



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA EVALUAR LA
BIODISPONIBILIDAD EN PERROS DE FORMAS FARMACEUTICAS ORALES DE
CURCUMINA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIANA DOLORES HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
UNAM, FES-CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTORAL:

DRA. HELGI JUNG COOK
UNAM, FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. ALMA REVILLA VÁZQUEZ
UNAM, FESC-CUAUTITLÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente participaron leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a Dios por la vida que me ha regalado y por todas sus bendiciones.

A mis padres Belén e Hilario quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera. Les agradezco de corazón su gran amor, motivación, apoyo incondicional y sus sabios consejos que me han brindado en el momento exacto.

A mis hermanos Diana y Eduardo, por su amor, paciencia, por preocuparse por mí en todo momento y por alentarme en momentos difíciles. Gracias hermanitos los quiero mucho.

A mi novio Fernando por apoyarme en todo momento para cumplir mis metas, por su comprensión durante el tiempo que he dedicado a este trabajo y por su inmenso amor.

A la Dra. Raquel López Arellano por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por la orientación y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A mi amigo Víctor Hugo por su valioso apoyo durante todo el trabajo, por su amistad y los momentos felices en LEDEFAR.

A la Maestra Adriana por sus asesorías, pero sobre todo por su amistad.

A mis tutoras Dra. Helgi Jung Cook y Dra. Alma Revilla Vázquez por sus asesorías para mejorar este trabajo

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de LEDEFAR por su amistad y colaboración.

A Uriel por los momentos agradables durante el posgrado.

A Oscar Ortiz por ayudarme en la toma de muestras en cada uno de los pilotos realizados.

A mis sinodales por sus correcciones para mejorar este trabajo.

A la UNAM por todo el conocimiento adquirido, en especial al posgrado de Producción y Salud Animal.

A CONACYT Y COMECYT por el apoyo económico que me brindaron para concluir este trabajo.

A laboratorio DIVET por las muestras de sangre proporcionadas para la elaboración de este trabajo.

A todo el personal que colabora en la Unidad de Enseñanza Quirúrgica (FESC-4) por las muestras de sangre proporcionadas y el apoyo para realizar el estudio piloto, en especial al Dra. Enrique Flores Gasca y Dra. María del Rocío Morales Méndez Flores por su disposición y apoyo en todo momento.

A todo el personal que colabora en el Hospital de pequeñas especies por las muestras de sangre proporcionadas y el invaluable apoyo para realizar los estudios piloto, en especial al Dr. Marco de Paz por su disposición y cada uno de los dueños de los sujetos de investigación.

Al Ing. Jorge Valdés de la empresa Waters por su asesoría y orientación en el equipo XEVO TQ.

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida a alta presión acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas para la determinación de curcumina en medicamentos desarrollados en LEDEFAR. El Clopidogrel Bisulfato se empleó como estándar interno (E.I.) Los analitos se separaron en una columna Acquity UPLC BEH Shield RP 18 1.7 μm 2.1 X 100 mm, C18 en fase reversa con una fase móvil con ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo y solución acuosa de ácido fórmico 0.1%, 60:40, v/v. La detección de los analitos se logró utilizando el modo positivo de ionización electroaspersión (ESI+) a través del modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Las transiciones de masa fueron m/z 369.3 \rightarrow 177.1 de curcumina y m/z 322 \rightarrow 212.05 de clopidogrel bisulfato. Durante el desarrollo se seleccionó el tipo de tratamiento de muestra (fase sólida, precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido), el más eficiente fue la extracción líquido-líquido.

El método fue validado considerando los parámetros y criterios de las guías VICH GL1 CVMP/VICH/590/98FINAL, EMA/CVMP/016/00-Rev.2 y NOM-177-SSA1-2013. El análisis estadístico del método analítico se realizó empleando el paquete estadístico Statgraphics Plus 5 y demuestra que es lineal en el intervalo de 3-160 ng/mL con un coeficiente de correlación ≥ 0.999 , exacto, preciso, específico, los coeficientes de variación intra-e inter-día fueron del 15 % en términos de desviación estándar relativa y el porcentaje de recuperación en muestras de plasma de perro fue de 85-95%. No se detectó efecto de supresión iónica, acarreo o de matriz.

Para verificar la factibilidad del método se hizo un estudio piloto de biodisponibilidad de una formulación de nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina en el cual se utilizaron tres perros. Se obtuvieron muestras sanguíneas a los 0, 30, 60, 90, 150, 180, 210, 240, 300 y, 360 minutos, después de la administración de la dosis, las cuales fueron analizadas por cromatografía de líquidos a alta presión - acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas previamente validados.

El método desarrollado bajo las condiciones propuestas representa una alternativa confiable, para estudiar la biodisponibilidad de medicamentos con curcumina.

Palabra claves: Curcumina, biodisponibilidad, CL MS/MS

ABSTRACT

A bioanalytical method to determine curcumin in a pharmaceutical form developed in LEDEFAR by high pressure liquid chromatography coupled to a mass - mass spectrometer was developed. Clopidogrel bisulfate is used as an internal standard (IS) The analytes were separated on a column Acquity UPLC BECH microns Shield RP 18 1.7 2.1 X 100mm, C18 reverse phase with a mobile phase with 0.1% formic acid in acetonitrile and aqueous 0.1% formic acid. 60:40, v / v detection of analytes was achieved using positive electroaspersión ionization mode (ESI +) mode through multiple reaction monitoring (MRM). The mass transitions were 369.3 → 177.1 m/z curcumin and 322 → 212.05 m/z clopidogrel bisulfate. During development the type of sample treatment (solid phase protein precipitation and liquid-liquid) was selected more efficient.

The method was validated considering the parameters and criteria guidelines CVMP/VICH/590/98FINAL VICH GL1, EMA/CVMP/016/00-Rev.2 and NOM-177-SSA1-2013. The statistical analysis was performed Statgraphics Plus 5. The results demonstrate a linear behavior in the range of 3-160 ng / mL with a correlation coefficient ≥ 0.999 , accuracy and specificity, showed variation coefficients intra-and inter-day of less than 15% in terms of relative standard deviation. Recovery, in dog plasma samples, was obtained around 85-95%, no effect of ion suppression, hauling and matrix was detected.

To confirm the suitability of the method a pilot bioavailability of a mucoadhesive formulation of curcumin-loaded nanocapsules, using three dogs, was done study was done. Blood over 0, 30, 60, 90, 150, 180, 210, 240, 300 and 360 minutes after administration of the dose, was collected. The samples were analyzed by high pressure liquid chromatography coupled to a mass-mass spectrometer (LC MS / MS) using the method previously validated.

The bioanalytical method under the proposed conditions represents a reliable alternative to study drug bioavailability curcumin.

Keywords; Curcumin, bioavailability, LC MS/MS

INDICE

Resumen 3

Abstract 4

Lista de tablas 7

Lista de figuras 8

Lista de abreviaturas 10

I.- Introducción 12

II.- Antecedentes 13

 Formulaciones desarrolladas y optimizadas en LEDEFAR 19

 II.I Curcumina 19

 II.I.I. Descripción 19

 II.I.II. Nombre 20

 II.I.III. Propiedades físicoquímicas de curcumina y curcuminoides 20

 II.I.IV. Estabilidad 21

 II.I.V. Solubilidad 21

 II.I.VI. Constante de acidez (pKa) 21

 II.II.Efectos biológicos de curcumina 23

 II.III. Cromatografía líquida rápida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas-masas (UPLC-MS/MS) 26

 II.III.I. Cromatografía líquida (LC) 26

 II.III.I. Espectrometría de masas (MS) 26

III.Planteamiento del problema 31

IV.- Marco de referencia 31

V.- Justificación 32

VI.- Hipótesis 33

VII.- Objetivo general 33

 VII.I Objetivos particulares 33

VIII. Parte experimental 34

 VIII.I. Sustancias, reactivos y equipos 34

 VIII.I.I. Estándares 34

 VIII.I.II. Reactivos 34

 VIII.I.III. Material 34

 VIII.I.IV. Equipos e instrumentos 35

 VIII.I.V. Material biológico 35

IX.-Diseño de la investigación 36

X. Desarrollo experimental 37

 X.I. Desarrollo del método analítico 37

 X.I.I. Selección de condiciones UPLC MS/MS 37

 X.I.II. Selección de estándar interno 38

 X.I.III. Tratamiento de la muestra: eliminación de proteínas en muestras de plasma de perro 40

 X.I.IV. Preparación de curva de calibración 43

 X.II. Validación del método analítico 46

 X.II.I. Linealidad del sistema 49

 X.II.II. Precisión y exactitud del sistema 49

 X.II.III. Linealidad del método 50

X.II.IV. Recobro absoluto del método	50
X.II.V. Precisión del método	50
X.II.VI. Repetibilidad	51
X.II.VII. Reproducibilidad.....	51
X.II.VIII. Exactitud.....	51
X.II.IX. Límite de cuantificación y detección	51
X.II.X. Estabilidad de curcumina en matriz.....	52
X.II.XI. Estabilidad de la muestra procesada.....	53
X.II.XII. Reproducibilidad del metodo entre días y analistas	53
X.II.XIII. Selectividad	53
X.II.XIII.IV. Efecto de acarreo.....	57
X.II.XIV. Aplicación al metodo de análisis.....	58
XI. Resultados y discusión	59
XI. I. Desarrollo del método analítico	59
XI.I.I. Selección de condiciones UPLC/MS/MS	59
XI.I.III. Volumen de inyección	65
XI.I.II. Selección de estándar interno	65
XI.I.III. Selección pretratamiento de muestra.	66
XI.I.III.I. Precipitación de proteínas.....	67
XI.I.III.II. Extracción líquido-líquido.....	69
XI.I.III.III. Extracción en fase sólida.....	70
XI.I.II. Validación del método analítico.	71
XI.II.I. Linealidad del sistema	73
XI.II.II. Precisión y exactitud	75
XI.II.III. Linealidad del método.....	75
XI.II.IV. Recobro absoluto	77
XI.II.V. Precisión del método	78
XI.II.VI. Repetibilidad.....	79
XI.II.VII. Reproducibilidad	79
XI.II.VIII. Exactitud	80
XI.II.IX. Límite de cuantificación y detección	80
XI.II.X. Estabilidad de curcumina en matriz	81
XI.II.XI. Estabilidad muestra procesada.....	83
XI.II.XII. Reproducibilidad del metodo entre días y analistas	84
XI.II.XIII. Selectividad.....	85
XI.II.XIII.IV. Efecto de acarreo	104
XI.II.XIII.V. Aplicación al metodo de análisis.....	105
XII. - Conclusiones.....	107
XIV. - Perspectivas.....	107
XIII. – Referencias	108
XIV. – Anexos.....	114

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Los niveles séricos y tisulares de la curcumina en roedores y humanos después de diferentes vías de administración.	15
Tabla 2. Comparación de parámetros farmacocinéticos en diferentes formulaciones que contienen curcumina.	18
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de curcumina y sus principales curcuminoides.	20
Tabla 4. Comparación de actividades biológicas de la curcumina y sus productos de degradación de curcumina[36].	24
Tabla 5. Métodos analíticos descritos para la cuantificación de curcumina en plasma utilizando HPLC, UPLC-MS/MS, UPLC, electroforesis capilar.	28
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de la curcumina e iones padre e hijo.	38
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de posibles estándares internos.	39
Tabla 8. Preparación de SST1-6.	43
Tabla 9. Preparación de curva de calibración C1-6.	44
Tabla 10. Preparación de SPC1-3.	44
Tabla 11. Preparación de PC1-3.	45
Tabla 12. Parámetros y criterios del proceso de validación de un método bioanalítico.	46
Tabla 13. Requerimientos para la validación del método.	49
Tabla 14. Pools empleados para evaluar el efecto de la matriz del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	55
Tabla 15. Parámetros para fragmentación de ion molecular de curcumina.	59
Tabla 16. Ion padre e hijo de la curcumina y sus principales curcuminoides.	61
Tabla 17. Condiciones cromatográficas en dos columnas diferentes.	63
Tabla 18. Respuesta y transición de los posibles estándares internos.	66
Tabla 19. Relación de absorbancias a longitud de onda de 260nm y 280nm en la extracción líquido-líquido y precipitación de proteínas.	67
Tabla 20. Precipitación de proteínas empleando acetonitrilo.	68
Tabla 21. Precipitación de proteínas empleando acetona fría (-20°C).	68
Tabla 22. Precipitación de proteínas empleando acetona (-20°C).	69
Tabla 23. Extracción líquido-líquido utilizando cloroformo.	69
Tabla 24. Extracción líquido-líquido utilizando cloroformo/ alcohol isoamílico 24:1.	70
Tabla 25. Resultados de los parámetros de validación del método bioanalítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	71
Tabla 26. Relación de concentración de curcumina (ng/mL) con factor de respuesta.	73
Tabla 27. Comparación de modelos alternativos de la concentración de curcumina (ng/mL) en función del factor de respuesta.	74
Tabla 28. Precisión y exactitud del sistema para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	75
Tabla 29. Relación de concentración adicionada de curcumina (ng/mL) en función de la concentración recuperada de curcumina (ng/mL).	75
Tabla 30. Comparación de modelos alternativos de la concentración de curcumina (ng/mL) en función de la cantidad adicionada de curcumina (ng/mL)	76
Tabla 31. Análisis de variancia y de regresión de la linealidad del método de curcumina.	77
Tabla 32. Porcentaje de recobro de curcumina.	78
Tabla 33. Precisión del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	78
Tabla 34. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	79
Tabla 35. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro. ...	79

