contenían 300 µl de metanol y fueron procesadas como lo indica el

método analítico en un lapso no mayor a 48 horas, después de la toma de las muestras.

6.4. Cálculos Farmacocinéticos

La concentración plasmática máxima (C_{max}) y el tiempo al que se alcanza la C_{max} (t_{max}) se obtuvieron directamente de los cursos temporales obtenidos para cada rata. El cálculo del Area Bajo la Curva (ABC) del gráfico de las concentraciones sanguíneas contra tiempo se obtuvo a través de la regla de los trapecoides.

6.5. Análisis Estadístico

Las diferencias estadísticas en el ABC, C_{max} y t_{max} , se evaluaron por un análisis de varianza, seguido por el análisis entre medias a través de la prueba de t de Dunnett. Se aceptaron diferencias significativas para un valor igual o menor a 0.05 (Montgomery, 1991)

VII. RESULTADOS

7.1. Primera Fase. Validación del método

Especificidad.

Al comparar los cromatogramas (Figura 7.11) de las muestras de la mezcla de los estándares de ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, ácido gentísico y estándar interno, sangre libre de fármacos (blanco) y una muestra plasmática después de un tratamiento, se encontró que no existe interferencia en su cuantificación, según sus tiempos de retención observados (Tabla 7.1).

| Compuesto | Tiempo de Retención (minutos) |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Acido Gentísico | 4.9 |
| 2-acetamidofenol (estándar interno) | 5.5 |
| Acido acetilsalicílico | 7.1 |
| Producto endógeno | 7.8 |
| Acido salicílico | 10.0 |

Tabla 7.1. Tiempos de retención de los compuestos Acido acetilsalicílico, Acido Salicílico, y Acido Gentísico cuantificados con el método analítico por Cromatografía líquida de alta resolución

Intervalo Lineal y Función-Respuesta

El intervalo lineal para el Acido Acetilsalicílico (AAS), Acido Salicílico (AS) y Acido Gentísico definido para el método analítico a validar fue

| Compuesto | Intervalo lineal ($\mu\text{g/ml}$) |
|------------------------|---------------------------------------|
| Acido Acetilsalicílico | 0.5 a 16 |
| Acido Salicílico | 2.5 a 80 |
| Acido Gentísico | 0.6 a 16 |

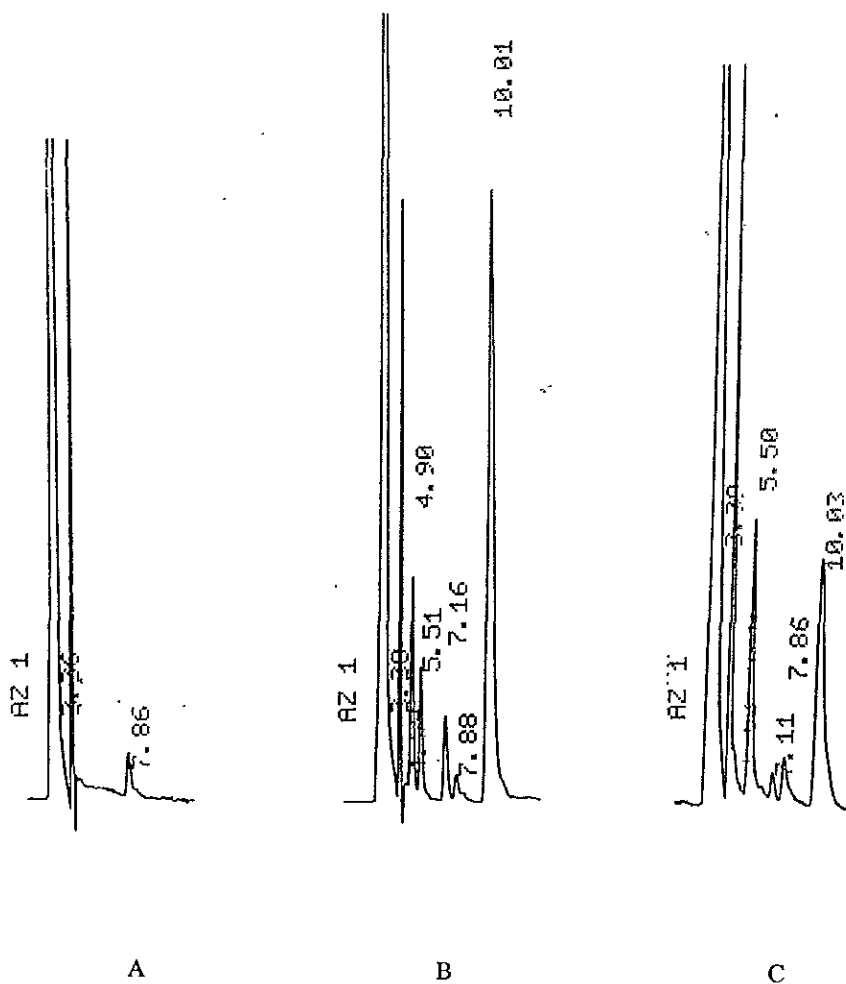


Figura 7.1. Cromatogramas típicos A). Cromatograma de muestra blanco, B). Cromatograma de muestra de estándares adicionados y C). Cromatograma de muestra con productos de interés después de un tratamiento. Con tiempos de retención para: ácido gentísico (AG) 4.9 min, estándar interno (EI) 5.5 min, ácido acetilsalicílico (AAS) 7.1 min, y ácido salicílico (AS) 10.0 min..

El parámetro *Función-Respuesta* fue determinado para el Acido Acetilsalicílico, Acido Salicílico y Acido Gentísico como una función lineal que indicaron la relación *(concentración-respuesta medida)*.

Este parámetro fue determinado construyendo seis curvas de calibración (concentración-respuesta medida) independientes para cada uno de los fármacos, analizados en el intervalo lineal establecido, la respuesta medida para el método esta definida como la relación de alturas obtenidas entre la Altura del Problema/Altura del Estándar Interno.

En las tablas 7.2, 7.3 y 7.4 se presentan la función-respuesta para los fármacos analizados, con base a estos datos, los coeficientes de determinación obtenidos caen dentro del criterio establecido y se considera que las curva patrón presentan un comportamiento del tipo $y = a + bx$ para relacionar las concentraciones de AAS, AS y AG presentes en sangre de rata con la respuesta del sistema cromatográfico. Así mismo la calidad de ajuste para cada una de las curvas obtenidas cumplen con los criterios de exactitud y precisión reportado como el por ciento del coeficiente de variación (Shah *et al.*, 1992). Las representaciones gráficas de estas relaciones se presentan en las figuras 7.2, 7.3, y 7.4

Tabla 7.2 Curvas de Función –Respuesta para Acido Acetilsalicílico
(Concentración de Acido acetilsalicílico en $\mu\text{g/ml}$ vs. Relación de alturas)

| $\mu\text{g/ml}$ | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Promedio | Desviación estándar | % CV |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|---------------------|--------|
| 0.5 | 0.0204 | 0.0203 | 0.0217 | 0.0204 | 0.0202 | 0.0205 | 0.0206 | 0.0006 | 2.7053 |
| 1 | 0.0405 | 0.0405 | 0.0426 | 0.0406 | 0.0444 | 0.0408 | 0.0416 | 0.0016 | 3.8649 |
| 2 | 0.0820 | 0.0803 | 0.0795 | 0.0833 | 0.0941 | 0.0869 | 0.0844 | 0.0054 | 6.4468 |
| 4 | 0.1705 | 0.1805 | 0.169 | 0.1851 | 0.1865 | 0.1698 | 0.1769 | 0.0081 | 4.5655 |
| 8 | 0.3466 | 0.3747 | 0.3373 | 0.3858 | 0.3833 | 0.3913 | 0.3698 | 0.0224 | 6.0691 |
| 16 | 0.6950 | 0.7250 | 0.6951 | 0.7317 | 0.7500 | 0.7375 | 0.7224 | 0.0227 | 3.1440 |
| r | 0.9999 | 0.9994 | 0.9997 | 0.9988 | 0.9998 | 0.9982 | 0.9999 | 0.0066 | |
| m | 0.04364 | 0.04587 | 0.04347 | 0.04636 | 0.04715 | 0.04684 | 0.0455 | 0.0021 | |

m= pendiente, % CV= por ciento de coeficiente de variación

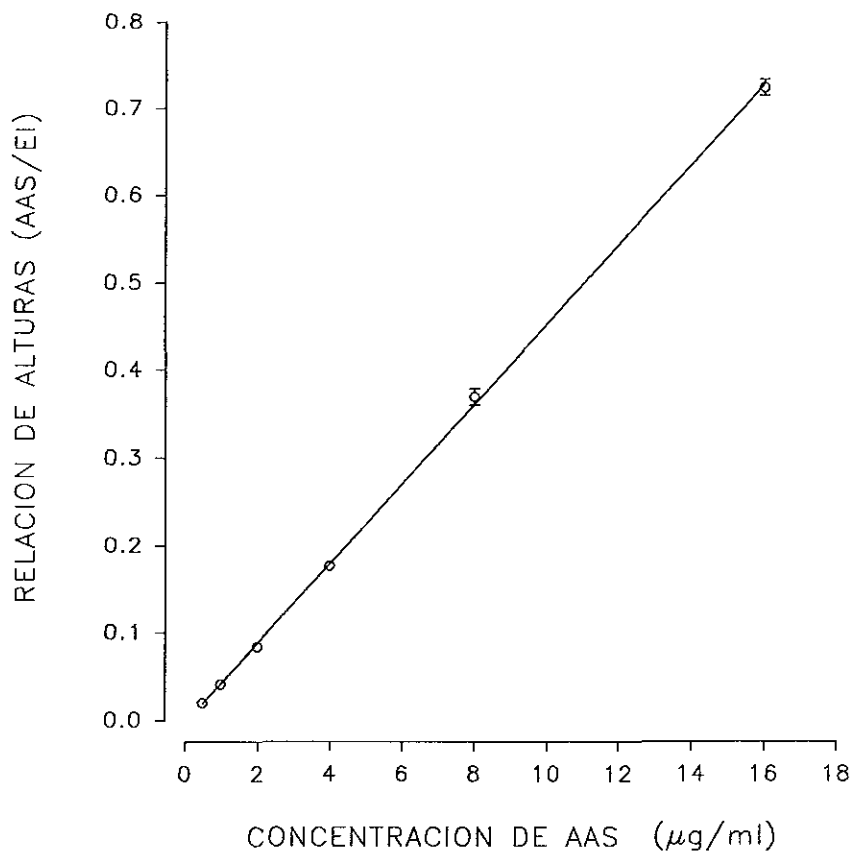


Figura 7 2 Gráfica de la Función- Repuesta para el Acido Acetilsalicílico en sangre de rata. Cada punto representa el promedio de seis determinaciones más su error estándar