Tabla 36. Exactitud del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	80
Tabla 37. Límite de cuantificación del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	81
Tabla 38. Estabilidad a corto plazo del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	81
Tabla 39. Estabilidad del método analítico a largo plazo para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	82
Tabla 40. Estabilidad del método analítico en 3 ciclos de congelación - descongelación para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	82
Tabla 41. Estabilidad del método analítico en automuestreador para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	83
Tabla 42. Estabilidad del método analítico en de muestra procesada y almacenada a 8°C durante 24hrs para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	84
Tabla 43. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro. .	84
Tabla 44. Análisis de variancia para analista y día.	85
Tabla 45. Efecto de hemólisis en plasma de perro del método analítico para la cuantificación de cúrcumina.	95
Tabla 46. Efecto matriz del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	103
Tabla 47. Efecto de acarreo del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.	104
Tabla 48. Información de sujetos de investigación.	105
Tabla 49. Concentración de curcumina en plasma en función del tiempo.	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de curcumina y sus metabolitos dependiendo de la vía de administración.	14
Figura 2. Estructura de curcumina y sus metabolitos durante el proceso de conjugación.	16
Figura 3. Metabolismo reducción y conjugación de curcumina. ADH, alcohol deshidrogenasa; GST, glutatión S transferasa; LOX, lipoxigenasa; COX, la ciclooxigenasa, glucurónido; sulfato[115].	17
Figura 4. Estructura química de curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina.	19
Figura 5. Forma tautomerica de curcumina ceto-enol, pH dependiente.	20
Figura 6. Productos de degradación de curcumina al someterla a condiciones de estrés (hidrolisis alcalina, autoxidación e irradiación).	21
Figura 7. Especies químicas de curcumina.	22
Figura 8. Absorción en UV de curcumina en una solución 1:1 agua-etanol dependiente de pH (Dyrssen, et al., 1972).	22
Figura 9. Efectos biológicos de curcumina en enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, autoinmunes y neoplásicas.	23
Figura 10. Cuadro metodológico.	36
Figura 11. Diagrama de preparación de curva de calibración.	45
Figura 12. Ion padre de mayor proporción de curcumina empleando como medio de disolución metanol. ...	60
Figura 13. Ion padre de mayor proporción de curcumina empleando como medio de disolución una mezcla 40:60 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.	60
Figura 14. Ion hijo de mayor de proporción de curcumina empleando como medio de disolución metanol. .	61
Figura 15. Ion hijo de mayor proporción de curcumina empleando como medio de disolución una mezcla 40:60 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.	61
Figura 16. Cromatogramas del tiempo de retención de curcumina con fase móvil 1 en diferentes proporciones.	62
Figura 17. Cromatogramas del tiempo de retención de curcumina con fase móvil 2 en diferentes proporciones.	62

Figura 18. Comparación de cromatogramas en diferentes columnas y condiciones cromatográficas..... 64

Figura 19. Ion padre de mayor proporción de Clopidogrel Bisulfato empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q..... 65

Figura 20. Cromatograma de Clopidogrel Bisulfato. 65

Figura 21. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina al realizar una extracción en fase sólida, acondicionado con metanol/agua 50:50..... 70

Figura 22. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina al realizar una extracción en fase sólida, acondicionado con acetonitrilo/agua 50:50. 70

Figura 23. Linealidad del sistema para la cuantificación de Curcumina en plasma de perro. 74

Figura 24. Cantidad adicionada de curcumina en función de la cantidad recuperada de curcumina. 76

Figura 25. Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de Curcumina entre a) analistas y b) días con intervalo de confianza LSD del 95%..... 85

Figura 26. Ion padre de mayor proporción de solución diluyente. 86

Figura 27. Ion hijo de mayor proporción de solución diluyente. 86

Figura 28. Selectividad..... 88

Figura 29. Selectividad..... 89

Figura 30. Espectro de masas en el tiempo de retención (1.84 min) del cromatograma de blanco de plasma con heparina en transición 322-122.05 m/z. 90

Figura 31 Espectro de masas en el tiempo de retención (1.84 min) del cromatograma de blanco de plasma con EDTA en transición 322-122.05 m/z..... 90

Figura 32. Selectividad..... 92

Figura 33. Selectividad..... 93

Figura 34 Espectro de masas de pico en tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma a) sin presencia de hemólisis b) semi hemolizado c) hemolizado 94

Figura 35. Escala de hemólisis en plasma. 95

Figura 36. Selectividad..... 97

Figura 37. Selectividad..... 98

Figura 38. Selectividad..... 99

Figura 39. Espectro de masas de blanco de plasma de pool 1, 2,5 infundiendo 3 ng/mL de curcumina a 1.84 minutos en transición de Clopidogrel Bisulfato. 100

Figura 40. Espectro de masas de blanco de plasma de pool 7, 9,10 infundiendo 3 ng/mL de curcumina a 1.84 minutos en transición de Clopidogrel Bisulfato 101

Figura 41. Espectro de masas de blanco de plasma de pool 11,12 infundiendo 3 ng/mL de curcumina a 1.84 minutos en transición de Clopidogrel Bisulfato. 102

Figura 42. Cromatogramas de estudio piloto de nanocápsulas mucoadhesivas. 105

Figura 43. Estudio piloto de cápsulas de curcumina. 106

Figura 44. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B y 40A:60B y flujo 0.1 ml/min, columna 1. 114

Figura 45. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B y 40A:60B y flujo 0.25 ml/min, columna 1..... 114

Figura 46. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B y 40A:60B y flujo 0.5 ml/min, columna 1..... 115

Figura 47. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B, 40A:60B, 50A:50B y flujo 0.1 ml/min, columna 2. 115

Figura 48. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 40A:60B y 50A:50B y flujo 0.25 ml/min, columna 2..... 116

Figura 49. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B, 50A:50B y flujo 0.5 ml/min, columna 2..... 116

Figura 50. Ion padre de mayor proporción de clorhidrato de propafenona empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	117
Figura 51. Cromatograma de Clorhidrato de propafenona.....	117
Figura 52. Ion padre de mayor proporción de Tramadol empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	117
Figura 53. Cromatograma de Tramadol.....	117
Figura 54. Ion padre de mayor proporción de melatonina empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	118
Figura 55. Cromatograma de melatonina.....	118
Figura 56. Ion padre de mayor proporción de Trimetropin empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	118
Figura 57. Ion hijo de mayor proporción de Trimetropin empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	118
Figura 58. Cromatograma de trimetoprin.....	119
Figura 59. Ion padre de mayor proporción de Cafeína empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	119
Figura 60. Ion hijo de mayor proporción de Cafeína empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.....	119
Figura 61. Ion padre de mayor proporción de Salbutamol empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 af 0.1% en ACN y AF 0.1% en agua milli-Q.....	119
Figura 62. Cromatograma de Salbutamol.....	120
Figura 63. Cromatograma de muestra blanco utilizando acetoniitrilo como agente precipitante con proporción 40 %A y 60%B y flujo 0.25 ml/min.....	120
Figura 64. Cromatograma de muestra blanco utilizando acetona fría como agente precipitante con proporción 40 %A y 60%B y flujo 0.25 ml/min.....	120
Figura 65. Cromatograma de muestra blanco utilizando cloroformo en extracción líquido-líquido con proporción 40 %A y 60%B y flujo 0.25 ml/min.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AINE's	Antiinflamatorio no esteroideos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
AF	Ácido fórmico
VICH	Armonización internacional veterinaria
COX, COX1 Y COX2	Ciclooxigenasa y Ciclooxigenasa tipo 1 y 2
R	Coefficiente de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
Log P	Coefficiente de partición
pka	Constante de acidez
C.V.	Coefficiente de variación
[]	Concentración
CVMP	Comité para medicamentos de uso veterinario
LC/MS/MS	Cromatografía líquida a alta presión acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas
MS1	Cuadrupolo 1

MS2	Cuadropolo 2
Desv.std	Desviación estándar
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
FMN	Factor Matriz Normalizado
H	Hemolizado
ESI (+)	Ionización por electroaspersión en modo positivo
µg	Microgramo
mM	Milimolar
Mg	Miligramo
µl	Microlitro
Ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
LEDEFAR	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico
QL	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LOX	Lipooxigenasa
PM	Peso molecular
%	Porcentaje
PC1	Punto control uno (concentración baja)
PC2	Punto control uno (concentración media)
PC3	Punto control uno (concentración alta)
m/z	Relación masa/carga
SH	Sin presencia de hemólisis
SMH	Semi hemolizado
SST1	Solución stock de trabajo 1
SST2	Solución stock de trabajo 2
SST3	Solución stock de trabajo 3
SST4	Solución stock de trabajo 4
SST5	Solución stock de trabajo 5
SST6	Solución stock de trabajo 6
SSPC1	Solución stock punto control uno (concentración baja)
SSPC2	Solución stock punto control uno (concentración media)
SSPC3	Solución stock punto control uno (concentración alta)
Solución Co1	Solución stock de clopidogrel bisulfato 1
Solución Co2	Solución stock de clopidogrel bisulfato 2
T ^{1/2}	Tiempo de vida media
T max	Tiempo máximo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Vd	Volumen de distribución
v/v	Volumen/volumen

I.- INTRODUCCIÓN

La curcumina es actualmente uno de los compuestos naturales más investigados debido a sus múltiples actividades farmacológicas. Se ha demostrado que la curcumina es un compuesto antiinflamatorio en modelos de inflamación aguda, subaguda y crónica en ratones y ratas, aunque no tiene fuertes efectos analgésicos ni antipiréticos, y tampoco produce una significativa irritación gástrica, ni tiene efectos en el sistema nervioso central. En muchos estudios han demostrado la capacidad antiinflamatoria de los curcuminoides mediante la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, ya que inhiben las actividades cicloxigenasa y lipooxigenasa[1], afectando la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxano, evitando así el desarrollo de los procesos inflamatorios y la agregación plaquetaria.[2]

La curcumina es una molécula que forma parte de los curcuminoides extraídos de la cúrcuma o azafrán de la India. Sus efectos beneficiosos para la piel y las lesiones cutáneas están ampliamente reconocidos. Entre sus otras características, la curcumina presenta una interesante acción protectora del hígado y un efecto antiagregante plaquetario que puede ayudar al ser humano a protegerse de la arteroesclerosis. Finalmente, los últimos resultados de laboratorio demuestran que posee propiedades anticancerígenas.

Sin embargo, en Fase I de ensayos clínicos se ha demostrado que la curcumina tiene baja actividad intrínseca, mala absorción, alta tasa de metabolismo, inactividad de los productos metabólicos y/o rápida eliminación provocando que su biodisponibilidad sea baja. La biodisponibilidad se define como la velocidad y la cantidad con la que el fármaco llega a la circulación y queda a disposición de su sitio de acción, a partir del medicamento en que fue administrado, para aquellos medicamentos que no pretenden ingresar a circulación, la biodisponibilidad se puede entender como la cantidad y velocidad con la que el fármaco se es liberado del medicamento y queda a disposición de sus sitios de acción[3,4].

En respuesta a este problema el laboratorio LEDEFAR de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, desarrolla una formulación de nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina en suspensión para uso veterinario. Para determinar la cantidad y la velocidad de curcumina en plasma es necesario realizar un estudio de biodisponibilidad utilizando un método bioanalítico validado.

La validación de un método bioanalítico tiene como finalidad demostrar la idoneidad del método para el propósito destinado. Mediante la validación de un método se establecen los parámetros de calidad que van a satisfacer los requisitos de una aplicación analítica concreta. Por ello, se requiere de una serie de ensayos de comparación de resultados con parámetros de referencia establecidos que darán la confiabilidad del método.

Para que un método de análisis pueda ser validado es necesario determinar los parámetros que van a definir la calidad del método de ensayo y que están en función de su aplicación específica.

II.- ANTECEDENTES

Los estudios reportados de curcumina hasta la fecha, establecen una fuerte actividad intrínseca. Sin embargo, los estudios realizados en los últimos tres decenios en relación con absorción, distribución, metabolismo y excreción de la curcumina han revelado una pobre absorción y metabolismo rápido que restringe severamente su biodisponibilidad.

El primer estudio de la absorción, distribución y excreción de la curcumina fue realizado por Wahlstrom y Blennow en 1978 utilizando ratas Sprague- Dawley. En este estudio se cuantificaron cantidades insignificantes de la curcumina en plasma de ratas después de administrar por vía oral un 1 g/kg de curcumina demostrando que la curcumina se absorbe mal en el intestino[5].

Los datos disponibles de estudios en animales y humanos indican que tras la administración oral, una parte de la curcumina ingerida se absorbe en el intestino. La farmacocinética y la toxicidad de la curcumina también se han estudiado. Cuando se administra por vía oral, el 75% de la curcumina se excreta en las heces mientras que en la orina solo aparecen rastros. Los niveles plasmáticos en sangre han evidenciado que la curcumina no se absorbe bien en el intestino[6]. A las 4 h después de alimentación forzada, la curcumina puede ser detectada en el plasma de 1 de 4 animales. Sin aparente toxicidad con dosis de hasta 5g kg⁻¹ [7].

A pesar de los múltiples efectos farmacológicos y la seguridad en la fase clínica, incluso en dosis altas (12 g/día), la curcumina tiene una mala biodisponibilidad in vivo, como lo demuestran sus bajos niveles séricos y la distribución de tejido limitada[8]. Se ha encontrado que la curcumina puede ser metabolizada tanto en las vías de conjugación y de reducción en los seres humanos y los roedores. La curcumina por vía oral sufre una conjugación, dando como resultado la curcumina glucurónido y sulfato.

La curcumina por vía intraperitoneal o sistémica sufre reducción para generar tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina y octahidrocúrcumina [7,9] como se observa en la figura 1.

En uno de los estudios, se administraron 2000 mg de polvo de curcumina pura a voluntarios en ayunas y las concentraciones de curcumina en plasma fueron muy bajas (<10 ng/ml) esto se observó 1 h después de administrar la dosis [10].

En un estudio piloto de 15 pacientes, se administró por vía oral (dosis de hasta 180 mg de curcumina) en una formulación que contenía también aceites volátiles derivados de Curcuma spp. Todos los días durante un máximo de cuatro meses. No se detectó ninguna evidencia de toxicidad clínica atribuible al extracto, sin embargo, no se observó evidencia de biodisponibilidad [5].

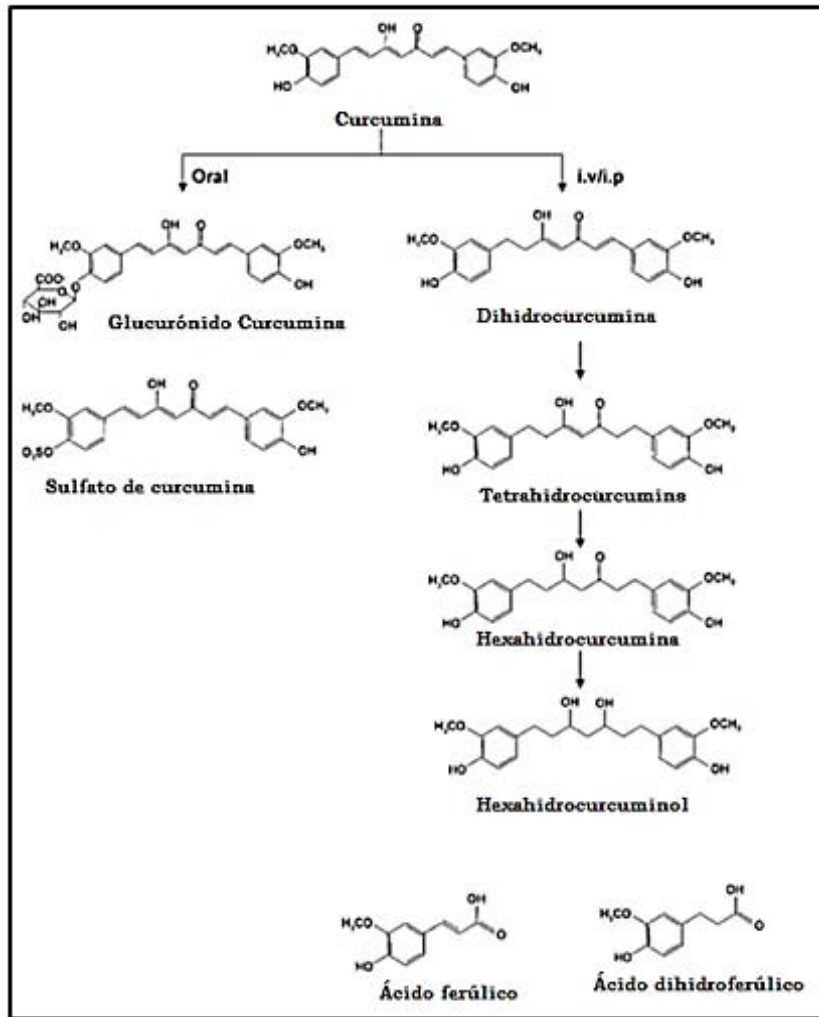


Figura 1. Estructura de curcumina y sus metabolitos dependiendo de la vía de administración.

En otro estudio sobre la biodisponibilidad de la curcumina [7], se administró por sonda una dosis única (1 g/Kg) de una suspensión en aceite de cacahuete que contenía curcumina los resultados demostraron que (65-85%) de la curcumina se excreta en heces en un plazo de 3 días, mientras que en orina se detectaron cantidades insignificantes (<0,01%). En el plasma se detectó después de 3 h en sólo uno de los cuatro animales. La mayor parte de la curcumina administrada se encuentra en el intestino delgado.

Marcylo y colaboradores determinaron la distribución de orina, plasma y tejido de la cúrcuma después de 20 min de la ingesta oral (340 mg/kg) en la rata [11]. Los niveles más altos de curcumina se encontraron en la mucosa intestinal de la rata (1.40 mg/g), seguido de hígado (3,7 mg/g), corazón (0,8 mg/g) y riñón (0,2 mg/g). Los niveles en plasma y orina alcanzaron 16,1 y 2 ng/ml, respectivamente. La mayor parte de la curcumina estaba presente como glucurónidos. Estos y otros estudios sobre la distribución de la curcumina en plasma y tejidos en ratones, ratas y humanos después de la ingesta oral o bien intravenosa (i.v.) y por vía intraperitoneal (i.p.) se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Los niveles séricos y tisulares de la curcumina en roedores y humanos después de diferentes vías de administración.

Especie	Vía de administración	Dosis	Plasma/Tejido	Niveles	Ref.
Ratón	i.p.	100 mg/Kg	Plasma	2.25 µg/mL	[12]
			Intestino	117±6.9 µg/g	
			Bazo	26.1±1.1 µg/g	
			Hígado	26.92.61 µg/g	
			Riñón	7.5±0.08 µg/g	
			Cerebro	0.40.01 µg/g	
Ratón	p.o.	100 mg/Kg	Plasma	0.22 µg/mL	[13]
Ratón	i.p.	100 mg/Kg	Plasma	25 ±2 nmol/mL	
			Mucosa intestinal	200±23 nmol /g	
			Hígado	73±20 nmol /g	
			Cerebro	2.9±0.4 nmol /g	
			Corazón	9.1 ±1.1 nmol /g	
			Pulmones	16±3 nmol /g	
			Musculo	8.4 ±6 nmol /g	
Riñón	78±3 nmol /g				
Rata	p.o.	2 g/Kg	Estomago	53.3±5.1(µg /g)	[14]
			Intestino delgado	58.6±11.0(µg /g)	
			Ciego	51.5±13.5(µg /g)	
			Intestino grueso	5.1 ±2.5(µg /g)	
Rata	p.o.	340 mg/Kg	Suero	6.5±4.5 nM	[15]
Rata	p.o.	1 g/Kg	Suero	0.5 µg/mL	[16]
Rata	p.o.	2 g/Kg	Suero	1.35±0.23 µg/mL	[10]
Rata	p.o.	500 mg/Kg	Plasma	0.06±0.01 µ/mL	[17]
Rata	i.v.	10 mg/Kg	Plasma	0.36±0.05 µg/mL	
Humano	p.o.	2 g/Kg	Suero	0.006±0.005 µg/mL	[10]
Humano	p.o.	4-8 g	Suero	0.4-3.6 µM	[18]
Humano	p.o.	10 g	Suero	50.5 ng/mL	[19]
Humano	p.o.	12 g	Suero	51.2 ng/mL	
Humano	p.o.	3.6 g	Plasma	11.1±0.6nmol/mL	[20]
Humano	p.o.	0.4-3.6 g	Colon y recto	7-20nmol/g	

Especie	Vía de administración	Dosis	Plasma/Tejido	Niveles	C _{máx} (ng/ml) plasma	T _{máx} (h) plasma
Rata	p.o.	340 mg/Kg	na	na	~0.8	0.5-1
Rata	p.o.	340 mg/Kg	Intestino	1400(μg/Kg)	16.1	0.25
			Hígado	3.67 (μg/Kg)		
			Riñón	0.21(μg/Kg)		
			Corazón	0.807(μg/Kg)		
Rata	p.o.	100(mg/Kg)	na	na	266.7	1.62
Rata	p.o.	500 mg/Kg	na	na	60	0.7
Rata	i.v.	10 mg/Kg	na	na	360	<0.08
Rata	p.o.	500 mg/Kg	Intestino	11,830(μg/Kg)	83,800	6
			Hígado	135,2(μg/Kg)		
			Riñón	9.03(μg/Kg)		
Ratón	p.o.	1 g/Kg	na	na	220	1
Rata	i.v.	10 mg/Kg	na	na	~10,000	<0.08

Na=No reportado

i.v.= Vía intravenosa

p.o.= Vía oral

i.p.= Vía intraperitoneal

Los datos de estudios en animales y humanos sugieren que los niveles de curcumina en plasma después de la ingestión oral son relativamente bajos que van desde niveles no detectables a concentraciones de hasta 1.75 mM. La principal vía de eliminación es a través de las heces.

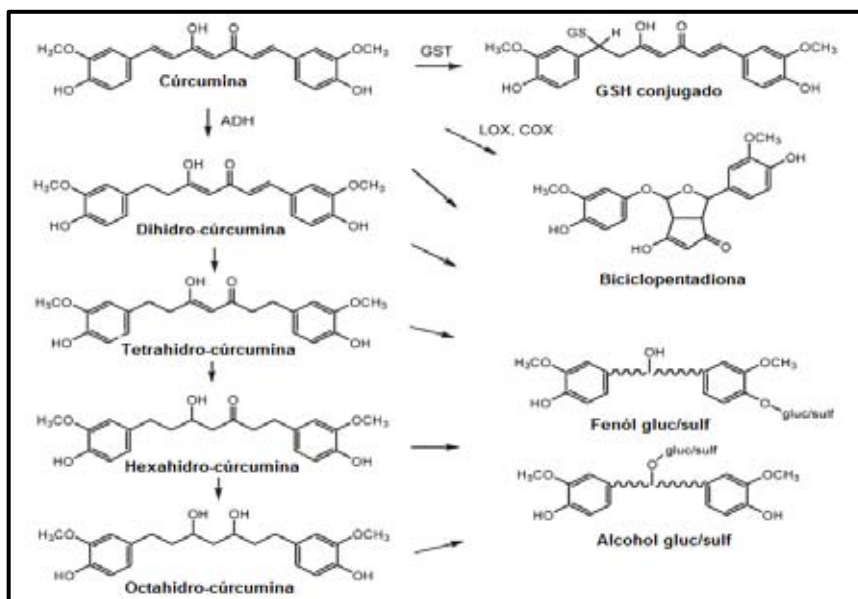


Figura 2. Estructura de curcumina y sus metabolitos durante el proceso de conjugación.

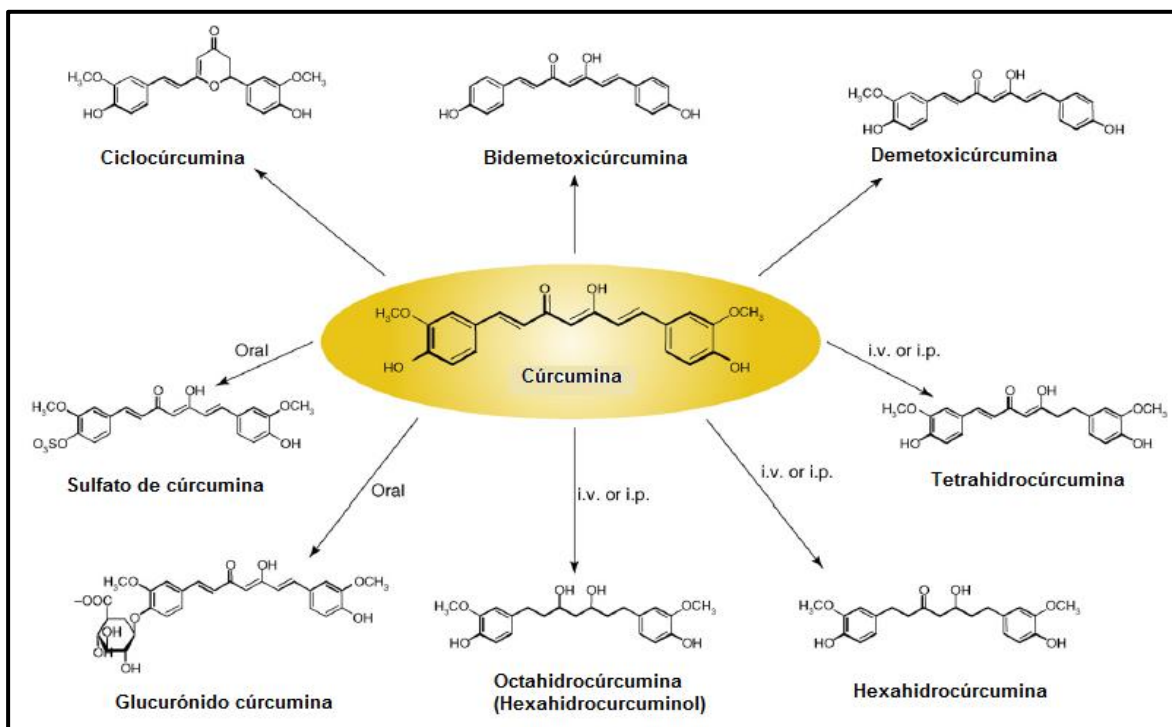


Figura 3. Metabolismo reducción y conjugación de curcumina. ADH, alcohol deshidrogenasa; GST, glutatión S transferasa; LOX, lipoxigenasa; COX, la ciclooxigenasa, glucurónido; sulfato[115].

Ravindranath y colaboradores encontraron que la mayoría de la dosis oral se excreta en las heces, mientras que aprox. 35% se excreta sin cambios, y el 65% restante se excreta en forma de metabolitos de curcumina [21].

Después de la administración intravenosa e intraperitoneal de la curcumina en ratas, grandes cantidades de este compuesto y sus metabolitos se excretan en la bilis, principalmente como tetrahidrocurcumina y hexahidrocurcumina glucurónidos como se observa en la figura 3.

Pan y colaboradores han estudiado la administración intraperitoneal de la curcumina (100 mg/kg) en ratones, y han sugerido que la curcumina es primero biotransformada a dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina. Estos compuestos se convierten posteriormente a monoglucurónidos conjugados [22].

Tabla 2. Comparación de parámetros farmacocinéticos en diferentes formulaciones que contienen curcumina.

Especie/ Vía Administración	Rata Oral	Rata Oral	Rata/ Humano Oral	Rata/ Humano Oral	Rata Oral	Rata Oral	Ratón Oral	Ratón Oral	Perro Oral	Perro IV
Dosis	100- 200mg/kg	100-200mg/kg	300mg/kg 30mg/kg	300mg/kg 30mg/kg	500mg/Kg	50mg/kg	250 mg/kg	100mg/Kg	25mg/Kg	10mg/kg
Formulación	Curcumina	Curcumina complejos de fosfolípidos ^[16]	Curcumin powder ^[23]	Theracurmin ^[23]	Extracto de curcumina ^[17]	NLSC ^[24] Curcumina en tween 80 ^[24]	SLNs ^[9]	SC CUQ-100 ^[25]	Dispersión de curcumina ^[26]	Liposomal Curcumin ^[27]
C_{máx} (ng ml⁻¹)	0.50	1200	37.4±36.1* 1.8±2.8**	1697±578* 29.5±12.9**	60±10	14290±4290 292±100	209.3	232±44.8 694.4±34.19	104.8±13.98	233
T_{máx} (h)	0.75	1.50	2 6	2 1	0.69±0.09	0.5±0.02 0.25±0.00	0.8	0.5 3	1.83±0.29	2
Area bajo la curva (AUC_{0-t_m})(ng ml⁻¹ h)	1320	5900	134±114 4.1± 7	5734±1697 113±61	3600±600	41990±6180 1075±120	2285.5	-	379.8±46.7	485
Area bajo la curva (AUC_{0-t_w})(ml⁻¹ h)	1680	8730	-	-	-	-	-	-	397.9±53.8	-
Tiempo de vida media (t_{1/2}^{el})(h)	1.45	1.96	-	-	0.74±0.12	-	3.1	-	1.39±0.29	0.4
Constante de eliminación (K_{el})(h⁻¹)	0.48	0.35	-	-	-	-	-	-	-	1.6
Volumen de distribución (vd) (l)	192.21	63.82	-	-	-	-	22.36	-	-	-

Curcumina unida a quitosano nano 100 = CUQ-100

Nanopartículas lipídicas sólidas de curcumina=NLSC

Suspensión de curcumina = SC

Nanopartículas lipídicas sólidas de curcumina= SLNs

*C_{máx} correspondiente a la dosis de 300 mg/Kg

** C_{máx} correspondiente a la dosis de 300 mg/Kg

Formulaciones desarrolladas y optimizadas en LEDEFAR.

En el laboratorio se desarrollaron tres tipos de formulaciones las cuales tenían las siguientes características:

1.- Una suspensión farmacéutica de nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso con capacidad de almacenar en su interior curcumina. Las nanocápsulas fueron obtenidas por homogeneización por ultra – turrax, la formación requirió tensoactivos no iónicos, el tamaño promedio de partícula de las nanocápsulas fue de 168 nm con índices de poli dispersión de 0.377 [28].