Tabla 7.3 Curvas de Función –Respuesta para Acido Salicílico
(Concentración de Acido acetilsalicílico en $\mu\text{g/ml}$ vs. Relación de alturas)

| $\mu\text{g/ml}$ | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Promedio | Desviación estándar | % C.V. |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|---------------------|--------|
| 2,5 | 0,0784 | 0,0803 | 0,0875 | 0,0888 | 0,0700 | 0,0869 | 0,0820 | 0.0072 | 8,7554 |
| 5 | 0,2004 | 0,1951 | 0,2044 | 0,2004 | 0,1904 | 0,2105 | 0,2002 | 0.0070 | 3,5026 |
| 10 | 0,4284 | 0,413 | 0,4166 | 0,447 | 0,425 | 0,4318 | 0,4270 | 0.0121 | 2,8361 |
| 20 | 0,9576 | 0,8809 | 0,9024 | 0,909 | 0,9405 | 0,9743 | 0,9275 | 0.0358 | 3,8603 |
| 40 | 2,0251 | 1,9782 | 2,0020 | 2,0142 | 2,0000 | 2,0361 | 2,0093 | 0.0205 | 1,0197 |
| 80 | 4,0588 | 3,925 | 4,0239 | 4,025 | 4,0937 | 4,0244 | 4,0251 | 0.0563 | 1,3994 |
| r | 0.9998 | 0.9994 | 0.9998 | 0.9996 | 0.9998 | 0.9994 | 0.9996 | .00019 | |
| m | 0,0516 | 0,0500 | 0,0512 | 0,0511 | 0,0521 | 0,0511 | 0,0512 | | |

m= pendiente. %CV= por ciento de coeficiente de variación

Tabla 7.4. Curvas de Función –Respuesta para Acido Gentísico
(Concentración de Acido acetilsalicílico en $\mu\text{g/ml}$ vs Relación de alturas)

| $\mu\text{g/ml}$ | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Relación Alturas | Promedio | Desviación Estándar | % C.V. |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|---------------------|--------|
| 0,5 | 0,0565 | 0,061 | 0,0505 | 0,0568 | 0,0631 | 0,0585 | 0,0577 | 0.0044 | 7,5410 |
| 1 | 0,105 | 0,1096 | 0,1033 | 0,1148 | 0,1263 | 0,1144 | 0,1122 | 0.0083 | 7,4356 |
| 2 | 0,2305 | 0,205 | 0,2176 | 0,2263 | 0,235 | 0,2235 | 0,2230 | 0.0106 | 4,7653 |
| 4 | 0,4075 | 0,4165 | 0,3636 | 0,3855 | 0,4304 | 0,3832 | 0,3978 | 0.0247 | 6,1994 |
| 8 | 0,8011 | 0,8666 | 0,8452 | 0,8231 | 0,8674 | 0,8126 | 0,8360 | 0.0281 | 3,3574 |
| 16 | 1,65 | 1,6088 | 1,7 | 1,6701 | 1,69 | 1,6875 | 1,6677 | 0.0338 | 2,0282 |
| r | 0.9994 | 0.9986 | 0.9984 | 0.9992 | 0.9998 | 0.9986 | 0.9990 | 0.0005 | |
| m | 0,1022 | 0,1008 | 0,1067 | 0,1037 | 0,1047 | 0,1047 | 0,1038 | | |

m= pendiente. %CV= por ciento de coeficiente de variación

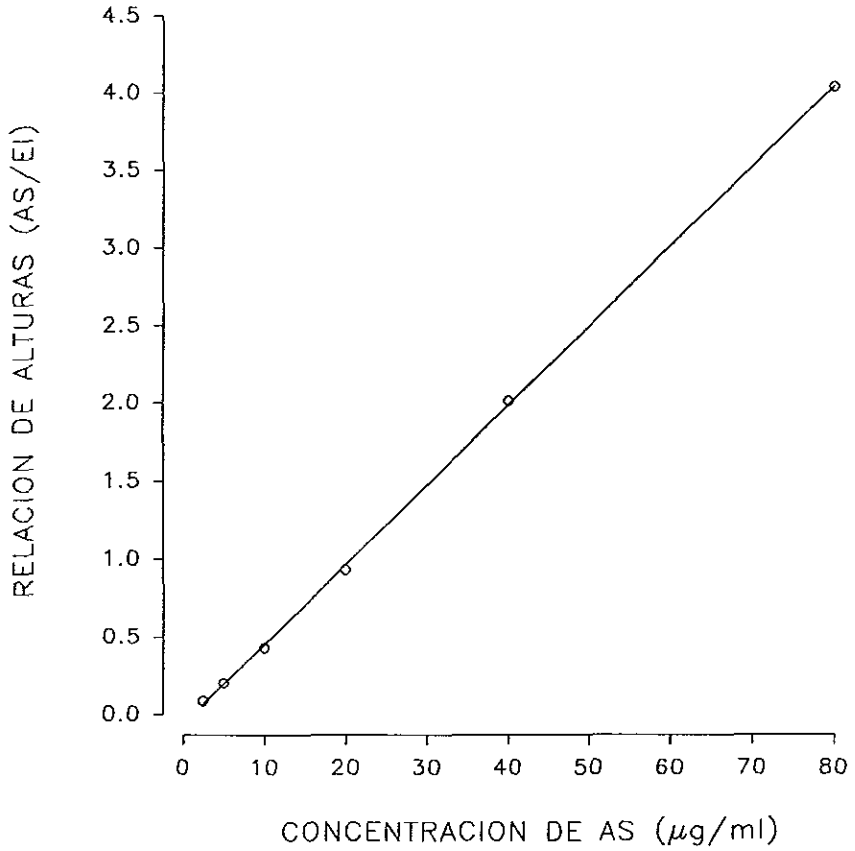


Figura 7.3 Gráfica de la Función-Repuesta para el Acido Salicílico en sangre de rata. Cada punto representa el promedio de seis determinaciones más su error estándar.

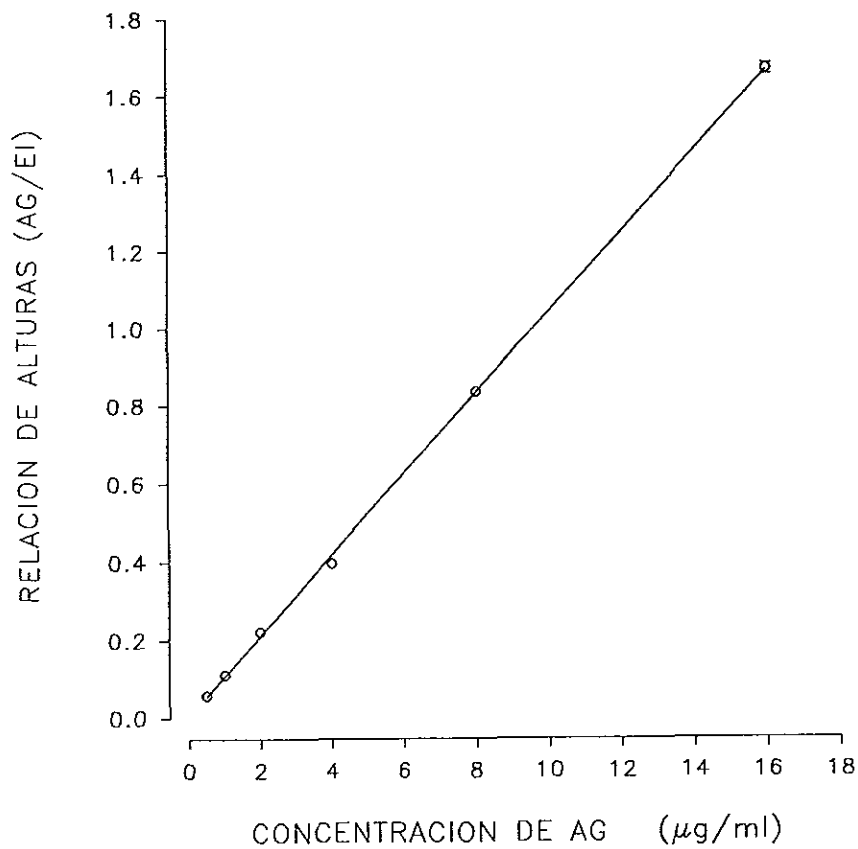


Figura 7 4. Gráfica de la Función- Repuesta para el Acido Gentísico en sangre de rata. Cada punto representa el promedio de seis determinaciones más su error estándar.

Exactitud y Precisión

A La precisión intra análisis determinada para el Acido Acetilsalicílico, Acido Salicílico y Acido Genticónico se presenta en la Tabla 7.5, 7.6 y 7.7

Tabla 7.5 Precisión Intra análisis para Acido Acetilsalicílico

| Conc. Adicionada en $\mu\text{g/ml}$ Teórica | % | % | % | % | % | % | Promedio | Desviación Estándar | % C.V |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|---------------------|---------|
| | Recuperado | Recuperado | Recuperado | Recuperado | Recuperado | Recuperado | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| 0.50 | 63.56 | 103.20 | 109.36 | 103.56 | 110.7 | 103.68 | 98.9967 | 17.6629 | 17.8419 |
| 0.75 | 99.9866 | 97.6933 | 99.7466 | 88.8000 | 98.0533 | 102.72 | 97.8333 | 4.7717 | 4.8774 |
| 3.0 | 98.5066 | 99.0066 | 99.0433 | 90.2433 | 99.1166 | 99.6966 | 97.6022 | 3.6249 | 3.7140 |
| 12.0 | 99.6250 | 96.9241 | 100.615 | 95.3366 | 102.146 | 102.027 | 99.4460 | 2.7787 | 2.7941 |

Tabla 7.6 Precisión Intra análisis para Acido Salicílico

| Conc. Adicionada en $\mu\text{g/ml}$ Teórica | % | % | % | % | % | % | Promedio | Desviación Estándar | % C.V |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|---------------------|--------|
| | Recuperado | Recuperado | Recuperado | Recuperado | Recuperado | Recuperado | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| 2.5 | 112.160 | 113.576 | 101.152 | 119.20 | 112.40 | 105.588 | 110.679 | 6.3693 | 5.7547 |
| 3.5 | 96.9028 | 100.274 | 102.314 | 98.8228 | 103.257 | 102.645 | 100.702 | 2.4921 | 2.4747 |
| 15.0 | 99.896 | 99.7906 | 99.6473 | 99.66 | 100.494 | 100.754 | 100.040 | 0.4687 | 0.4685 |
| 60.0 | 102.253 | 100.882 | 102.287 | 100.459 | 101.957 | 102.282 | 101.686 | 0.8080 | 0.7945 |

Tabla 7.7. Precisión Intra análisis para Acido Gentísico

| Conc. Adicionada en $\mu\text{g/ml}$ Teórica | % Recupero 1 | % Recupero 2 | % Recupero 3 | % Recupero 4 | % Recupero 5 | % Recupero 6 | Promedio | Desviación Estándar | % C.V |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|---------------------|--------|
| 0.50 | 100.82 | 109.48 | 89.26 | 101.4 | 113.52 | 104.66 | 103.190 | 8.3821 | 8.1230 |
| 0.75 | 100.226 | 98.96 | 98.72 | 97.4266 | 100.386 | 101.213 | 99.4889 | 1.3746 | 1.3817 |
| 3.0 | 99.9966 | 97.1233 | 97.52 | 97.8633 | 98.57 | 99.63 | 98.4506 | 1.1635 | 1.1818 |
| 12.0 | 99.6225 | 98.1325 | 97.22 | 101.408 | 99.577 | 100.637 | 99.4331 | 1.5491 | 1.5579 |

B Precisión Inter análisis. En las Tablas 7.8, 7.9 y 7.10 se presentan los resultados obtenidos referidos como por ciento de recobro en diferentes días para la determinación de la precisión inter análisis para el Acido Acetilsalicílico, Acido Salicílico y Acido Gentísico.