Las nanocápsulas mostraron ser estables en un período de 16 semanas a 4°C. El recubrimiento con quitosano proporciono capacidad mucoadhesiva, mostrando un excelente desempeño después de la administración vía ora en los modelos in vivo.

2.- Sistemas nanocapsulares [Nanocápsulas de quitosano (NC_Q) y Nanocápsulas de alginato (NC_ALG)] compuestos de un núcleo de vitamina E, y rodeados por una cubierta polimérica biodegradable de quitosán y alginato respectivamente. Las nanocápsulas fueron obtenidas por la técnica de desplazamiento de solvente modificada por G. Riviera (2012) y presentan una estabilidad de al menos 3 meses. Las NC-Q y NC-ALG mostraron tamaños de partícula alrededor de 116.7± 3.2 y 178±7.9 nm, un índice de polidispersión de 0.107 y 0.149, eficacia de encapsulación >98% [29].

La permeabilidad se evaluó en células Caco-2 y demostró que en NC-Q y NC-ALG ésta incremento considerablemente, en comparación con una suspensión acuosa de cúrcuma. Los resultados obtenidos de estas formulaciones de mostraron que son una importante estrategia para mejorar la estabilidad, solubilidad y permeabilidad de la cúrcuma.

II.1 CURCUMINA

II.1.1. DESCRIPCIÓN

El principio activo de la cúrcuma es el polifenol curcumina (responsable de su color amarillo), también conocido como C.I. 75300, o Amarillo natural. Cabe señalar que la cúrcuma que se comercializa no es un curcumina pura, sino una mezcla de curcumina (aprox. 77%), desmetoxicurcumina (aprox. 17%) y bisdesmetoxicurcumina (aprox. 3%) [30].

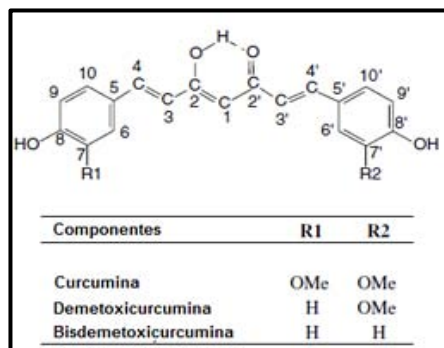


Figura 4. Estructura química de curcumina, demetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina.

II.I.II. NOMBRE

El nombre sistemático es (1E, 6E)-1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-dione.

II.I.III. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE CURCUMINA Y CURCUMINOIDES.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de curcumina y sus principales curcuminoides.

Parámetro	Características ^a		
	C	DMC	BDMC
Punto de fusión (°C)	184	172	222
CAP 425nm (tiempo de retención(min))	4.71	3.41	2.90
UV-vis λ máxima en etanol (nm)	429	424	419
Absortividad molar en etanol,425nm($\times 10^4$ L cm ⁻¹ mol ⁻¹)	6.73	5.78	4.95
Bandas características de infrarrojo ^b (cm ⁻¹)	2980-2850	2950-2850	Ausente
^a C, curcumina; DMC, demetoxicurcumina; BDMC, bidemetoxicurcumina.			
^b Alifáticos C-H se extiende debido a OCH ₃ .			

Existen al menos dos formas de la curcumina, ambas tautómeras: el ceto y el enol. El ceto se encuentra en forma sólida y el enol como un líquido en la figura 5 se observan las dos formas de la curcumina. Es soluble en etanol y en ácido acético concentrado.

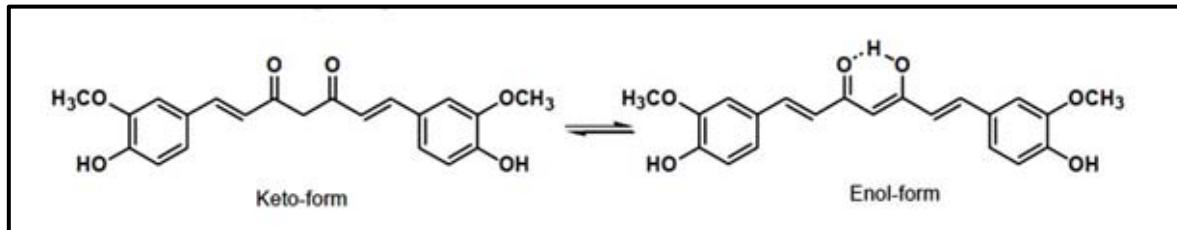


Figura 5. Forma tautomerica de cúrcumina ceto-enol, pH dependiente.

En soluciones ácidas y neutras, así como en el estado sólido, la forma ceto predomina, y la curcumina actúa como un donador potente de protones. En contraste, bajo condiciones alcalinas (\geq pH 8), predomina la forma enólica, y la parte fenólica de la molécula desempeña el papel principal como un donador de electrones^[3]. Sin embargo, los grupos hidroxilo en la posición orto de los anillos aromáticos, son los grupos principales O-H con esta propiedad. El grupo metileno entre la fracción β -diacetona de la cadena heptadienona, contiene un átomo de carbono altamente activado y los enlaces C-H en este carbono son muy débiles a la deslocalización del electrón desapareado en los oxígenos adyacentes^[3]. Estas características estructurales de la curcumina le confieren a la molécula un mecanismo más completo como “atrapador” respecto a otros antioxidantes fenólicos[31].

II.IV. ESTABILIDAD

Los principales componentes de la cúrcuma son relativamente estables a pH ácido, pero rápidamente se descomponen a pH alcalino. Los productos de degradación iniciales se forman después de 5 minutos y el patrón cromatográfico obtenido después de 28 h a pH 8.5 es representativo para la degradación alcalina. El ácido ferúlico y feruloilmetano se forman inicialmente. En la figura 6 se observan los productos de degradación de la curcumina.

En solución, se ha demostrado que el 90% de la curcumina se degrada a trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexanal, vainillina, feruloilmetano, y ácido ferúlico en 30 minutos[32].

En otro estudio [32] se incubó a la curcumina en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2 a 37 °C, y aproximadamente el 90 por ciento se descompuso dentro de 30 min.

La curcumina es inestable a pH básico, pero en presencia de suero de ternera o sangre humana menos del 20% de la curcumina se descompone en 1hr[33]. La adición de antioxidantes (ácido ascórbico, la N-acetilcisteína o glutatión) a los medios de cultivo también inhibe la degradación de la curcumina.

La curcumina no es estable en pHs alcalinos, oxígeno e irradiación de luz ultravioleta y visible. La curcumina es estable a pH < 6.5 [34].

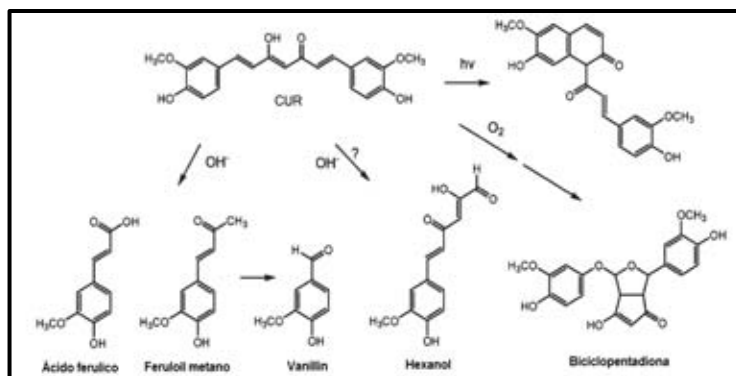


Figura 6. Productos de degradación de curcumina al someterla a condiciones de estrés (hidrolisis alcalina, autoxidacion e irradiación).

II.IV. SOLUBILIDAD

Insoluble en agua y en éter dietílico; soluble en etanol, ácido acético glacial, dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona.

II.I.VI. Constante de acidez (pKa)

A pH < 1, tiene un color rojo que indica la forma protonada (H₄A⁺). En el intervalo de pH 1-7, la mayoría de las especies están en la forma neutra (H₃A). En este intervalo la solubilidad en agua es muy baja y las soluciones son de color amarillo. A pH > 7.5, el color

cambia a rojo. Los valores de pKa de los tres protones ácido (H_2A^- , HA^{2-} y A^{3-}) son 7.8, 8.5 y 9.0, respectivamente [34],[35] como se observan en la figura 7.

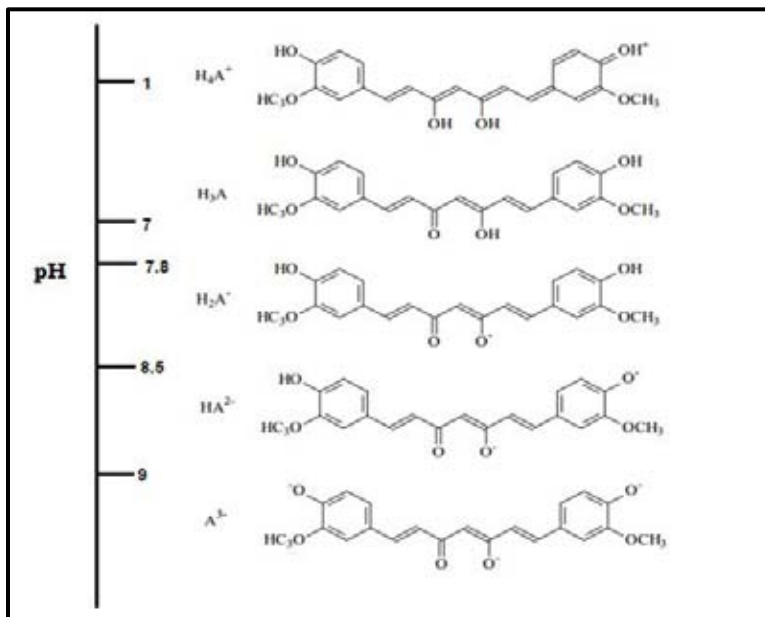


Figura 7. Especies químicas de curcumina.

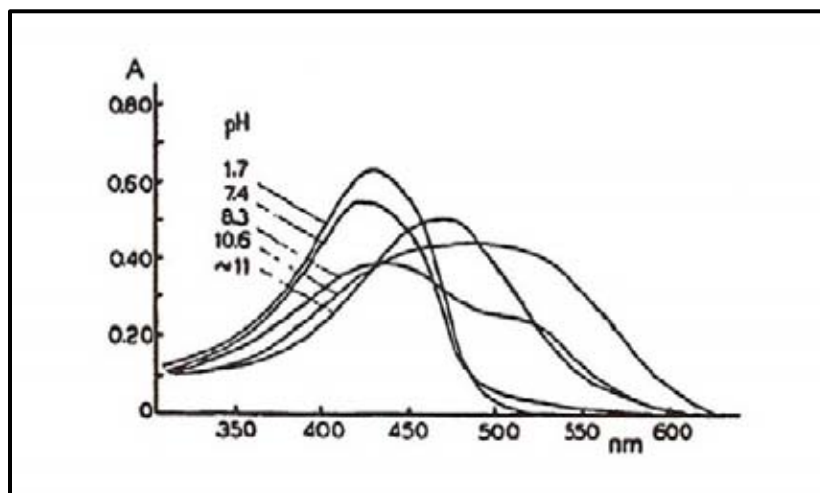


Figura 8. Absorción en UV de curcumina en una solución 1:1 agua-etanol dependiente de pH (Dyrssen, et al., 1972).

II.II.I.EFECTOS BIOLÓGICOS DE CURCUMINA

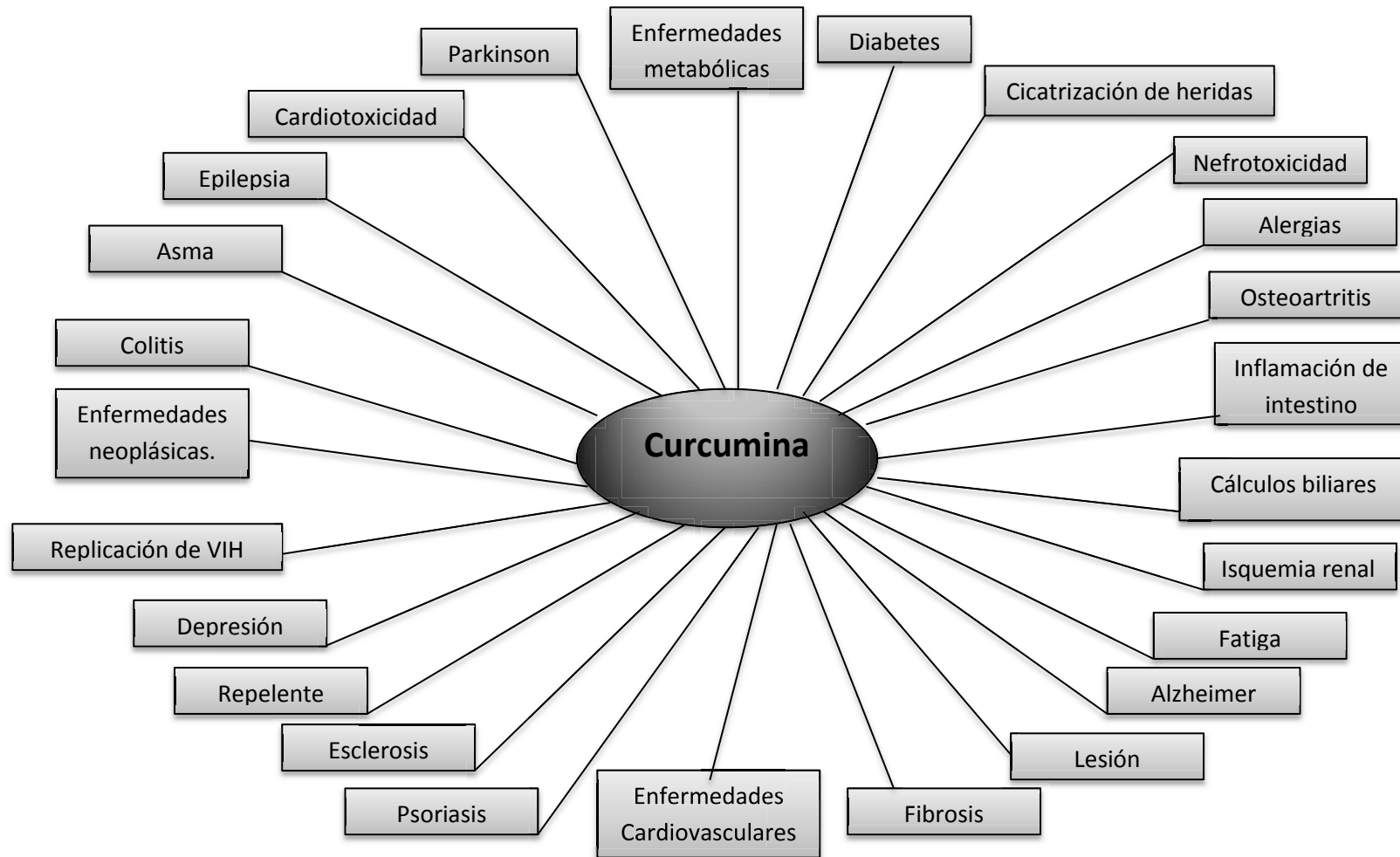


Figura 9. Efectos biológicos de curcumina en enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, autoinmunes y neoplásicas.