Tabla 7.8. Precisión Inter análisis para Acido Acetilsalicílico.

| DIA | | Concentración $\mu\text{g/ml}$ 0.5 | Concentración $\mu\text{g/ml}$ 0.75 | Concentración $\mu\text{g/ml}$ 3.0 | Concentración $\mu\text{g/ml}$ 12.0 |
|--------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | % de Recobro | 116.22 | 101.16 | 108.3566 | 104.2125 |
| | | 124.02 | 99.4666 | 113.7566 | 97.85 |
| 123.80 | | 117.0933 | 96.3866 | 94.1133 | |
| 95.18 | | 115.9733 | 90.11 | 99.7541 | |
| 114.88 | | 102.5066 | 113.4333 | 98.6225 | |
| 95.76 | | 103.2533 | 112.4333 | 95.145 | |
| | Promedio % de Recobro | 111.6433 | 106.5756 | 105.7461 | 98.2813 |
| | Desviación Estándar | 13.0821 | 7.8281 | 10.0686 | 3.6019 |
| | % C V | 11.7178 | 7.3452 | 9.5215 | 3.6649 |

Como se puede observar en los resultados de exactitud y precisión, el coeficiente de variación máximo para la precisión intra análisis fue de 17.8 % y correspondió a la concentración más baja para el Acido Acetilsalicílico (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y para la precisión inter análisis 11.7 % para la misma concentración. Como en ambos casos el coeficiente de variación es menor al 20 %, se dice que el método para cuantificar Acido Acetilsalicílico, Acido Salicílico y Acido Gentísico es preciso según Shah y colaboradores (1992).

Limite de Cuantificación.

El límite de cuantificación para el Acido Acetilsalicílico, Acido Gentísico se fijo de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y para el Acido Salicílico de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, debido a que en ningún experimento llevado a cabo presentaron un coeficiente de variación mayor del 20% de concentración nominal y cumplen con los criterios de aceptación para exactitud, precisión y función-respuesta.

Limite de Detección

El limite de detección determinado para el AAS, y AG correspondió a 0.3 $\mu\text{g/ml}$ y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ para el AS (ver figura 7.5)

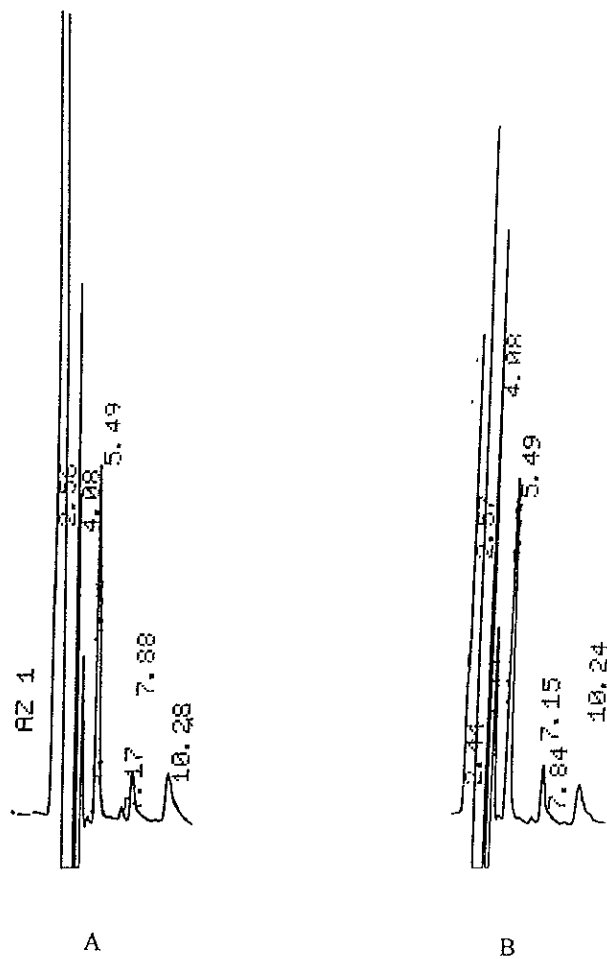


Figura 75. Cromatogramas de salicilatos en sangre de rata. A) AAS, AG y AS en sangre a concentraciones mínimas cuantificables de 0.5 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, B) AAS,AG y AS a concentraciones detectables 0.3 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Estabilidad

a Estabilidad del AAS, AS y AG en sangre de rata.

Los resultados en las tablas 7.11, 7.12 y 7.13 indican que muestras de sangre adicionadas de Acido Acetilsalicílico, Acido Salicílico y Acido Gentísico a tres concentraciones diferentes que fueron inicialmente almacenadas a una temperatura de -70°C y posteriormente a este lapso de tiempo procesadas para su análisis, son estables a hasta por 48 horas

Tabla 7 11 Estabilidad de Acido Acetilsalicílico en muestras de sangre (sin procesar) a las 24 y 48 horas mantenidas a -70°C .

| REPLICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) TEÓRICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) INICIAL | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 24 HORAS/ -70°C | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 48 HORAS/ -70°C |
|---------|--|--|--|--|
| 1 | 0,75 | 0.7631 | 0.7647 | 0.7684 |
| 2 | | 0.7643 | 0.7665 | 0.7633 |
| 3 | | 0.7656 | 0.7659 | 0.7689 |
| | PROMEDIO | 0.7643 | 0.7657 | 0.7669 |
| | C.V. | 0.1636 | 0.1197 | 0.4041 |
| 1 | 3.0 | 3,3897 | 3.3678 | 3.3795 |
| 2 | | 3,2763 | 3,2728 | 3,2759 |
| 3 | | 3,2846 | 3,2897 | 3,2901 |
| | PROMEDIO | 3,3169 | 3,3101 | 3,3152 |
| | C.V. | 1.9058 | 1.5310 | 1.6942 |
| 1 | 12.0 | 11.6269 | 11.6289 | 11.6275 |
| 2 | | 11.7462 | 11.7373 | 11.7467 |
| 3 | | 11.7213 | 11.7220 | 11.7216 |
| | PROMEDIO | 11.6981 | 11.6931 | 11.6986 |
| | C.V. | 0.5380 | 0.5016 | 0.5372 |

Tabla 7.12. Estabilidad de Acido Salicílico en muestras de sangre (sin procesar) a las 24 y 48 horas mantenidas a -70°C .

| REPLICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) TEÓRICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) INICIAL | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 24 HORAS/ -70°C | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 48 HORAS/ -70°C |
|---------|--|--|--|--|
| 1 | 3,5 | 3,4912 | 3,4915 | 3,4905 |
| 2 | | 3,5929 | 3,5942 | 3,593 |
| 3 | | 3,3894 | 3,3887 | 3,3879 |
| | PROMEDIO | 3,4912 | 3,4915 | 3,4905 |
| | C.V | 2,9145 | 2,9429 | 2,9380 |
| 1 | 15 | 14,488 | 14,4888 | 14,4878 |
| 2 | | 14,4842 | 14,483 | 14,4839 |
| 3 | | 14,4861 | 14,4869 | 14,4859 |
| | PROMEDIO | 14,4861 | 14,4862 | 14,4859 |
| | C.V. | 0,0131 | 0,0204 | 0,0135 |
| 1 | 60 | 58,6185 | 58,6413 | 58,6128 |
| 2 | | 61,2155 | 61,199 | 61,2147 |
| 3 | | 59,917 | 59,9134 | 59,9165 |
| | PROMEDIO | 59,9170 | 59,9179 | 59,9165 |
| | C.V. | 2,1672 | 2,1343 | 2,1668 |

Tabla 7.13 Estabilidad de Acido Genticico en muestras de sangre (sin procesar) a las 24 y 48 horas mantenidas a -70°C .

| REPLICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) TEÓRICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) INICIAL | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 24 HORAS/ -70°C | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 48 HORAS/ -70°C |
|---------|--|--|--|--|
| 1 | 0,75 | 0,7262 | 0,7261 | 0,7263 |
| 2 | | 0,7352 | 0,7351 | 0,7351 |
| 3 | | 0,7377 | 0,7376 | 0,7379 |
| | PROMEDIO | 0,7330 | 0,7329 | 0,7331 |
| | C.V. | 0,8251 | 0,8252 | 0,8257 |
| 1 | 3 | 3,1415 | 3,1402 | 3,1407 |
| 2 | | 3,106 | 3,1058 | 3,1053 |
| 3 | | 3,1013 | 3,101 | 3,1012 |
| | PROMEDIO | 3,1163 | 3,1157 | 3,1157 |
| | C.V. | 0,7053 | 0,6863 | 0,6971 |
| 1 | 12 | 13,1442 | 13,146 | 13,1445 |
| 2 | | 13,1621 | 13,1613 | 13,1617 |
| 3 | | 13,5238 | 13,1527 | 13,1536 |
| | PROMEDIO | 13,2767 | 13,1533 | 13,1533 |
| | C.V. | 1,6132 | 0,0583 | 0,0654 |

b. Estabilidad del AAS, A S y AG en muestras procesadas

En las tablas 7.14, 7.15 y 7.16 se presentan los resultados de cuantificación obtenidos al realizar la estabilidad del Acido Acetilsalicílico, Acido Salicílico y Acido Gentísico de muestras procesadas listas para ser inyectadas al cromatografo, a tres concentraciones diferentes y determinadas inmediatamente después de ser preparadas (condición inicial) y a las 24 y 48 horas, éstas ultimas resguardadas a una temperatura de -38°C .

Tabla 7.14. Estabilidad de Acido Acetilsalicílico en muestras listas para el análisis a las 24 y 48 horas mantenidas a -38°C .

| REPLICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) TEORICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) INICIAL | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 24 HORAS/ -38°C | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 48 HORAS/ -38°C |
|---------|--|--|--|--|
| 1 | 0,75 | 0,7688 | 0,7056 | 0,8981* |
| 2 | | 0,7744 | 0,7139 | 0,8916* |
| 3 | | 0,7631 | 0,7797 | 0,8628* |
| | PROMEDIO | 0,7688 | 0,7331 | 0,8842 |
| | C.V. | 0,7350 | 5,5381 | 4,8153 |
| 1 | 3,0 | 3,403 | 2,9282* | 3,079* |
| 2 | | 3,373 | 3,1445* | 3,0692* |
| 3 | | 3,3897 | 2,9465* | 2,8928* |
| | PROMEDIO | 3,3886 | 3,0064 | 3,0137 |
| | C.V. | 0,4436 | 3,9897 | 3,4771 |
| 1 | 12,0 | 11,8347 | 11,7572 | 11,5774 |
| 2 | | 11,4174 | 11,9825 | 11,6526 |
| 3 | | 11,626 | 12,3378 | 11,5616 |
| | PROMEDIO | 11,6260 | 12,0258 | 11,5972 |
| | C.V. | 1,7947 | 2,4341 | 0,4193 |

*Diferencia significativa con respecto a la concentración inicial $p < 0.05$ por t de Dunnett

Tabla 7.15. Estabilidad de Acido Salicilico en muestras listas para el análisis a las 24 y 48 horas mantenidas a -38°C

| REPLICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) TEORICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) INICIAL | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 24 HORAS/ -38°C | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 48 HORAS/ -38°C |
|---------|--|--|--|--|
| 1 | 3,5 | 3,4912 | 3,4585 | 3,2970* |
| 2 | | 3,5421 | 3,4954 | 3,2738* |
| 3 | | 3,3894 | 3,5342 | 3,2699* |
| | PROMEDIO | 3,4742 | 3,4960 | 3,2802 |
| | C.V. | 2,2379 | 1,0828 | 0,4466 |
| 1 | 15 | 14,4899 | 15,7471 | 15,047 |
| 2 | | 14,4804 | 15,6488 | 16,235 |
| 3 | | 14,488 | 14,3306 | 14,484 |
| | PROMEDIO | 14,4861 | 15,2422 | 15,2553 |
| | C.V. | 0,0347 | 5,1893 | 5,8596 |
| 1 | 60 | 59,917 | 58,7654 | 58,3776 |
| 2 | | 59,2988 | 57,98 | 57,9952 |
| 3 | | 60,1658 | 60,8091 | 60,197 |
| | PROMEDIO | 59,7939 | 59,1848 | 58,8566 |
| | C.V. | 0,7466 | 2,4676 | 1,9989 |

*Diferencia significativa con respecto a la concentración inicial $p < 0.05$ por t de Dunnett.

Tabla 7.16. Estabilidad de Acido Genticico en muestras listas para el análisis a las 24 y 48 horas mantenidas a -38°C .

| REPLICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) TEORICA | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) INICIAL | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 24 HORAS/ -38°C | CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) 48 HORAS/ -38°C |
|---------|--|--|--|--|
| 1 | 0,75 | 0,7296 | 0,8136* | 0,8103* |
| 2 | | 0,7329 | 0,8306* | 0,814* |
| 3 | | 0,7262 | 0,8329* | 0,8074* |
| | PROMEDIO | 0,7296 | 0,8257 | 0,8106 |
| | C.V. | 0,4592 | 1,2767 | 0,4081 |
| 1 | 3 | 3,09 | 3,1565 | 3,2187 |
| 2 | | 2,9991 | 3,166 | 2,8998 |
| 3 | | 3,1415 | 3,1469 | 2,9109 |
| | PROMEDIO | 3,0769 | 3,1565 | 3,0098 |
| | C.V. | 2,3434 | 0,3026 | 6,0136 |
| 1 | 12 | 13,0318 | 12,2804 | 13,1931 |
| 2 | | 13,1621 | 12,233 | 12,2012 |
| 3 | | 12,9613 | 11,9678 | 12,1759 |
| | PROMEDIO | 13,0517 | 12,1604 | 12,5234 |
| | C.V. | 0,7805 | 1,3854 | 4,6322 |

*Diferencia significativa con respecto a la concentración inicial $p < 0.05$ por t de Dunnett.

7.2. Segunda Fase. Estudios Farmacocinéticos.

Estudio Agudo

Los perfiles promedio de las concentraciones sanguíneas contra el tiempo para el AAS y AS, se ilustran en las figuras 7.6 y 7.7

En la figura 7.6 se puede observar que cuando se administró el extracto de chile a la dosis de 300 mg/kg no fue posible detectar AAS, mientras que cuando se administró la dosis de 100 mg/kg de chile los parámetros farmacocinéticos del AAS no sufrieron cambios significativos respecto al grupo control como lo muestra la tabla 7.17

Para el AS se observa un efecto dosis dependiente (figura 7.7) que se manifiesta sobre el ABC y la C_{max} obtenidos en los experimentos (tabla 7.18). Presentando, diferencias significativas ($p < 0.05$) en estos parámetros con respecto al grupo control

La cinética del AAS y del AS cambió significativamente después de la administración intragástrica del extracto de chile a la dosis de 300 mg/kg (tablas 7.17 y 7.18).

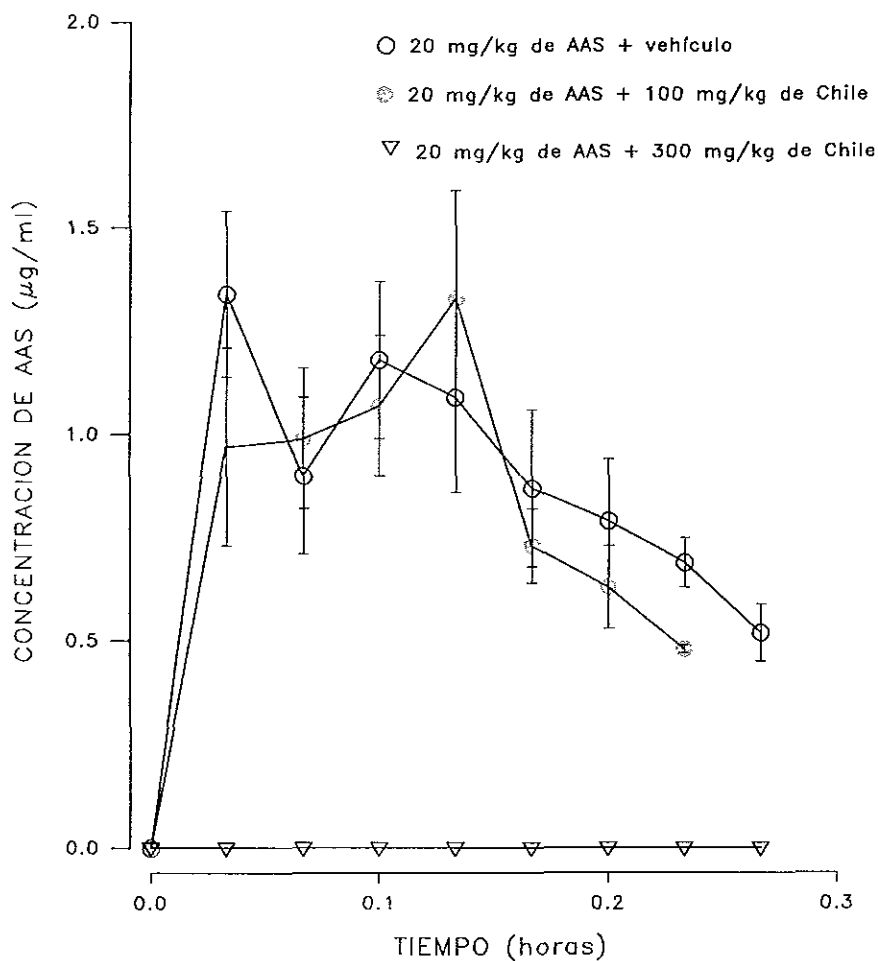


Figura 7.6. Perfil de la concentración plasmática promedio de AAS vs. tiempo para el estudio agudo después de la administración oral de 20 mg/kg de AAS (○), después de la administración simultánea de AAS 20 mg/kg y extracto de Chile 100 mg/kg (●) y 300 mg/kg (▽). Cada símbolo representa la media de 6 experimentos \pm el error estándar de la media.

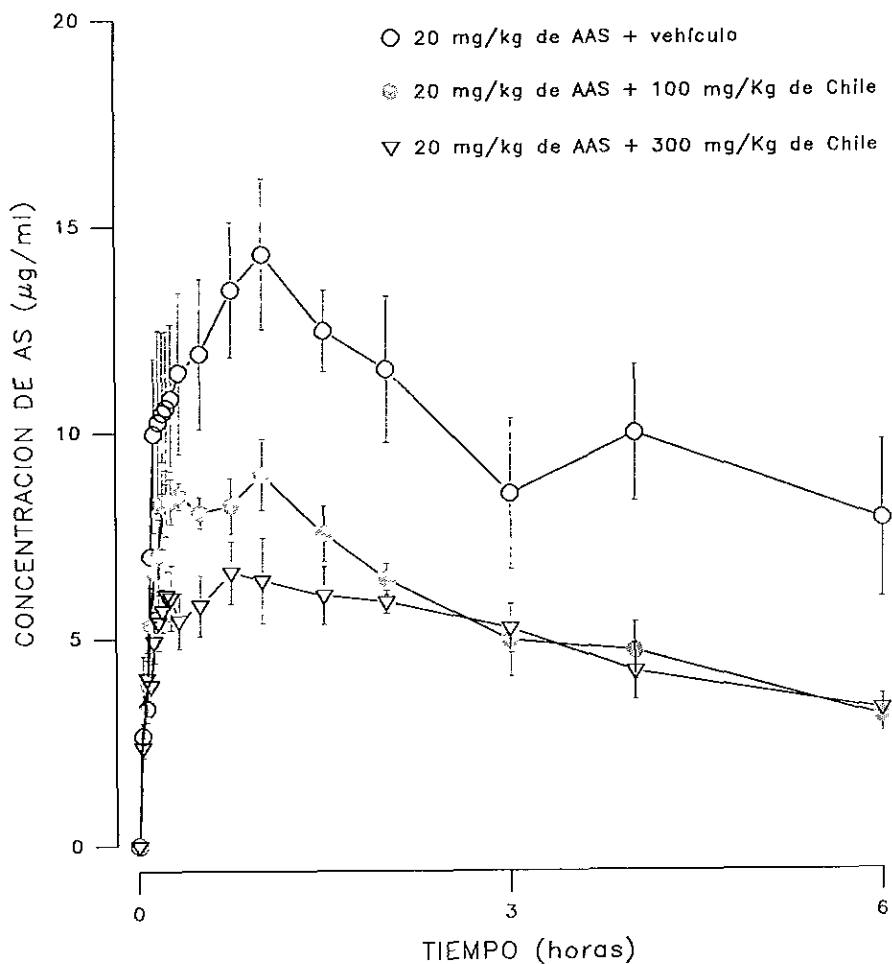


Figura 7.7. Perfil de la concentración plasmática promedio de AS vs. tiempo para el estudio agudo, después de la administración oral de 20 mg/kg de AAS (○), después de la administración simultánea de AAS 20 mg/kg y extracto de Chile 100 mg/kg (◻) y 300 mg/kg (▽). Cada símbolo representa la media de 6 experimentos ± el error estándar de la media.