Tabla 4. Comparación de actividades biológicas de la curcumina y sus productos de degradación de curcumina[36].

Actividad biológica asociada	Curcumina	Productos de degradación de curcumina
Antioxidante	Expulsar ROS y RNS[37, 38, 39]	Expulsar ROS [40].
	Inhibe lipoproteínas de baja densidad y oxida proteínas y DNA[37, 41].	Inhibe lipoproteínas de baja densidad y oxida proteínas y DNA [40, 42].
	Inhibe ROS- generando enzimas tal como lipoxigenasa/ciclooxigenasa y xantina deshidrogenasa/oxidasa[42, 43].	Inhibe ROS-generando enzimas como lipooxigenasa/ciclooxigenasa[44].
	Regula la defensa de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa [41].	Regula la función de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa, proteínas de choque térmico y hemo oxigenasa-1[41, 45].
	Quelante de metales de transición[46]	
Alzheimer	Inhibe el estrés oxidativo[47, 48].	Protege contra la oxidación de radicales hidroxil y peroxil en células neuronales[40].
	Protege contra A β -inducido por estrés oxidativo [47,48].	Protege contra A β -inducido por estrés oxidativo[49, 50].
	Previene la formación y extensión de fibrillas A β [51, 52].	Previene la formación y extensión de fibrillas A β [53].
	Desestabiliza fibrillas A β [51, 52].	Desestabiliza fibrillas A β [53].
	Inhibe acetilcolinesterasa [54].	Inhibe acetilcolinesterasa [54].
	Disminuye neuroinflamaciones [47, 48].	Disminuye neuroinflamaciones [50].
	Quelante de metales de transición [46].	
Anticancerígeno	Inhibe estrés oxidativo [43, 55].	Inhibe estrés oxidativo [40, 56].
	Reduce peroxidación de lípidos y rotura simple de la cadena de DNA [41, 43].	Reduce peroxidación de lípidos y rotura simple de la cadena de DNA [42, 56].
	Inhibe enzima COX-1 y COX-2 [57].	Inhibe COX-2 [44].
	Suprime la activación de NF- κ B [58].	Suprime la activación de NF- κ B [59].
	Antiproliferativo y efectos apoptóticos.	Antiproliferativo y efectos apoptóticos.
	Induce apoptosis por orientación de mitocondria [57].	NC
	Afecta la señalización de p53	NC
Insuficiencia	Protege contra la hipertrofia cardíaca, la inflamación y la fibrosis a través de la inhibición de p300- HAT [60].	NC

Actividad biológica asociada	Curcumina	Productos de degradación de curcumina
Antibacterial y fungicida	Altera el DNA en presencia de luz visible [61].	NC
Replicación de VIH	Inhibe expresión genética de VIH-1 y sobre la integrasa que interviene en la integración del RNA ciral en la doble cadena de DNA cromosómico antes de la replicación del virus (R)[61].	NC
Diabetes	Revierte los trastornos inflamatorios y metabólicos asociados con la obesidad y mejora el control glucémico en modelos de ratón de diabetes tipo 2 [62].	NC
Gastroprotector	Aumenta la secreción de mucina en conejos y por lo tanto puede actuar como gastroprotector contra los irritantes [63].	NC
Hepatoprotector	Induce contracción de vesícula biliar[64] Previene o revierte piedras de colesterol en la bilis de ratones [65]. Evita la nefrotoxicidad inducida por maleato [57]. Atenúa la generación de fluido de ascitis, y mantiene la actividad de la aconitasa y F1F0 ATPasa [66].	NC
Antinociceptivo	Eficaz en el dolor postquirúrgico [67]. Agente antinociceptivo eficaz [68]. La combinación de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (diclofenaco) con cúrcumina puede incrementar la actividad antinociceptiva, permitiendo el uso de dosis más bajas y limitando así los efectos secundarios [69].	NC
Osteoartritis	Los extractos de cúrcumina son tan eficaces como el ibuprofeno para el tratamiento de la osteoartritis de rodilla. El perfil de efectos secundarios fue similar pero con menos efectos secundarios gastrointestinales[70]. Similitud a los AINE en la supresión de la producción y la acción catabólica de las citoquinas pro-inflamatorias tales como interleucina- β (IL-1 β) y el factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), que juegan un papel clave en la patogénesis de la osteoartritis[71].	NC

NC = No conocido

II.III. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS-MASAS (UPLC-MS/MS)

Considerando que los valores plasmáticos de curcumina son muy pequeños, es necesario utilizar técnicas de alta capacidad de análisis y sensibilidad, tal es el caso de la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos.

II.III.I. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (LC)

Según define la IUPAC[72], "La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa".

II.III.I. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

La espectrometría de masas utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos por la desviación que sufren. El espectrómetro requiere un trayecto de colisión libre para los iones y, por lo tanto, funciona al vacío o en condiciones casi de vacío[73].

Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes básicas [73]:

- 1) Un sistema de introducción de la muestra, diseñado para una mínima pérdida de vacío. La muestra se puede introducir directamente al espectrómetro de masas con una jeringa o a través de otro equipo cromatográfico acoplado a este, ya sea de gases o de líquidos (GC-MS o LC-MS).
- 2) Ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones. Hay dos clases de fuentes de ionización:
 - ❖ Fuentes en fase gaseosa (como ionización química, ionización por impacto de electrones e ionización por campo), en las que la muestra se volatiliza fuera de la fuente de energía antes de ionizar los componentes gaseosos.
 - ❖ Fuentes de desorción (como desorción por campo, bombardeo de átomos acelerados, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz y electroaspersión), en este tipo de fuentes los iones se forman en la fase condensada, y se permite el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente inestables.

La fuente de ionización del equipo utilizado para el método de curcumina desarrollado en este trabajo, es la fuente de desorción por electroaspersión.

En la ionización por electroaspersión (ESI), se aplica una fuerte carga eléctrica al eluyente a medida que emerge de un nebulizador. Las gotas que componen el aerosol resultante sufren una disminución de tamaño (evaporación del eluyente). A medida que el eluyente se evapora, la densidad de carga aumenta hasta que la superficie de las gotas libera iones (evaporación de iones). Estos iones pueden ser mono o multicargados. Los iones con varias cargas eléctricas son especialmente interesantes, ya que el módulo los separa según su relación masa/carga (m/z), lo que permite la detección de compuestos con un peso molecular elevado [74].

- 3) Analizador, que se encarga de separar los iones que se producen en la fuente de acuerdo a las relaciones de masa/carga (m/z). Hay diferentes tipos de analizadores: de sector magnético, por tiempo de vuelo, por trampa de iones y de cuadrupolo (simple o triple)

Este tipo de analizador está formado por cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua que afecta a la trayectoria de los iones viajando por el trayecto centralizado entre los 4 rodillos. Para las condiciones de voltaje introducidas en el equipo, solamente los iones de una relación masa/carga determinada pueden pasar a través del filtro del triple cuadrupolo, mientras los otros son barridos como moléculas descargadas.

- 4) Detector, en el cual los iones separados son recogidos y caracterizados.

El espectro resultante es un gráfico que representa la abundancia relativa de los iones producidos (% de abundancia relativa de los iones producidos) respecto de su relación masa/carga (m/z). La señal correspondiente a un ion aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del ion [75].

En la tabla 5 se observan algunas condiciones de métodos analíticos reportados en la literatura, aplicados en estudios de farmacocinética en diferentes especies.

Tabla 5. Métodos analíticos descritos para la cuantificación de curcumina en plasma utilizando HPLC, UPLC-MS/MS, UPLC, electroforesis capilar.

Especie	Equipo	Fase Móvil	Columna	Flujo Vol.de inyección	T de Col. °C	Tr (min)	λ (nm)	Sol. stock	Rango	EI	Extracción de plasma	Ref
Cerdo	Waters 717-plus automuestrador con unidad de refrigeración, Waters 996 arreglo de fotodiodos, y Waters 515 bomba	A: 1% (w/v) solución de ácido cítrico, ajustando a pH 3.0 usando a 45% (w/v) Solución de hidróxido de potasio. B: Tetrahidrofurano 50:50 (v/v).	SymmetryShield C18 (150 mm \times 3.9 mm, 5 μ m)	1 mL/min	25	5.17	430	MeOH	2.5-50 ng/ml	B-Estradiol	Cloroformo	[76]
Rata	HPLC Shimadzu UV/VIS detector SPD-10A Fase Reversa	A: Metanol B: 3.6% (v/v) Solución acuosa de ácido acético 73:27 (v/v)	Hypersil ODS-C18 (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm)	0.8 mL/min	25	2.5-3.0	425	MeOH	9.98-99.98 ng/mL	Curcumina 98%	Acetato de etilo	[77]
Estándar de curcumina	UPLC-UV-MS PDA (Waters)	A: Acetonitrilo B: 0.05% Ácido fórmico 0min 55:45(v/v) 5min 20:80(v/v)	Acquity UPLCTM BEH Shield RP18 column (50 mm \times 2.1mm I.D., 1.7 μ m)	0.25 mL/min	40		m/z 367	MeOH				[78]
Rata	HPLC SPD-10A VP UV-Vis	A: 1% ácido cítrico ajustado a pH=3.0 B: Acetonitrilo C: Tetrahidrofurano 45:35:20(v/v)	LiChrospher® C18 column (4.6 \times 200 mm, 5 μ m)	1 mL/min 40 μ l	30		425	Fase movil	0.03-25 μ g/mL		Acetato de etilo/metanol 95:5(v/v)	[79]

Espece	Equipo	Fase Móvil	Columna	Flujo Vol.de inyección	T de Col. °C	Tr (min)	λ (nm)	Sol. stock	Rango	El	Extracción de plasma	Ref
Rata	LCMS/MS usando Waters 2690 con (PDA) detector de fotodiodos, electroaspersión ionization (ESI)	A:Acetonitrilo B: 1mM de ácido acético 70:30(v/v)	Zorbax extend-c18 column (150×4.6 mm x 5 μ m)	0.8 mL/min 10 μ L	-	2.45	m/z 368/217	EtOH	5-10000 ng/mL	Honokiol	-	[17]
Rata	Agilent HPLC system AB Sciex API 4000 tandem mass espectrofotometro (-) ESI	A:Acetonitrilo/Agua B: 0.005% ácido acético 70:30(v/v)	Phenomenex Luna C18(250 mmX4.6 mm)	0.2 ml/min 10 μ l	-	5		MeOH	0.5-500 ng/L	Salbutamol	Acetato de etilo	[80]
Rata	Agilent 1100; API 4000; LC/MS/MS triple cuádrupolo (+)	A: Acetonitrilo B: Sol. Amortiguadora de acetato de amonio 10mM(pH=3.5) 80:20(v/v)	Chromolith rodTM (50 mm×4.6 mm, 5 m)	0.8 ml/min		3	m/z 367/217	MeOH	10-2000 ng/mL	Nimesulida		[81]
Humano	HPLC-MS MS micro-LC Shimadzu API 3200 de masas en tándem ionizacion por electroaspersión (ESI).	A: 0.05%Solución de ácido fórmico B:Acetonitrilo	C- 18 T3 columna Atlantis-(2,1mm x 150 mm, 3mm)	0.2 ml/min	40	35	m/z 369/285	MeOH	0.2-100 ng/mL	Mepronil	Cloroformo	[23]

Especie	Equipo	Fase Móvil	Columna	Flujo Vol.de inyección	T de Col. °C	Tr (min)	λ (nm)	Sol. stock	Rango	EI	Extracción de plasma	Ref
Rata	API 2000 MS/MS con Acquity UPLC, detector UV	A: Solución acuosa al 5% de Acetonitrilo ajustado a pH 3.5 B: Acetonitrilo.	RP18 (2.1 mm × 100, 1.7 μ m)	0-0.2min, 15% B, 0.54 mL/min 10 min, 45% B 0.6 mL/min; 14 min, 52% B at 0.6mL/min	35	16	426		5-200 ng/mL	Quercetina	Extracción fase sólida	[82]
Humano	HPLC MS/MS ESI	A: Acetonitrilo B: Ácido fórmico (0.15%) (60:40, v/v)	XB-C8 (4.6 × 250 mm, 5 μ m,	1.0 ml/min.			m/z 369.9→177.0		1-100 ng/mL	Diazepam		[83]
Estándar	Development and validation of UPLC method for quality control of Curcuma longa Linn.: Fast simultaneous quantitation of three curcuminoides	0.05% Ácido fosfórico en solución acuosa Acetonitrilo 34:66(v/v)	Waters BEH Shield RP C18, 2.1 mm×100 mm, 1.7 mm columna.	0.4 ml/min		2min			3.28-46.08 μ g/ml.			[81]

EI Estándar interno

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el perro, la forma más común de enfermedad articular es la osteoartritis, una patología compleja y progresiva de las articulaciones sinoviales que se caracteriza por la degeneración del cartílago articular, resultado de la combinación de la tensión mecánica y aumento principalmente de metaloproteinasas y ROS.

Tradicionalmente, la base del tratamiento conservador de la osteoartritis ha sido el uso de antiinflamatorios no esteroideos para proporcionar alivio sintomático del dolor. Sin embargo, el uso de los AINES se asocia a menudo con efectos secundarios gastrointestinales [84]. Por estas razones surge la necesidad de tratamientos alternativos, tal es el caso de curcumina, que ha sido orientada para este propósito[85].

Shakibaei y colaboradores establecieron una similitud de curcumina con los AINES en la supresión de la producción y la acción catabólica de las citoquinas pro-inflamatorias tales como Interleucina- β (IL-1 β) y factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), los cuales juegan un papel clave en la patogénesis de la osteoartritis. La cúrcumina también ha demostrado ser un eliminador eficaz de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno in vitro[86, 87].

En respuesta a este problema el laboratorio LEDEFAR desarrollo tres formulaciones de nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina en suspensión para uso veterinario. Para determinar la eficacia de estas formulaciones es necesario determinar la cantidad y la velocidad de curcumina en plasma mediante un estudio de biodisponibilidad, el cual implica el uso de un método analítico. Por esta razón se debe desarrollar y validar un método analítico para estudiar la biodisponibilidad de cúrcumina en formas farmacéuticas debido a que no existe reportado un método para este fin.