Tabla 7.17. Parámetros Farmacocinéticos (promedio de seis determinaciones \pm error estándar) de Acido Acetilsalicílico después de una administración única de Acido Acetilsalicílico (20 mg/Kg) simultáneamente con una dosis de extracto de Chile.

| | ABC* ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$) | Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | tmax (min) |
|--------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------|
| Grupo Control | 12 92 \pm 2 56 | 1.42 \pm 0.20 | 4.33 \pm 1.50 |
| Grupo 100 mg/kg de Extracto de Chile | 11.95 \pm 1.28 | 1.60 \pm 0.23 | 6 67 \pm 0.99 |
| Grupo 300 mg/kg de Extracto de Chile | ** | ** | ** |

* Calculada por método trapezoidal, **No se detecto fármaco

Tabla 7.18. Parámetros Farmacocinéticos (promedio de seis determinaciones \pm error estándar) de Acido Salicílico después de una administración única de Acido Acetilsalicílico (20 mg/Kg) simultáneamente con una dosis de extracto de Chile.

| | ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$) | Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | tmax (min) |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------|
| Grupo Control | 3745 96 \pm 2.56 | 14 74 \pm 1.58 | 65.00 \pm 5.00 |
| Grupo 100 mg/kg de Extracto de Chile | 2018.54 \pm 194.13* | 10.69 \pm 0 40* | 21.67 \pm 7.84 |
| Grupo 300 mg/kg de Extracto de Chile | 1521 06 \pm 223 43* | 7.10 \pm 0.82* | 46.00 \pm 17.66 |

* $p < 0.05$ comparado contra el control (t Dunnett)

Estudio crónico

En las figuras 7.8 se presentan los gráficos de los cursos temporales de las concentraciones sanguíneas promedio para el Acido Acetilsalicílico y en la figura 7.9 los correspondientes para el Acido Salicílico, obtenidos en el estudio del efecto de la ingesta crónica del extracto de chile

Observándose una disminución significativa en la concentración de AS con respecto al control (figura 7.9). En la figura 7.8 se observa que el extracto de chile a las dos dosis evaluadas tiene un efecto drástico sobre la absorción del AAS, ya que no se detecto este farmaco en la sangre de rata a ningún tiempo.

Las tablas 7.19 y 7.20, se presentan los parámetros farmacocinéticos determinados para Acido Acetilsalicílico y Acido Salicílico respectivamente después del tratamiento crónico, señalándose las diferencias significativas que se encontraron en cada caso.

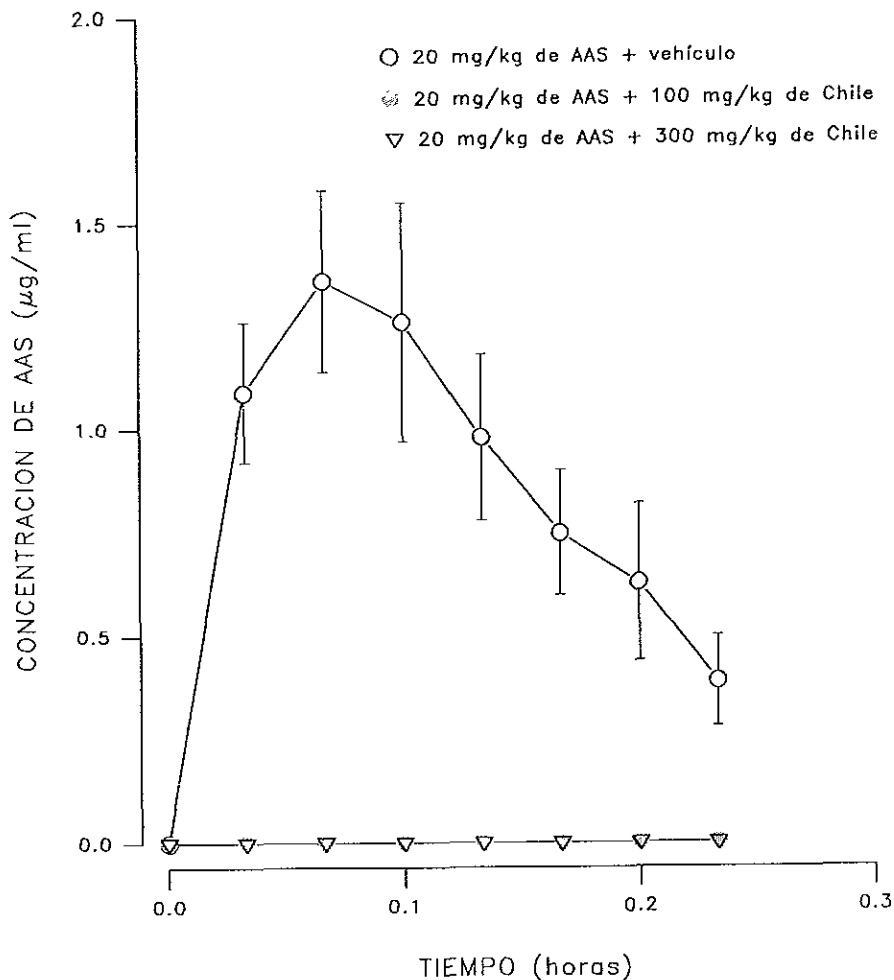


Figura 7.8. Perfil de la concentración plasmática promedio de AAS. vs. tiempo para el estudio crónico, después de la administración oral de 20 mg/kg de AAS (○) después de la administración simultánea de AAS 20 mg/kg y extracto de Chile 100 mg/kg (◻) y 300 mg/kg (▽). Cada símbolo representa la media de 6 experimentos \pm el error estándar de la media.

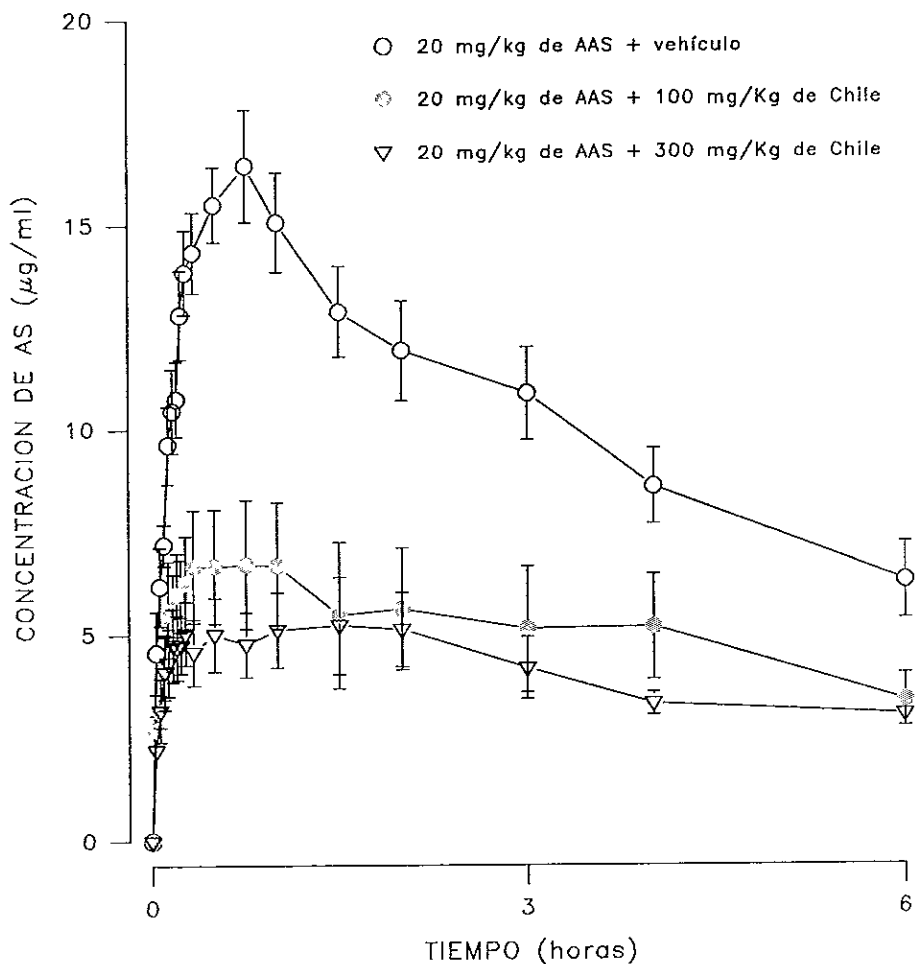


Figura 7.9. Perfil de la concentración plasmática promedio de AS vs. tiempo para el estudio crónico, después de la administración oral de 20 mg/kg de AAS (○), después de la administración simultánea de AAS 20 mg/kg y extracto de Chile 100 mg/kg (◐) y 300 mg/kg (▽). Cada símbolo representa la media de 6 experimentos ± el error estándar de la media.

Tabla 7.19. Parámetros Farmacocinéticos (promedio de seis determinaciones \pm error estándar) de Acido Acetilsalicílico después de una administración única de Acido Acetilsalicílico (20 mg/Kg) y dosis de extracto de chile administrada en forma *crónica*

| | ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$) | Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | tmax (min) |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------|
| Grupo Control | 12.01 \pm 1.45 | 1.56 \pm 0.12 | 4.33 \pm 0.33 |
| Grupo 100 mg/kg de Extracto de Chile | * | * | * |
| Grupo 300 mg/kg de Extracto de Chile | * | * | * |

* No se detecto fármaco

Tabla 7.20. Parámetros Farmacocinéticos (promedio de seis determinaciones \pm error estándar) de Acido Salicílico después de una administración única de Acido Acetilsalicílico (20 mg/Kg) y dosis de extracto de chile administrada en forma *crónica*

| | ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$) | Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | tmax (min) |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------|
| Grupo Control | 3816.71 \pm 290.16 | 17.01 \pm 1.33 | 52.50 \pm 3.35 |
| Grupo 100 mg/kg de Extracto de Chile | 1694.48 \pm 481.86* | 7.82 \pm 1.28* | 28.17 \pm 8.08 |
| Grupo 300 mg/kg de Extracto de Chile | 1059.84 \pm 265.75* | 5.85 \pm 0.82* | 54.33 \pm 14.19 |

* $p < 0.05$ comparado contra el control (t Dunnett)

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Primera Fase

Se validó un método para separar y cuantificar simultáneamente al ácido acetilsalicílico (AAS) y dos de sus metabolitos ácido salicílico (AS) y ácido gentísico (AG) en muestras de sangre de rata por cromatografía líquida de alta resolución. El cual presenta principalmente la ventaja de emplear un volumen pequeño de muestra para el análisis (100 μ l de sangre), lo que facilita obtener cursos temporales de la cinética del fármaco en un mismo animal (ya que el volumen extraído no rebasa los 2 ml) con lo que no se corre el riesgo de provocar cambios hemodinámicos que pudieran afectar la determinación de los parámetros farmacocinéticos

En la figura 7.1 se presenta un cromatograma obtenido de la inyección de una muestra de sangre libre de salicilatos (blanco), otra con la inclusión de los mismos y una más obtenida después de la administración de AAS, los tiempos de retención del AG 4.9 min, AAS, 7.1 min y AS 10.0 min, indican una resolución adecuada (mayor al 1.5) y como se aprecia en los cromatogramas es mínima la presencia de sustancias endógenas que interfieren con los picos de los salicilatos, considerándose específico el método.

Con el fin de evaluar la función-respuesta del método, se efectuaron curvas de calibración para cada uno de los salicilatos, obteniéndose curvas patrón con un comportamiento del tipo $y = a + bx$ para relacionar las concentraciones de AAS, AS y AG presentes en sangre de rata con la respuesta del sistema, cuyos coeficientes de determinación promedio (r^2) entre la cantidad adicionada con la relación de alturas de los picos fueron para AAS, $r^2=0.9999$, AS, $r^2=0.9996$ y AG, $r^2=0.9990$, cumpliendo con los criterios de aceptación junto con los demás parámetros (Shah, *et al.*, 1992) para la evaluación de la función-respuesta como se observa en las tablas 7.2, 7.3 y 7.4.

Con respecto a la precisión (intra análisis e inter análisis) y exactitud del método se

calcularon los coeficientes de variación (CV), como criterio de evaluación para determinar dichos parámetros en los cuatro niveles de concentración probados, encontrándose que el % CV máximo para la precisión intra análisis e inter análisis fue del 17.8% y 11.7%, respectivamente y correspondieron a la concentración mínima para AAS, como en ambos casos se cumple con el criterio de aceptación (CV menor al 20%) por lo que el método para cuantificar AAS, AS y AG se considera preciso y exacto (Shah *et al.*, 1992).

Las cantidades fijadas como límites de cuantificación en el método de 0.5 µg/ml para AAS y AG y 2.5 µg/ml para el AAS, cumplieron los criterios de aceptación de exactitud y precisión del método (Shah *et al.*, 1992), mientras que la cantidad mínima detectable en sangre de rata fue de 0.3 µg/ml para el AAS,AG y 1.5 µg/ml para el AS, en todos los casos dichos valores fueron obtenidos al determinar la señal-ruido (2:1) de concentraciones por debajo del límite de cuantificación de los fármacos, (Shah *et al.*, 1992 y ICH, 1997) como se puede observar en la figura 7.5.

Por otra parte la estabilidad fue evaluada como:

a) Estabilidad de los fármacos en muestras de sangre.

En muestras de sangre de rata adicionadas con AAS,AS y AG a tres concentraciones conservadas por un lapso de 24 y 48 horas a -70°C y posteriormente procesadas para el análisis como lo indica el método, el AAS, AS y AG en sangre de rata fueron estables a -70°C por un período de 48 horas (tablas 7.11 a 7.13).

b) Estabilidad del AAS,AS y AG en muestras procesadas.

Los fármacos en las muestras procesadas listas para ser inyectadas al sistema cromatográfico que se almacenaron por 24 y 48 horas a -38°C, fueron igualmente estables solamente a 48 horas a concentraciones mayores de 0.75 µg/ml, 3 µg/ml y 3.5 µg/ml para AG, AAS y AS respectivamente (tabla 7.14 a 7.16).

Es importante mencionar que considerando los resultados de la estabilidad en la validación del método, se estableció que todas las muestras tomadas en los experimentos deberían ser analizadas en un lapso no mayor de 48 horas siempre y cuando las muestras sin procesar se conservaran a -70°C

Aún cuando se validó el método cromatográfico para separar y cuantificar simultáneamente al ácido acetilsalicílico y dos de sus metabolitos, el ácido salicílico y el ácido gentísico, en las muestras de sangre de los animales que fueron tratados con AAS no se logra detectar ácido gentísico en ningún caso

Segunda Fase

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos ABC, C_{\max} para el AAS y AS en los grupos, del estudio agudo y del estudio crónico (tablas 7.17-7.18 y 7.19-7.20, respectivamente). Cabe señalar que desde el primer tiempo de muestreo (2 min), se obtuvieron niveles apreciables de AAS y AS, siendo mayores los niveles de éste último, lo que se explica por la biotransformación del AAS a AS (Hatori et al., 1983 e Iwamoto et al., 1982)

Para la dosis de 100 mg/kg del extracto de chile administrado en forma aguda, se observa un aumento en la C_{\max} y una disminución de las concentraciones sanguíneas que no alcanza significancia estadística con respecto al control, sin embargo, en la dosis de 300 mg/kg del extracto de chile ya no fue posible detectar concentraciones sanguíneas de AAS a ningún tiempo, lo que indicaría una inhibición total de la absorción o un aumento en la velocidad de hidrólisis en el tracto gastrointestinal (Hatori et al., 1983 e Iwamoto et al., 1982).

En la figura 7.7 se observa que la influencia de la ingesta aguda del extracto de chile es dosis-dependiente sobre los parámetros de absorción del AS (C_{\max} y ABC, tabla 7.18)

Dado que la absorción del AS y AAS no disociado se realiza por difusión pasiva a través de

las membranas gastrointestinales y por tal motivo recibe la influencia del pH gástrico (Insel, 1996), entonces la disminución significativa en la absorción del AAS y AS por la administración simultanea del extracto de chile puede explicarse, de manera general por los cambios en la acidez gástrica provocados por la capsaicina presente en el extracto de chile. Limlomwongse y colaboradores (1979) describen que la capsaicina induce el aumento de la secreción ácida y la hiperemia en la mucosa gástrica, a dosis similares a las empleadas en este estudio. Aunado a esto, la posible disminución en la concentración de fármaco en el lumen del tracto gastrointestinal promovida por un aumento en el volumen de fluido gástrico, provocaría que la velocidad de difusión de los fármacos a través de las membranas capilares del tracto gastrointestinal se modificara y por lo tanto su absorción, ya que esta en función del gradiente de concentración a través de la membrana ($C_{LUMEN\ GI} - C_{SANGRE}$). Hatakeyama y colaboradores (1995) describen que la capsaicina promueve un aumento en el volumen de fluido gástrico que deriva en una dilución luminal, al disminuir el vaciamiento gástrico, este retardo en el vaciamiento gástrico pudo provocar para el AAS, un mayor tiempo de permanencia en el estómago, implicando que dada su inestabilidad en los fluidos gástricos, se haya hidrolizado rápidamente a AS, provocando la disminución de la absorción del AAS

Se esperaría un aumento en la concentración de AS después de la hidrólisis del AAS, sin embargo, no se refleja en los datos, posiblemente debido a que la concentración del AAS para un mismo tiempo de muestreo, representa aproximadamente el 10 % de la concentración del AS, valor que pudo quedar enmascarado por el error estándar que se tiene en los experimentos, esto es, por ejemplo para el tiempo 10 min los niveles de AAS son del orden de 0.76 $\mu\text{g/ml}$ y para AS de 7.04 $\mu\text{g/ml}$ en los experimentos con dosis de chile de 100 mg/kg

Por otro lado, la cantidad de AS disponible para la absorción pudo sufrir una dilución significativa al aumentar el fluido gastrointestinal, provocando que exista menor cantidad de fármaco disponible para ser absorbido, reflejándose en la disminución total del fármaco

absorbido como lo indican las ABC obtenidas (tabla 7.18 y Fig. 7.7).

Por otro lado, para el estudio crónico no se observaron alteraciones físicas y/o de comportamiento en los animales tratados con el extracto de chile a los que se les pudieran atribuir los cambios significativos obtenidos en los parámetros farmacocinéticos después de la administración única de AAS.

Al comparar las concentraciones sanguíneas de AAS obtenidas del grupo control con las de las dosis de 100 y 300 mg/kg de extracto de chile administrados en forma crónica, no se observa absorción del fármaco, al no detectarse concentraciones sanguíneas de AAS en ninguno de los animales tratados con las dosis del extracto de chile, como se observa en la figura 7 8.

Para el caso del AS se observó que los parámetros de ABC y C_{max} disminuyeron de manera dosis dependiente con la ingesta de chile en forma crónica, del mismo modo que se observa para el caso del estudio agudo (Figura 8.1 y 8.2) El efecto sobre el ABC y C_{max} del AS en el estudio crónico es ligeramente mayor que en el estudio agudo, sin embargo, no se alcanza una diferencia estadística significativa entre parámetros del estudio agudo y crónico (Figura 8 1 y 8.2), lo que lleva a postular que el efecto principal del extracto de chile es sobre el AAS al presentarse un aumento de la hidrólisis en el tubo digestivo, debido a que la capsaicina contenida en el extracto de chile administrada en forma crónica induce una disminución en el vaciamiento gástrico (Hatakeyama *et al.*, 1995) y que aunado a un aumento de la secreción gástrica (Limlomwongse *et al.*, 1979) promueve la hidrólisis a AAS a AS, el cual se logra absorber pero en menor cantidad en presencia del extracto de chile Este hecho prevalece sobre el de la velocidad de tránsito y superficie de contacto en el tracto gastrointestinal, ya que la capsaicina, también a estas dosis se ha reportado que *inhibe la motilidad gástrica* (Takeuchi y colaboradores, 1991).

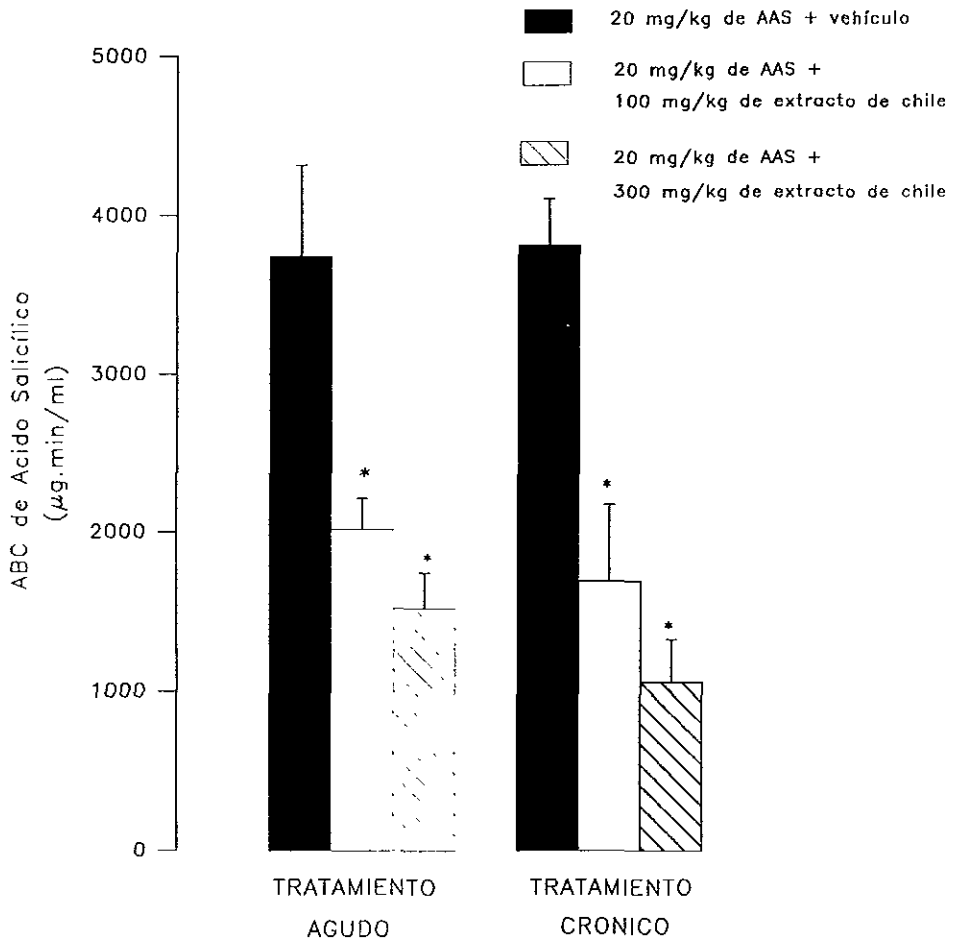


Figura 8.1. Efecto de la ingesta de chile sobre el ABC del AS, después de la administración oral aguda y crónica de 20 mg/kg de AAS , después de la administración simultánea de AAS 20 mg/kg y extracto de chile 100 mg/kg y 300 mg/kg . Cada barra representa la media de 6 experimentos \pm el error estándar de la media.