IV.- MARCO DE REFERENCIA

Las propiedades físico-químicas de la curcumina son una limitante que ha provocado muchos retos a los científicos para el desarrollo de la formulación, el principal reto es presentarla en una forma biodisponible de tal manera que la eficacia clínica se mejore. Para ello se han generado numerosas estrategias de formulación, como las nanopartículas, liposomas, microemulsión, complejación con fosfolípidos y ciclodextrinas, dispersiones con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad de la curcumina [16, 32].

Considerando que es una forma farmacéutica nueva (matrices poliméricas) y que no existe información sobre algún método analítico para cuantificar curcumina en plasma de perro y en matrices poliméricas, la finalidad de este proyecto es desarrollar y validar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución que cumpla criterios de guías internacionales.

En la literatura ya se han descrito diferentes métodos por cromatografía de líquidos para cuantificar curcumina. En los años cincuenta se desarrolló un método para separar y cuantificar curcuminoides a partir de la *Cúrcuma longa* L. Otro método analítico mediante

cromatografía de líquidos fue desarrollado para medir la curcumina y sus compuestos relacionados [88].

Los métodos para medir la curcumina en muestras biológicas ya se han establecido con alto rendimiento por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección espectrofotométrica en la región ultravioleta (UV) utilizando extracción líquido-líquido como pre-tratamiento del plasma de cerdo [16]. Recientemente, la curcumina y sus metabolitos se midieron en matrices biológicas por ionización asistidas por una matriz (MALDI). Se han desarrollado métodos de CLAR para la cuantificación de la curcumina en muestras biológicas. Los métodos que utilizan CLAR en modo isocrático se caracterizan por tener tiempos de retención cortos pero falta de sensibilidad (límite de cuantificación de aproximadamente 70 ng/ml) [89].

Ireson y colaboradores [90] utilizando gradiente de CLAR logró una buena separación y un límite de cuantificación aproximadamente 7 ng/ml. Sin embargo el tiempo de retención para la curcumina era demasiado largo (aproximadamente 40 min) por lo que se descartó su uso para análisis rutinario de curcumina. Pak et al. [22] desarrollaron un método empleando CLAR con un tiempo de retención razonable. Smith y Witowska (1984) determinaron curcumina en cúrcuma por cromatografía líquida a alta presión (CLAP) y espectrometría ultravioleta comparando la sensibilidad de los dos detectores. Los autores señalaron que la elución de los componentes con acetonitrilo: agua (60:40) fue insatisfactoria debido a que no se obtuvo buena resolución de los picos.

Los cromatogramas obtenidos usando un detector de ultravioleta a 254 nm y acetonitrilo: buffer de pH 4.4 (60:40) como eluente mostraron un pico a un tiempo de retención de $k' = 2.25$, lo cual según los autores se identificó como curcumina por comparación con un estándar, y dos picos menores de similar tiempo de retención ($k' = 1.93$ y 2.09), los cuales estuvieron presentes también en el estándar.

Sin embargo la mayoría de estos métodos son en plasma de ratas y humanos y dado que el estudio de biodisponibilidad se realizara en plasma de perros es necesario desarrollar el método analítico y validarlo para este tipo de muestra en particular.

V.- JUSTIFICACIÓN

El reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal establece que en el caso de moléculas nuevas, formulaciones que impliquen la alteración o modificación de la liberación y absorción de la sustancia activa, formulaciones de dos o más activos sin que exista un producto precedente de referencia, nuevas vías de administración o nuevas especies animales de los cuales no hayan referencias, se deberá presentar la información desarrollada por el elaborador mediante estudios de farmacocinética de residuos, con base en lo siguiente:

1. Los estudios contemplarán la detección de los ingredientes activos y, cuando proceda, de sus metabolitos. En caso de que no exista una razón farmacológica para no realizarse los estudios, deberá justificarse técnicamente.
2. Presentarse los estudios de eficacia y seguridad del producto en cada especie animal en la que se indica su uso.

Considerando que los estudios de biodisponibilidad se realizan *in vivo* y que el costo es elevado se debe asegurar la calidad y la reproducibilidad de la información obtenida y finalmente caracterizar los métodos con el fin de identificar los factores que influyen en su desempeño para establecer las forma de controlarlos.

VI.- HIPÓTESIS

Si se desarrolla y valida el método analítico considerando las condiciones de cada prueba y sus respectivos criterios de la guía internacional de bioequivalencia de medicamentos veterinarios entonces los datos obtenidos en el estudio de biodisponibilidad de formas farmacéuticas orales de curcumina serán confiables y permitirán determinar la eficacia y calidad de estas formas farmacéuticas

VII.- OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico por LC MS/MS para cuantificar curcumina en plasma afín de evaluar la biodisponibilidad de formas farmacéuticas orales en perros de acuerdo a guías internacionales.

VII.I OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una investigación documental para conocer las propiedades del principio activo y así establecer las condiciones del tratamiento de la muestra biológica.
- Realizar un estudio de factibilidad para determinar curcumina en plasma de perro por cromatografía de líquidos en el laboratorio de LEDEFAR.
- Proponer condiciones de operación para el desarrollo del método analítico.
- Seleccionar el tipo de tratamiento de muestra (fase sólida, precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido) más eficiente para cuantificar curcumina en plasma de perro.
- Optimizar el método analítico propuesto para estudiar la biodisponibilidad de la curcumina en plasma de perro.
- Realizar un piloto con las nanocápsulas mucoadhesivas formuladas en el laboratorio para evaluar la factibilidad del método.

VIII. PARTE EXPERIMENTAL

VIII.I. SUSTANCIAS, REACTIVOS Y EQUIPOS

VIII.I.I. ESTÁNDARES

Estándares y materias primas	Proveedor	Grado
Mezcla de curcuminoides	Sigma-Aldrich	Estándar secundario
Clopidogrel Bisulfato	Teva	Estándar secundario

VIII.I.II. REACTIVOS

Disolventes	Proveedor	Grado
Metanol	J.T.Baker	HPLC
Acetonitrilo	J.T.Baker	
Ácido Fórmico 88%	J.T.Baker	
Cloroformo	J.T.Baker	
Acetato de etilo	PQ.Monterrey	
n-Propanol	J.T.Baker	
Diclorometano	J.T. Baker	
Agua Milli-Q		

VIII.I.III. MATERIAL

Material	Especificaciones	Clase	Marca
Pipetas volumétricas	3 mL	A,B	Kimex, pirex
Micropipetas	5-50 µl, 100-1000 µl	-	Finnpipette
Placas de 96 pozos	1mL	-	Waters
Vasos de precipitados	50, 100, 250 mL		Kimex
Matraces volumétricos	10, 25, 50, 100, 200 mL	A,B	Kimex
Piseta	-	-	-
Espátula	-	-	-
Tubos de ensaye	5 mL	-	-
Tubos tubo de microcentrífuga	2 mL	-	-
Filtros	-		-
Cartuchos Sepack C18 Cartridges	WAT051910	-	-
Columna Acquity UPLC Bech Shield RP ₁₈ 1.7 µm 2.1X10 mm.	No. de serie 01473231515596	-	Waters

VIII.IV. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipo/Instrumento	Marca	Modelo	Inventario
Balanza analítica	Ohaus	AP250D	114050584
Acquity UPLC	Waters	SYLI2UPA182M	-
Xevo TQ ESI	Waters	-	-
UPH	Waters	F12UPH4186	-
Bomba	Waters	K12UPB287A	-
Potenciómetro	Mettler Toledo	Seven Multi	02228926
Termometro-Higrometro	UNAM	-	1581109
Micro Centrífuga 22R	Beckman Coulter	-	2193178
Ultra centrifuga	Beckman Coulter	Optima XL-100K	COXO417
Agitador vortex	Vortex genie	594376	-
Equipo para purificación de agua de osmosis inversa	Millipore	-	-
Refrigerador compacto capacidad 104.77 dm	LG	-	-

VIII.IV. MATERIAL BIOLÓGICO.

Plasma de perros sanos: Para la preparación de las curvas de calibración durante el desarrollo y la validación del método analítico se empleó plasma de perro proporcionado por el Hospital de pequeñas Especies ubicado en FESC-C4 y la Unidad de Enseñanza Quirúrgica FESC-C4. Se recopiló muestras de sangre de perros sanos para formar el pool, posteriormente se centrifugo a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C, finalmente se separó el plasma del paquete celular y el plasma fue almacenado a -20°C hasta su uso.

IX.-DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La fase experimental de este trabajo se divide en tres etapas:

1. Estudio de factibilidad para determinar curcumina en plasma de perro por LC MS/MS en el laboratorio de LEDEFAR
2. Desarrollo del método cromatográfico para definir el ensayo de cuantificación de curcumina en plasma de perro.
3. Validación del método cromatográfico para cuantificar curcumina en plasma de perro en formas farmacéuticas orales.
4. Estudio de piloto de curcumina en perros mestizos sanos.
 - 3 perros mestizos con un peso promedio de 6 Kg \pm 20 Kg

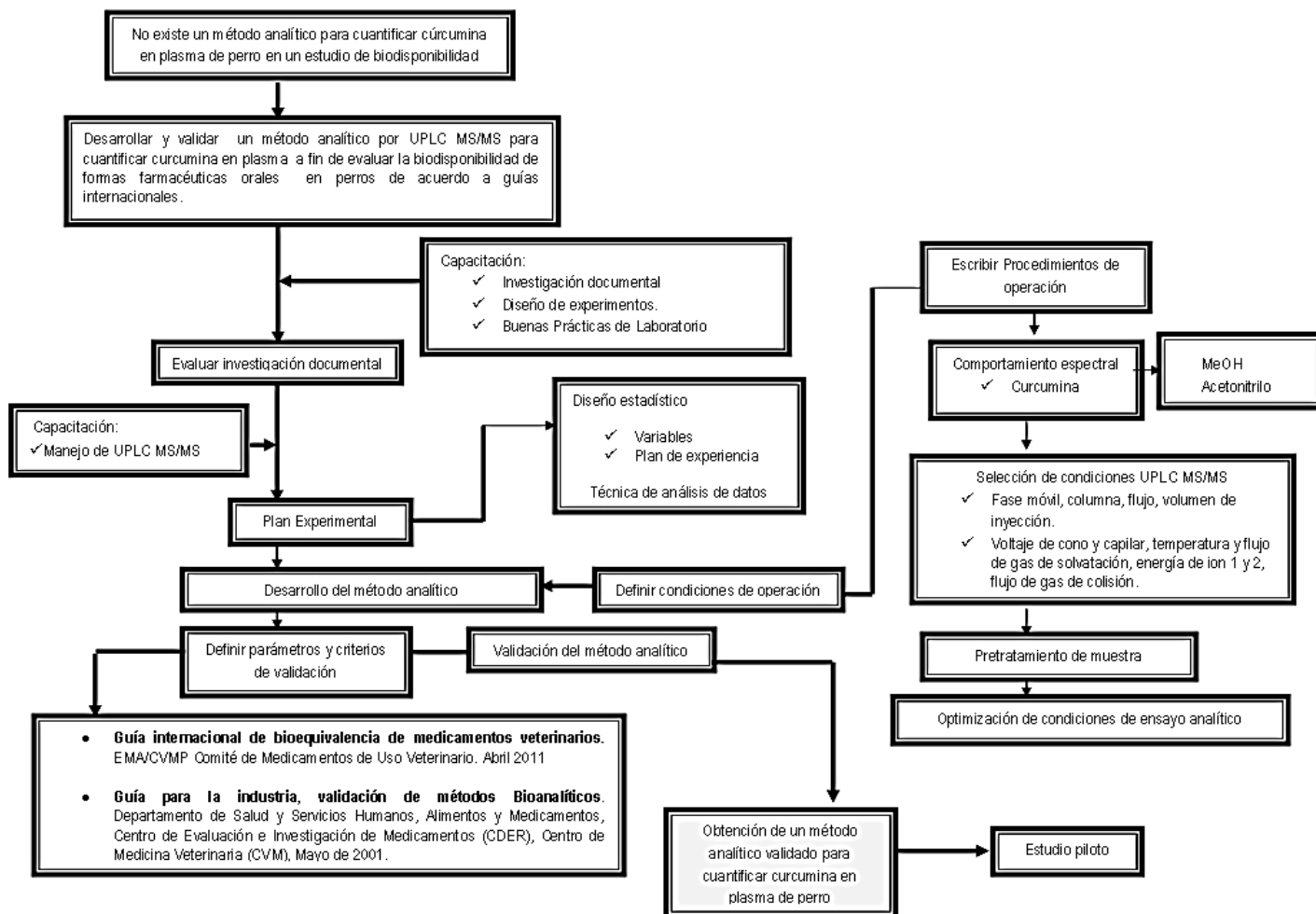


Figura 10. Cuadro metodológico.

X. DESARROLLO EXPERIMENTAL

X.I. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

X.I.I. SELECCIÓN DE CONDICIONES UPLC MS/MS

Durante el desarrollo del método para la cuantificación de curcumina en plasma se consideraron las propiedades fisicoquímicas de la molécula. Primero se establecieron los parámetros para fragmentación de ion molecular de curcumina y clopidogrel bisulfato para ello se preparó una solución de 100 ng/mL de curcumina y clopidogrel bisulfato en metanol/ácido fórmico 0.1% y solución diluyente.

X.I.I.I. SELECCIÓN DE FASE MÓVIL

Considerando que las restricciones de disolventes empleados en métodos por espectrometría de masas son amplias y que la mala elección puede provocar problemas como supresión iónica, contaminación en la fuente y capilares, se probaron dos fases móviles con las siguientes condiciones cromatográficas:

1. **Fase móvil 1:** A = Solución acuosa con 0.1% de ácido fórmico, B= Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico, flujo de 0.25mL/min. En proporciones (% A = 30, 50,10 y %B = 70, 50, 90).
2. **Fase móvil 2:** A = Solución acuosa con 0.1% de ácido fórmico, B= Metanol con 0.1% de ácido fórmico, flujo de 0.25mL/min. En proporciones (% A = 30, 50,10 y %B = 70, 50, 90).

La selección de fase móvil se realizó considerando los siguientes puntos en los cromatogramas:

- La señal de cúrcumina superior a la señal de ruido.
- El tiempo de retención de la curcumina no fuera mayor a 3 minutos.
- El tiempo de retención de curcumina no fuera menor a 1.5 debido a que existe mayor probabilidad de interferencia como (residuos de lípidos y proteínas).

X.I.I.II. SELECCIÓN DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA

La elección de la columna cromatografía es de gran importancia debido a que en ella se llevara la separación de la curcumina y del clopidogrel bisulfato, se contemplaron como referencia experimentos previos que utilizan fase reversa y columnas C18 como las ideales, considerando lo anterior se probaron dos columna C18 en diferentes flujos (0.1, 0.25 y 0.5 mL/min) y proporciones (A: B; 90:10, 70:30, 40:60, 50:50).