* $p < 0.05$ comparado contra el control (t Dunnett).

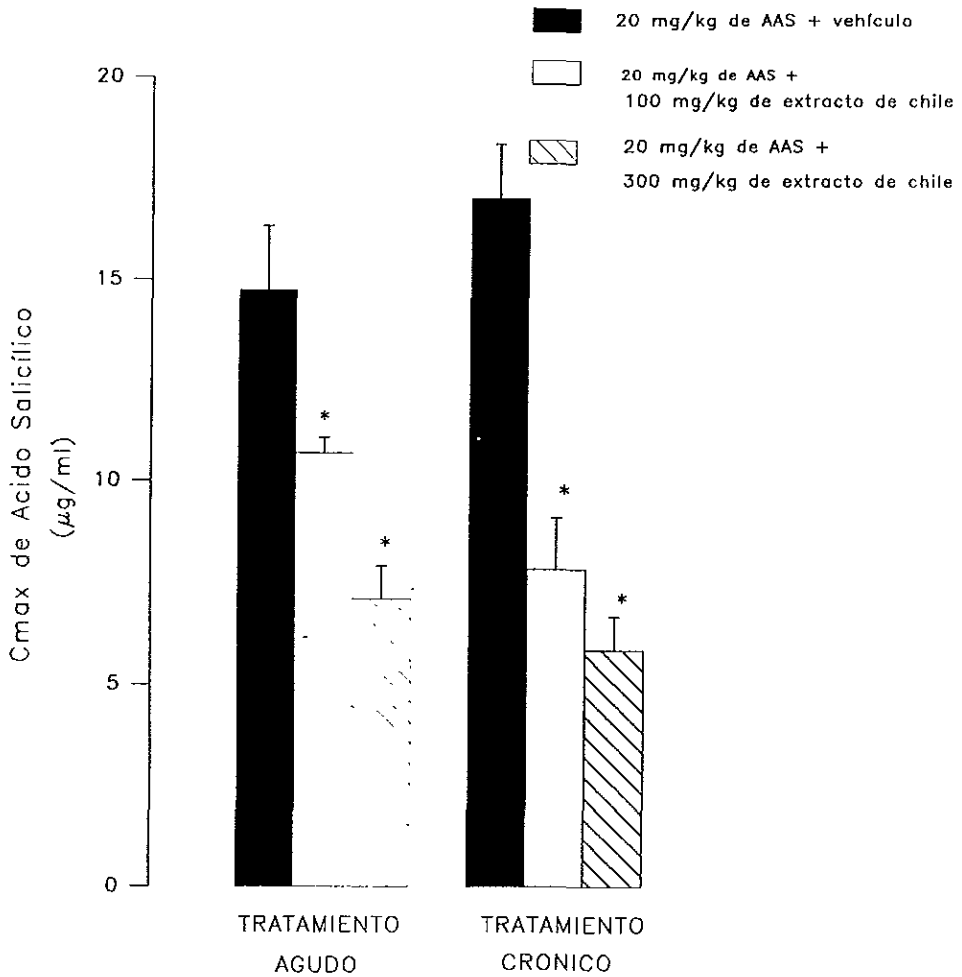


Figura 8.2. Efecto de la ingesta de chile sobre la Cmax del AS, después de la administración oral aguda y crónica de 200 mg/kg de AAS , después de la administración simultánea de AAS 20 mg/kg y extracto de chile 100 mg/kg y 300 mg/kg . Cada barra representa la media de 6 experimentos \pm el error estándar de la media.

* $p < 0.05$ comparado contra el control (t Dunnett)

Por otro lado, cabe hacer mención que las concentraciones sanguíneas de AS en todos los grupos, tanto en los controles como en los tratados, disminuyen en aproximadamente 45 % comparadas con las C_{max} de AS de este, después de 6 horas y sigue sin cambios hasta las 10 horas (datos no presentados y obtenidos en estudios piloto realizados). Esto se puede atribuir a que siguiendo la biotransformación del AS y su conversión a su mayor metabolito (ácido salicílico) es un proceso saturable (Drogoole y Furst, 1992), lo que nos impide conocer la vida media de eliminación del AS o a que en la rata la eliminación es muy lenta.

Además de los mecanismos que participan en las alteraciones en la fase de absorción del AAS y AS con la ingesta del extracto de chile en forma aguda o crónica, pueden existir otros mecanismos que influyan en la distribución y eliminación de los mismos, y que pueden ser atribuidos también a la ingesta de capsaicina. Entre estos tenemos a las alteraciones en flujo sanguíneo como consecuencia del consumo de capsaicina. Limlomwongse *et al.*, (1979); Holzer *et al.*, (1989) y Holzer y Lippe (1988) reportan un aumento en el flujo sanguíneo de la mucosa por estimulación de las terminaciones nerviosas aferentes en la pared gástrica tras la administración intragástrica de la capsaicina, que bien pudiera afectar la absorción pasiva de los fármacos debido a la disminución del gradiente de concentración trasluminal como lo indica Toothaker y Welling (1980) y posterior distribución, afectando paralelamente los mecanismos de biotransformación y eliminación, enfatizando este hecho al determinar tanto en los tratamientos agudos y crónicos una modificación en la velocidad de absorción y biotransformación reflejada por la disminución de C_{max} alcanzadas y la modificación significativa de la cantidad de fármaco que se absorbió y se biotransformó como lo indica el ABC tanto para el AAS como en el AS.

Por otro lado Mann (1997) y Szoleszanyi y Barthó (1981) indican que la capsaicina administrada por vía oral en forma aguda y crónica esta asociada a daño gástrico lo que implicaría cambios en la absorción del AAS y AS sin embargo, en nuestro estudio este factor se descarta, debido a que todos los animales en estudio, una vez finalizado el

muestreo de sangre, se sacrificaron y el estómago fue disecado para evaluar el daño gástrico y en ningún caso se presentó daño gástrico apreciable en la mucosa gástrica, después de la administración aguda o crónica del extracto de Chile.

El mecanismo fisiológico de acción del componente picante del extracto de Chile (capsaicina) al cual se le atribuyen las consecuencias observadas en nuestro estudio, puede explicarse por las evidencias que indican que el sistema nervioso autónomo del tracto gastrointestinal contiene neuronas aferentes primarias sensibles a la capsaicina, las cuales en el duodeno e intestino delgado están involucradas en la activación de las alteraciones en el tracto gastrointestinal como flujo sanguíneo, motilidad, secreción gástrica, etc., a través de la liberación de péptidos (Nassar *et al.*, 1995; Holzer & Lippe, 1988; Holzer *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1991; Dugani y Glavin, 1986)

Las diferencias en la velocidad de absorción gastrointestinal mostradas por el C_{max} , que presentan en el estudio crónico y agudo para el AS como se observa claramente en las figuras 8 1 y 8 2, y donde a mayor dosis de Chile el efecto es más notorio para el AAS (figura 7 8), tienen un pronunciado efecto sobre la magnitud de absorción de los mismos y el tiempo para alcanzar los niveles máximos de fármaco en el organismo, en el caso de la aspirina la cual es hidrolizada rápidamente.

Esto último puede tener implicaciones clínicas importantes, para aquellos sujetos que consumen de manera cotidiana altas cantidades de Chile, ya que puede existir diferencia en la duración del efecto analgésico de la aspirina y del ácido salicílico, debido a que la inhibición enzimática irreversible es debida a la acetilación de ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), a diferencia del ácido salicílico que inhibe a la enzima de forma reversible como los otros antiinflamatorios no esteroideos. Por otro lado, las plaquetas son especialmente sensibles a la inactivación irreversible de la ciclooxigenasa mediada por la aspirina, dado que las plaquetas no regeneran la enzima ciclooxigenasa, la aspirina inhibe a la COX plaquetaria por un tiempo igual a la vida de las plaquetas (8- 11 días), esta

inhibición esta relacionada con la inhibición presistémica de la COX en la circulación porta antes que la aspirina sea desacetilada en el hígado hasta dar el salicilato. Si la hidrólisis de la aspirina ocurre antes de absorberse, el efecto benéfico en la prevención secundaria de enfermedades coronarias por la inhibición de la ciclooxigenasa plaquetaria podría no observarse en las personas que consuman cotidianamente cantidades apreciables de chile, sin embargo se requiere de estudios adicionales para demostrar esto

IX. CONCLUSIÓN

- 1 El método cromatográfico propuesto para la separación y cuantificación de AAS, AS y AG en micromuestras de sangre de rata, cumple con los criterios de validación lo cual lo hace confiable para poder ser utilizado en estudios de biodisponibilidad y farmacocinética.
- 2 La administración simultánea de 20 mg/kg de AAS y un extracto de chile a dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg de forma aguda o crónica, modifica significativamente la farmacocinética de la aspirina, promoviendo la hidrólisis del AAS y disminuyendo la absorción de AS en forma dosis dependiente.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, K.E. (1979). Nutrition and oxidative drug metabolism in man: relative influence of dietary lipids, carbohydrate, and protein. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 26:493-501.
- Arms, D.A. y Trovis C C (1988). Reference Physiological Parameters in Pharmacokinetic Modeling. Office of Health and Environmental Assessment Office of Research and Development. Washington D.C.2-1 y 3-1.
- Benet, Z.L, Jerry R y Sheiner L.B. (1996) Pharmacokinetics: dynamics of absorption, distribution and elimination of drugs. En Goodman & Gilman (Eds). "The pharmacological basis of therapeutics", 9th edition, 3-28.
- Brodie, M.J y Berg, J.L. (1980) Drug metabolism in white vegetarians *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 9:523-525.
- Castañeda, H.G ,Hoyo, V C, Palma A.A, Flores M.F.J. (1992). Pharmacokinetics of oral Nifedipine in different populations. *J.Clin.Pharmacol* , 32.140-145.
- Carter, B.R (1991). Topical Capsaicin in the treatment of Cutaneous Disorders. *Drug Dev. Res* , 22 109-123.
- Chandler, H.M y Blouin, R A. (1990). Dietary Influences on drug disposition En Evans E W , Schentag J.J y Jusko J W (Eds) "Applied Pharmacokinetics Principles of Therapeutics Drug Monitoring" 3th ed, Applied Therapeutics, Inc , USA, 1201-1216.