- ACQUITY UPLC™ BEH Shield RP18 y ACQUITY UPLC™ BEH C18.

X.I.III. VOLUMEN DE INYECCIÓN

Se realizaron pruebas con tres volúmenes de inyección para verificar que el volumen es directamente proporcional a la respuesta. En el siguiente cromatograma se observa el cromatograma de una muestra a concentración de 100 ng/mL inyectada a diferentes volúmenes (3, 5, 7.5 μ L).

X.I.II. SELECCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO

Los métodos bioanalíticos requieren el uso de un estándar interno para reducir el efecto de la matriz biológica en la cuantificación del analito. Este método se basa en una comparación de las intensidades de la señal correspondiente del producto que tiene que ser cuantificado con la de un compuesto de referencia llamado el estándar interno. Este método permite la eliminación de las diversas fuentes de errores.

El estándar interno debe mostrar propiedades físicas y químicas que se encuentren lo más cerca posible a la molécula por cuantificar. Debe ser puro, ausente de la muestra y, por supuesto, inerte frente a los compuestos en la muestra. Las normas internas se pueden clasificar en tres categorías: análogos estructurales que están etiquetados con isótopos estables, homólogos estructurales y compuestos de la misma familia química [93].

En el caso de las normas correspondientes a homólogos estructurales o en el caso de compuestos que pertenecen a la misma familia química, los iones que se utilizan deben tener masas diferentes de la del compuesto que se debe medir si se utiliza la introducción directa. Sin embargo, si la introducción se lleva a cabo por acoplamiento cromatográfico y si el tiempo de retención del compuesto es diferente a el estándar interno, los iones pueden tener masas idénticas [93].

Considerando los criterios antes mencionados se realizó una búsqueda de las moléculas químicas similares que posiblemente se emplearían como estándar interno, los cuales se observan en la tabla 11, a cada uno de estos estándares se realizó una infusión directa y se determinó su ion padre e hijo empleando los parámetros de fragmentación de ion molecular de curcumina.

Posteriormente se inyectó cada molécula bajo las condiciones de cuantificación de la cúrcuma.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de la curcumina e iones padre e hijo.

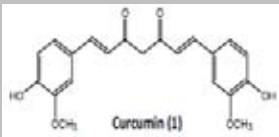
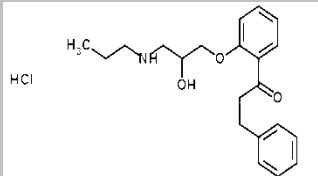
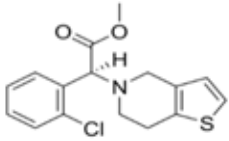
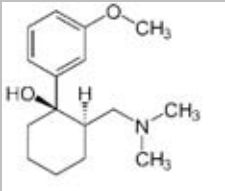
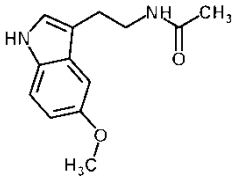
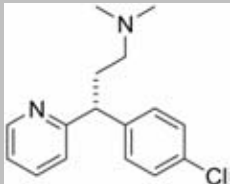
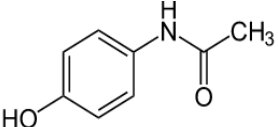
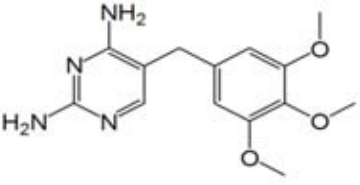
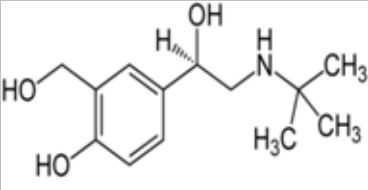
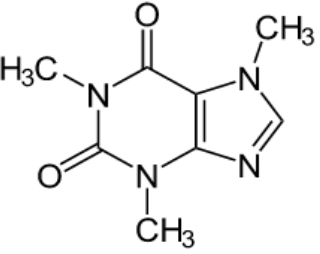
Molécula	Propiedades fisicoquímicas	Ion padre/Ion hijo en ESI +
Curcumina 	$C_{21}H_{20}O_6$ PM: 368.38 g/mol pka: (H_2A^- , HA^{2-} y A^{3-}) son 7.8, 8.5 y 9.0, respectivamente Log P : 2.87 Solubilidad: Insoluble en agua y en éter dietílico; soluble en etanol, metanol, cloroformo, ácido acético glacial, dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona.	367→217 m/z 367→285 m/z 369.9→177 m/z

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de posibles estándares internos.

Molécula	Propiedades fisicoquímicas	Ion padre/Ion hijo en ESI +
Clorhidrato de propafenona 	$C_{21}H_{27}NO_3 \cdot HCl$ PM: 377.9 g/mol pka: 8.8 Log P : 3.93 Solubilidad: Agua caliente o alcohol; ligeramente soluble en agua fría.	342→324 m/z
Clopidogrel Bisulfato[94] 	$C_{16}H_{16}ClNO_2S$ PM: 321.82 g/mol pka: 5.14 Log P : 4.23±0.53 Solubilidad: Agua (50.78 mg/L)	321.9→211.9 m/z 321.05 →212 m/z
Tramadol[95][96] 	$C_{16}H_{25}NO_2$ PM: 263.18 g/mol pka: 9.41 Log P : 2.4 Solubilidad: soluble en diclorometano, metanol, agua.	264.2→58.1 m/z
Melatonina[97][98] 	$C_{13}H_{16}N_2O_2$ PM: 232.28 g/mol pka(ácidos fuertes): 15.18 pka(bases fuertes): -0.94 Log P : 1.6 Solubilidad: Alta solubilidad en solventes polares. Propiedades fisicoquímicas	233.2→174.1m/z 233.2→159.1 m/z
Maleato de clorfenamina 	$C_{16}H_{19}N_2Cl$ PM: 274.88 g/mol pka: 9.13 Log P : 3.38 Solubilidad: Soluble en agua, etanol y cloroformo, ligeramente soluble en éter.	275.0→229.9 m/z
Paracetamol[99] 	$C_8H_9NO_2$ PM: 151.17 g/mol pka: 9.38 Log P : 0.46 Solubilidad: Ligeramente soluble	152.0→110.1 m/z 152.0→80 m/z 152.0→25 m/z

Molécula	Propiedades fisicoquímicas	Ion padre/Ion hijo en ESI +
Trimetoprim[100] 	$C_{14}H_{18}N_4O_3$ PM: 290.32 g/mol pka: 7.12(20°C) Log P : 0.91 Solubilidad: en agua $6.51e^{-1}$ g/l	291.2 → 123.1 m/z
Salbutamol[101][102] 	$C_{13}H_{21}NO_3 \cdot H_2SO_4$ PM: 239.31 g/mol pka: 10.3 (ácido fuerte) pka: 9.4 (base fuerte) Log P : 1.4 Solubilidad: Soluble en etanol, poco soluble en agua, su solubilidad disminuye al aumentar el pH.	240.2 → 148.1 m/z
Cafeína[103] 	$C_8H_{10}N_4O_2$ PM: 194.12 g/mol pka: 10.4 (40°C) Log P : -0.07 Solubilidad: en agua $2.16 E+004$ mg/L / a 25°C	195.1 → 138.1 m/z 195.19 → 138.12 m/z 195.1 → 137.9 m/z

X.I.III. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE PLASMA DE PERRO.

Durante el desarrollo del método se estableció una técnica de extracción para curcumina y clopidogrel bisulfato con la finalidad de remover las impurezas e interferencias contenidas en la matriz biológica (plasma de perro).

Para seleccionar la técnica de extracción apropiada fue necesario considerar las propiedades físicas y químicas de la curcumina, la naturaleza de la matriz de la muestra, la forma en la que se presenta el analito en la muestra, compatibilidad de los medios de solubilización y tipo de detector[104, 105].

La mejor técnica de extracción debe de ser simple, rápida, tener alta eficiencia de extracción con recobros cuantitativos y reproducibles, específica al analito y de bajo costo.

Para elegir la el pretratamiento más eficiente se realizó el proceso de extracción de curcumina en plasma de perro, utilizando las tres técnicas de extracción (precipitación de

proteínas, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida), para cada uno se emplearon diferentes disolventes orgánicos, considerando que la eficacia de una extracción va ligado a la eliminación de las interferencias lo primero por determinar fue la presencia de proteínas después de realizar el proceso de extracción.

Para ello se prepararon muestras de plasma de perro y se realizó la extracción de precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido. En el caso particular de precipitación de proteínas, se adiciono 1 mL por separado de (metanol, acetonitrilo y acetona fría -20°C), se agitó vigorosamente en vortéx y posteriormente, se sometió a centrifugación de 14000 rpm y se recopilo el sobrenadante y a esa solución se realizó lectura en espectrofotómetro UV a esas dos longitudes de onda y como solución blanco se empleó el disolvente que se utilizó para precipitar las proteínas (metanol, acetonitrilo y acetona -20°C de manera individual)

X.I.III.I. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

La precipitación de proteínas se utiliza comúnmente para una limpieza rápida, e implica la desnaturalización (pérdida de estructuras terciarias y secundarias) de las proteínas presentes en la matriz biológica. La desnaturalización generalmente se realiza empleando ácidos fuertes, sales, metales o disolventes orgánicos, para el caso de métodos por LC MS/MS se emplean disolventes orgánicos para evitar una posible contaminación al sistema o una supresión iónica por el empleo de metales.

Precipitación de proteínas con acetonitrilo

Para seleccionar el tipo de extracción se empleó una solución stock de mezcla de curcuminoides 2000 ng/mL

1. Colocar un 900 μ l de pool de plasma de perro que contiene 50 μ L de una disolución de mezcla de curcuminoides de (2000 ng/mL) y 50 μ L de clopidogrel bisulfato en un tubo tubo de microcentrífuga de 2 mL.
2. Adicionar 1mL de acetonitrilo
3. Agitar en vortex vigorosamente durante 30 segundos.
4. Centrifugar la muestra para remover las proteínas a (14000 rpm, 15 min, 4°C) en micro centrifuga.
5. Inyectar el sobrenadante en sistema LC MS/MS (500 μ L).
6. Inyectar estándar de curcumina en sistema LC MS/MS (500 μ L)
7. Realizar el proceso de extracción a una muestra sin adicionar curcumina y sustituir cantidad por solución diluyente.
8. Inyectar blanco en sistema LC MS/MS (7.5 μ L)

De la misma manera se realizó el procedimiento de precipitación de proteínas pero como agente precipitante, se utilizó acetona fría a -20°C.

X.III.II. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Esta técnica de separación indirecta que aprovecha la solubilidad preferencial de una sustancia A en un solvente B. El principio de dos líquidos inmiscibles para la extracción del analito. Sin embargo, esta técnica tiene varias limitaciones tales como la baja recuperación, la necesidad de un gran volumen de muestra, pobre selectividad y efectos de la matriz en LC /MS/MS[108].

Como ya se citó en tablas anteriores la curcumina es muy soluble en cloroformo de tal manera que se realizó la extracción líquido-líquido considerando el siguiente orden.

Extracción líquido-líquido con cloroformo

1. Colocar un 900 μ l de pool de plasma de perro que contiene 50 μ L de una disolución de mezcla de curcuminoides de (2000ng/mL y 1000 ng/mL) y 50 μ L de clopidogrel bisulfato en un tubo tubo de microcentrífuga de 2 mL.
2. Adicionar 1 mL de cloroformo
3. Agitar en vortex vigorosamente durante 30 segundos.
4. Centrifugar la muestra para remover las proteínas a (14000 rpm, 15 min, 4°C) en micro centrifuga.
5. Separar capa orgánica (500 μ l) y evaporar a sequedad en un baño maría a temperatura de 79°C.
6. Reconstituir con 500 μ l de solución diluyente.
7. Inyectar en sistema LC MS/MS (500 μ L).
8. Inyectar estándar de curcumina en sistema LC MS/MS (500 μ L)
9. Realizar el proceso de extracción a una muestra sin adicionar curcumina y sustituir cantidad por solución diluyente.
10. Inyectar blanco en sistema LC MS/MS (7.5 μ L)

Del mismo modo se realizó el procedimiento de extracción líquido-líquido pero se utilizó la mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 que se emplea para la purificación y extracción de ADN.

X.III.III. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Otra técnica de extracción es la fase sólida la cual utiliza el mismo principio de afinidad basada en la separación como la cromatografía líquida. En general, los objetivos de extracción en fase sólida son la retención y la elución del analito del fluido biológico, eliminando los contaminantes y las sustancias que interfieren en la cuantificación.[109] El procedimiento para evaluar esta técnica de extracción fue el siguiente:

1. Acondicionar Cartuchos Sepack C18 Cartridges con 1 mL de metanol/agua 50:50
2. Colocar 1 mL de plasma de perro que contiene 50 μ L de una disolución de mezcla de curcuminoides de (2000 ng/mL) y 50 μ l de solución diluyente a flujo de 1 mL/min.
3. Lavar cartucho con 1 mL de ácido fórmico 0.1% a flujo de 1 mL/min
4. Eluir la muestra con 1 mL de ACN/AF 0.1% 60:40 a flujo de 1 mL/min.
5. Inyectar en sistema LC MS/MS 7.5 μ L.

X.I.IV. PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN

Los métodos bioanalíticos requieren de una curva de calibración, lo primero por realizar fue la determinación del rango, por lo cual se consideró las concentraciones máximas reportadas en los artículos.

La suspensión de nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina formulada en el laboratorio LEDEFAR contiene 1 mg de curcumina por mL. La dosis administrada dependerá del peso del perro. Considerando que el volumen de sangre en un perro sano es aproximadamente de 79-90 ml/kg y teniendo en cuenta que el animal es maduro, sano y con un plan de nutrición adecuado.

La dosis a administrar será de 30 mg/Kg de peso. En la tabla 2 se observan parámetros farmacocinéticos de diferentes formulaciones que contiene curcumina, considerando dichos parámetros se estableció que el rango para el sistema y método fuera de 3-160 ng/mL.

X.I.IV.I. Disolución estándar de mezcla de curcuminoides

Transferir 14.28 mg de la mezcla de curcuminoides a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar a volumen con solución diluyente. (Stock 1 **200000 ng/ml**)

Hacer una dilución transfiriendo 10mL de la disolución estándar de la mezcla de curcuminoides (Stock 1) a un matraz de 50 mL y llevar a volumen con solución diluyente (STOCK2 **40000 ng/mL**). De la disolución de la mezcla de curcuminoides (Stock 2) se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 1 y se llevó a volumen con solución diluyente (mezcla 60:40 ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo y solución de ácido fórmico al 0.1% en agua Milli-Q).