- CIPAM, "Métodos Analíticos, Validación" (1990): Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación Dirección General de Control de Insumos para la Salud México.
- Dromgoole, S.H y Furst E.D. (1992), Salicylates. En Evans E.W, Schentay J.J y Jusko J W (Eds) "Applied Pharmacokinetics Principles of Therapeutic Drug Monitoring" Applied Therapeutics Inc , USA, 32-1 a 32-12.
- Dugany, M.A y Glavin B (1986). Capsaicin effects on stress pathology and gastric acid secretion in rats. *Life Sci.*, 39.1531-1538
- Endrenyi, L (1989) Pharmacokinetics En Harol K y Roschlou W.H., (Eds) "Principles of Medical Pharmacology" 5th ed, B C.Decker Inc., USA, 49-50.
- Endrenyi, L. Fritsch S. y Yan W. (1991) C_{max}/AUC is a clearer measure in investigations of bioequivalence. *Int. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 29(10):394-399
- Evans, W.C. (1990): Farmacognosia 13ª. Ed Interamericana, México, 408-410
- Fagan, T.C. (1987). Increased clearance of propranolol and theophylline by high-protein compared with high-carbohydrate diet *Clin. Pharmacol. Ther.* , 41.402-406
- Flórez, J (1992). Fármacos analgésicos, antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos En Flórez J, Armijo J A y Medilla A (Eds.) " Farmacología Humana" 2ª. Ed Salvat, España, 323.
- Gibaldi, M. (1993) Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. 4th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, 24-39

- Hatakeyama, Y., Matsuo M, Tomoi M, Ohtsuka M y Shimomura K. (1995) Luminal dilution caused by certain mild irritants and capsaicin contributes to their gastric mucosal protection *Am. J. Physiol.* G200-G206
- Hatori, A. Shigematsu A. y Tsuya A (1984). The metabolism of Aspirin in rats; localization, absorption, distribution and excretion. *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet* 9(3) 205-214
- Holzer, P. (1991). Capsaicin: Cellular Targets, Mechanisms of Action, and Selectivity for Thin Sensory Neurons *Pharmacol. Rev* , 43(2):143-189.
- Holzer, P. y Lippe I Th. (1989). Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. *Neuroscience*, 27(3) 981-987
- Holzer, P. Pabst M.A. y Lippe. (1989). Intragastric Capsaicin Protects Against Aspirin-Induced Lesion Formation and Bleeding in the Rat Gastric Mucosa. *Gastroenterology*, 96.1425-1433
- Iawamoto, K., Takei M. y Watanabe J. (1982). Gastrointestinal and hepatic first-pass metabolism of aspirin in rats *J. Pharm. Pharmacol.*34:176-180.
- ICH International Conference on Harmonisation (1997); Guileline on the Validation of Analytical Procedures Metodology, Department of Healt and Human services, Food and Drug Administration, May. 62:27463 –27467.
- Insel, P.A. (1996) Analgesic-antipiretics and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. En Goodman & Gilman (Eds). "The pharmacological basis of therapeutics", 9th edition, 617-618

- Kadar, D. (1989). Anti-Inflammatory Analgesic. En Harol K y Roschlou W.H., (Eds) "Principles of Medical Pharmacology", 5 th ed., B.C.Decker Inc , USA, 326-330.
- Kalant, H (1989). Drug Biotransformation (1989). En Harol K y Roschlou W.H., (Eds) "Principles of Medical Pharmacology" 5 th ed., B C.Decker Inc., USA, 35-47.
- Kang, J. Y, Teng C. H, Wee A y Chen F.C. (1995). Effect of capsaicin and chilli on ethanol induced gastric mucosal injury in the rat. *Gut*, 36:664-669.
- Kappas, A., Anderson E.K, Conney H A y Alvares P.A. (1979) Influence of Dietary protein and carbohydrate on antipyrine and theophylline metabolism in man *Clin. Pharmacol. Ther* , 20:643-653
- Krishnaswamy, K (1981) The effect of malnutrition on the pharmacokinetics of phenylbutazone. *Clin Pharmacokinet.*, 6:152-159
- Lares-Aseeff, I., Cravioto J, Santiago P, Pérez-Ortiz B. (1992). Pharmacokinetics of metronidazole in several malnourished and nutritionally rehabilitated children. *Clin. Pharmacol. Ther* , 51:42-50
- Limlomwongse, L., Chaitaichawong C y Tongai S. (1979). Effect of capsaicin on gastric acid secretion and mucosal blood flow in the rat *J. Nutri.* 109:773-777.
- Lippe, I Th, Pabst M A y Holzer P. (1989) Intra gastric capsaicin enhances rat gastric acid elimination and mucosal blood flow by afferent nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol* 96 91-100
- Lopez-Carrillo, L., Hernández A M y Dubrow R (1994). Chile pepper consumption and Gastric Cancer in México A Case-Control Study. *Am. J. Epidemiol.* 139:263-271

- Lutz, M Espinoza J, Arancibia A, Araya M, Pacheco I. y Brunser. (1987). Effect of structure of dietary fiber on the bioavailability of amoxicillin. *Clin. Pharmacol. Ther* 42 377-390.
- Mann ,N. (1977). Capsaicin-induced acute erosive gastritis: its prevention by antacid, meriamide and cimetidine *J. Kint. Med. Assoc.* 75:71-73
- Macrae, R. (1993): Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Vol 5, Academic Press, Great Britain, 3490-3500.
- Montgomery, C.C (1991). Diseño y Análisis de Experimentos, Grupo Editorial Iberoamericano, México, 71-72.
- Mucklow, J. C (1980). The influence of changes in dietary fat on the clearance of antipyrine and 4-hydroxylation of debrisoquine. *Br. J. Clin. Pharmacol* 9:283.
- Nassar, C.F, Barada K A, Abdallah L.E, Hamdan W S, Taha A. M, Atweh S.F y Saadé E (1995) Involvement of capsaicin-sensitive primary afferent fibers in regulation of jejunal alanine absorption *Am. J. Physiol.* 268(4): G695-G699
- Nagy, J.I (1982). Capsaicin: A chemical probe for sensory neuron mechanisms Handbook of Psychopharmacology, Vol5, Iversen, Iversen S y Snyder S (eds). Plenum Press, New York, 185-235
- Nies, S.A y Spielberg P S Therapeutics Principles. En Goodman & Gilman (Eds). "The pharmacological basis of therapeutics", 9th edition, 50-51

- Pabst, G y Joeger (1990). Review of methods and criteria for the evaluation of bioequivalence studies. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38,5-10
- Pantuck, J.E, Pantuck C.B., Garlan W.A,Min B.H,Wattenberg L.W, Anderson K.E, Kappas A y Conney H.A (1979). Stimulatory effect of Brussels sprouts and cabbage on human drug metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther* 25:88-95.
- Pantuck, J.E, Pantuck C.B, Anderson E.K, Wattenberg W.L,Conney H A y Kappas A.(1984) Effect of Brussels sprouts and cabbage on drug conjugation *Clin. Pharmacol. Ther.*, 35:161-169.
- Peng, G.W., Gadalla M.A.F, Smith V. Peng A y Chiou W L (1978) Simple and Rapid High-Pressure Liquid Chromatographic Simultaneous Determination of Aspirin, Salicylic Acid, and Salicylic Acid in Plasma. *J. Pharm. Sci* 67 710-712.
- Polasa, K.(1984). Rifampicin kinetics in undernutrition. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 17.481-484.
- Rowland, M. y Tozer N. T (1989). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*, 2th ed Lea & Febiger, USA 131-132
- Rumble, R.H. y Roberts, M.S,(1981) Determination of aspirin and it's major metabolites in plasma by high performance liquid chromatography whitout solvent extraction *J. Chromatogr.*,225 252-260
- Seeman, P. y Kalant, H (1989). Drug solubility, Absorption, and Movement Across body membranes. En Harol K y Roschlou W H., (Eds) "Principles of Medical Pharmacology"5 th ed., B C.Decker Inc , USA, 11-12.

- Shah P.V, Midha K.K, Dighe S, McGilveray IJ, Shelly J.P, Yacobi A, Laylof T, Viswahathan C.T, Cook E, McDowall RD, Pittman K.A y Spector S (1992) Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetics Studies, *J. Pharm. Sci.*, 81. 309-312.
- Surh, Y.J. y Lee S S (1995). Capsaicin, A double-edged Sword. Toxicity, Metabolism, and Chemopreventive Potencial. *Life Sci.*, 56:1845-1855.
- Szallasi, A y Blumberg M.P. (1996). Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pam*, 68:195-208.
- Szoleszanyi, J. y Bartho L.(1981) Impaired defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin-desensitized rat. in G Mozik, O. Hanninen y J Taylor (eds) *Advances in Physiological Sciences, Gastrointestinal Defense Mechanisms*, Pergamon Press, Oxford, 39-59
- Takeuchi, K., Niidia H, Matsumoto J, Ueshima K y Okabe S. (1991) Gastric Motility in Capsaicin-Induced Cytoprotection in the Rat Stomach *Japan J. Pharmacol* 55.147-155
- Toothaker, D.R y Welling G.P.(1980). The effect of food on Drug Biovailavility. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol* 20:173-179
- Tranvoues, L.J. Lerebours E, Chretien P, fortunet F.H y Colin R,(1985) Hepatic Antipyrine metabolism in malnutrition and course after nutritional rehabilitation, *Am. J Clin. Nut.*, 41:1257-1264
- Udupihille, M. (1993) The effect of capsaicin on the small intestinal absorption of glucose

and alanine in the rat. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 37(1):59-62

Vane, J.R. (1994). Towards a better aspirin *Nature*, 367:215-216.

Wanwimolruk, S., Nyika S, Kepple M, Ferry D. G y Clark R. C. (1993). Effects of Capsaicin on the Pharmacokinetics of Antipyrine, Theophylline and Quinine in Rats *J. Pharm. Pharmacol.* 45:618-621.

Welling, P.G. (1977). Influence of food and Diet on Gastrointestinal Drug Absorption. A review, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 5 (4): 291 -33.

Wilson, J.T. (1976). Failure of Vitamin C to affect the pharmacokinetic profile of antipyrine in man. *J. Clin. Pharmacol.*, 16:265-270

Yang, C.S y Yoo J.H.(1988). Dietary effects on drug metabolism by the mixed-function oxidase system. *Pharmacol. Ther.* 38:53-72.