De la disolución de la mezcla de curcuminoides (Stock 2) se transfirieron 1000 µL a un matraz de 20 mL y se llevó a volumen con solución diluyente (Stock 3). Del (Stock 2, 3 y SST6) se transfirió el volumen de la tabla 20 y se llevó a volumen con solución diluyente.

Tabla 8. Preparación de SST1-6.

Identificación de Stock	Alícuota (µL)	Aforo a volumen (mL)	Concentración de curcumina (ng/mL)	Identificación de Stock
Stock 2	800	10	3200	SST6*
Stock 2	600	10	2400	SST5
Stock 2	400	10	1600	SST4
Stock 2	200	10	800	SST3
SST6*	625	10	200	SST2*
Stock 3	300	10	60	SST1

X.IV.II. Disolución estándar de Clopidogrel bisulfato (Estándar interno).

Pesar por duplicado, aproximadamente 10.0 mg de Clopidogrel Bisulfato, sustancia de referencia, registrar su peso exacto y transferir la pesada de manera independiente a matraz volumétrico de 50 mL, adicionar aproximadamente 40 mL de solución diluyente y disolver, llevar a volumen con solución diluyente y homogenizar.

Transferir de manera independiente una alícuota de 5 mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 25 mL, llevar a volumen con solución diluyente y mezclar. (Solución Co1, concentración \pm 40000 ng/mL de Clopidogrel Bisulfato).

Transferir de manera independiente una alícuota de 0.2 mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con solución diluyente y mezclar. (Solución Co2, concentración \pm 800 ng/mL de Clopidogrel Bisulfato).

De la disolución de la mezcla de curcuminoides (SST 1-6) se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 21 y se llevó a volumen con pool de plasma de perro.

Tabla 9. Preparación de curva de calibración C1-6.

Identificación de solución	Alícuota (μL) (SST 1-6)	Alícuota (μL) (Co2)	Aforo a volumen (μL)	Concentración (ng/mL)
C1	50	50	1000	3
C2	50	50	1000	10
C3	50	50	1000	40
C4	50	50	1000	80
C5	50	50	1000	120
C6	50	50	1000	160

X.IV.III. Preparación de los puntos de control (PC) en solución diluyente

Disolución estándar de mezcla de curcuminoides

De la disolución de la mezcla de curcuminoides (Stock 2) se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 22 y se llevó a volumen con solución diluyente.

Tabla 10. Preparación de SPC1-3.

Identificación de Stock	Alícuota (μL)	Aforo a volumen (mL)	Concentración (ng/mL)
SPC1	150	10	600
SPC2	450	10	1800
SPC3	750	10	3000

De la disolución de la mezcla de curcuminoides (SPC1-3) se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 23 y se llevó a volumen con pool de plasma de perro.

Tabla 11. Preparación de PC1-3.

Identificación de solución	Alicuota (μL) (SST 1-6)	Alicuota (μL) Estándar interno	Aforo a volumen (mL)	Concentración (ng/mL)
PC1	50	50	10	30
PC2	50	50	10	90
PC3	50	50	10	150

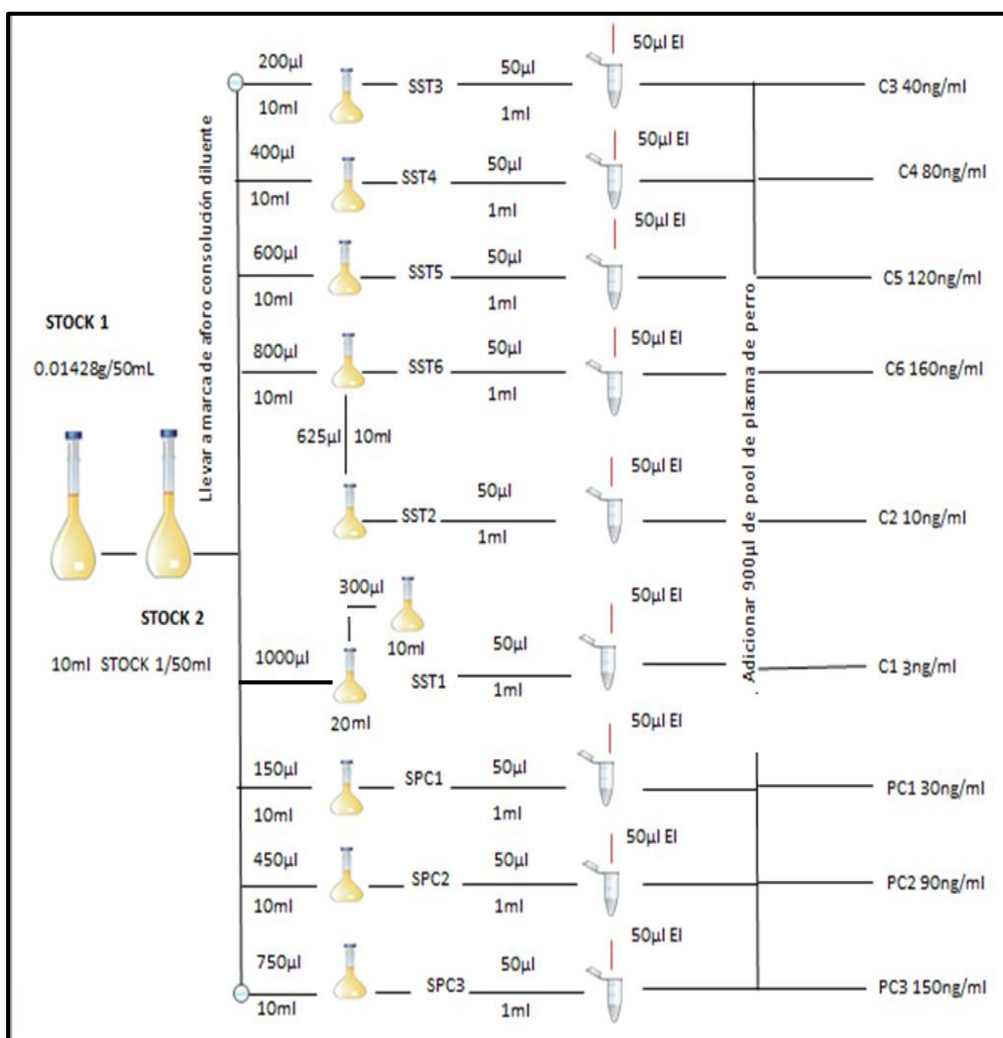


Figura 11. Diagrama de preparación de curva de calibración.

X.II. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para validar el método analítico se van a determinar las siguientes características de calidad del procedimiento de análisis:

Tabla 12. Parámetros y criterios del proceso de validación de un método bioanalítico.

	NOM 177-SSA1-2013-México[110]		Guía para la realización de estudios de bioequivalencia de los medicamentos veterinarios EMA/CVMP (2011)[111]	LC-MS/MS Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos[112,113]	
Prueba	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Condiciones de prueba	Criterios de aceptación
Selectividad	Muestras blanco de la matriz biológica en por lo menos 6 voluntarios. Evaluar posibles interferencias (metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco administrado concomitantemente)	No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.		Muestra blanco de la matriz: 6 lotes, n = 1 para cada lote Matriz en blanco fortificado con IS: 6 lotes, n = 1 para cada lote LLOQ Selectividad de la muestra: 6 lotes, enriquecidas con el analito a nivel LLOQ y IS. n = 3 para cada lote	Por lo menos 5 de los 6 lotes deben cumplir con los siguientes criterios: Respuesta del analito en la matriz de blanco o matriz en blanco fortificado con SE debe ser $\leq 20\%$ de la respuesta media analito Estándares de calibración LLOQ Respuesta de IS en la matriz blanco debe ser $\leq 5\%$ de la media e Al menos dos tercios de la LLOQ selectividad repeticiones para cada lote debe cumplir con límite de aceptación exactitud, y la precisión media debe estar dentro de $\pm 20,0\%$ de la concentración nominal
Arrastre de muestra				Un mínimo de 2 muestras blanco después de cada inyección norma ULOQ	La respuesta del analito $\leq 20\%$ de la respuesta media del analito en LLOQ, la respuesta $\leq 5\%$ en los estándares LLOQ

	NOM 177-SSA1-2013-México[110]	Guía para la realización de estudios de bioequivalencia de los medicamentos veterinarios EMA/CVMP (2011)[111]		LC-MS/MS Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos [112,113]	
Prueba	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Condiciones de prueba	Criterios de aceptación
Exactitud	Usar datos de repetibilidad y reproducibilidad	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de la concentración	NM	NM	NM
Precisión (repetibilidad)	3 puntos control por quintuplicado (mismo día)	%C.V no debe ser mayor que el 15%.	NM	NM	NM
Precisión (reproducibilidad)	3 puntos control por duplicado durante tres días.	%C.V no debe ser mayor que el 15%.	NM	NM	NM
Recuperación absoluta (% recobro)	3 puntos control por triplicado en solución y en la matriz biológica	No necesariamente debe ser el 100% en cada nivel de concentración, pero debe ser reproducible	NM	NM	NM
Linealidad	Usar mínimo 5 concentraciones (que incluya los puntos extremos excepto el cero) Definir un modelo que describa la relación matemática y respuesta.	Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.	NM	Mínimo de 6 niveles estándar de calibración no cero (CS)	$(R^2) \geq 0.985$
Límite de cuantificación	Concentración más baja por quintuplicado.	El valor promedio debe estar dentro del ± 20 del valor nominal %C.V no mayor que el 20%	El límite inferior de cuantificación debe ser igual a $1/20$ de la $C_{m\acute{a}x}$ o inferior, ya que las concentraciones pre-dosis deben ser detectables en el 5% de la $C_{m\acute{a}x}$ o inferior	NM	NM

	NOM 177-SSA1-2013-México[110]	Guía para la realización de estudios de bioequivalencia de los medicamentos veterinarios EMA/CVMP (2011)[111]		LC-MS/MS Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos [112,113]	
Prueba	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Condiciones de prueba	Criterios de aceptación
Límite de detección	Determinar la concentración más baja en la matriz biológica que puede distinguirse del ruido.	Sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.	NM	NM	NM
Estabilidad	3 puntos control por duplicado	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de la concentración.	NM	NM	NM
	Ciclos de congelación. Someter la muestra a 2 ciclos de congelación antes de analizar las muestras.	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad.	NM	NM	NM
	Almacenamiento. Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenaran las muestras en el estudio.	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad.	NM	Estabilidad de extracciones almacenados en control de calidad baja, media y niveles altos (n = 6) a temperatura inyector automático de ≥ 72 horas.	Exactitud media de $\pm 15,0\%$ del RE nominal; precisión $\leq 15,0\%$ RSD, calculada utilizando las curvas recién extraídos o calculados de nuevo utilizando las curvas originales
Tolerancia	Evaluar la tolerancia del método a pequeñas pero deliberadas modificaciones (pH, disolventes, fase móvil)	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad.	NM	Mínimo de dos variables a lo largo de la validación (por ejemplo, diferente columna, instrumento y / o analista)	La media entre y precisión intra-ensayo de $\pm 15,0\%$ RE de nominal; precisión $\leq 15,0\%$ RSD
Efecto matriz				Muestras contaminadas después de la extracción (n = 6, en cada control de calidad baja, media y alta nivel) se compara con la respuesta media de 6 inyecciones de analito o ES en disolvente	Calcular MF (factor de matriz) y reportar para el analito y SI

NM= No se menciona.

Tabla 13. Requerimientos para la validación del método.

Sustancia de referencia:	Mezcla de curcuminoides que contiene curcumina Lote: #081M1611V Pureza: -70%(HPLC) Fabricante: Sigma Aldrich
Estándar interno:	Clopidogrel Bisulfato, estándar interno. Lote: 659501809 Pureza: 98-101% Fabricante: Materia prima TEVA
Reactivos:	Ácido fórmico Acetonitrilo grado cromatográfico. Metanol grado cromatográfico. Agua purificada (18.2 MΩcm) Cloroformo
Instrumento:	Acquity UPLC Marca: Waters Código: SYLI2UPA182M Xevo TQ ESI Marca: Waters UPH Marca: Waters Código: F12UPH4186 Bomba Marca: Waters Código: K12UPB287A
Columna:	Acquity UPLC BEH Shield RP 18 1.7 μm 2.1 X 100mm
Pretratamiento de muestra	Extracción líquido-líquido utilizando cloroformo.

X.II.I. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para determinar la linealidad se prepararon 3 curvas de calibración en el rango de 3-160 ng/mL, las cuales se procesaron empleando el método desarrollado y se inyectaron a él sistema LC MS/MS.

Criterio de aceptación: Para cada curva, el coeficiente de determinación r^2 mayor a 0.9800.

X.II.II.PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA

Se prepararon por sextuplicados puntos control de curcumina a concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL y una curva de calibración preparada el día del análisis. Las muestras se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

Criterios de aceptación: El método es repetible si el coeficiente de variación no excede el 15%.

Para cada uno de los niveles de concentración se determinó la concentración recuperada y su valor promedio respectivo. El porcentaje de desviación absoluta se calculó utilizando la fórmula.

$$\% \text{ Des. Absoluta} = \left(\frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \right) * 100$$

X.II.III. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para determinar la linealidad del método, se prepararon tres curvas de calibración en plasma a concentraciones de 3, 10, 40, 80, 120, 160 ng/mL de curcumina. Las muestras se procesaron utilizando el método previamente descrito.

Se determinó el modelo matemático que mejor describe la relación entre la concentración y la respuesta, verificando que fuera continua y reproducible.

Criterios de aceptación: El método es lineal si el coeficiente de determinación (r^2) de cada una de las curvas y de todos los datos (global) es igual o mayor que 0.98 y los valores del coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración deben ser menores o iguales al 15 %, excepto para el nivel de concentración más bajo, el cual puede tener un porcentaje de desviación absoluta menor o igual al 20 %.

X.II.IV. RECOBRO ABSOLUTO DEL MÉTODO

Se prepararon por triplicado puntos de control en plasma a concentración de 30, 90 y 150 ng/mL de curcumina y puntos control en solución a las mismas concentraciones.

Para cada una de las determinaciones (muestra en solución y muestra en plasma) se calculó la relación de áreas entre curcumina y el estándar interno. Posteriormente se determinó el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración comparando el promedio de la respuesta obtenida en plasma con respecto a la obtenida en solución a la misma concentración.

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \left(\frac{\text{Promedio relación de áreas en plasma}}{\text{Promedio relación de áreas en solución}} \right) * 100$$

Criterios de aceptación: El porcentaje de recobro del analito no debe ser necesariamente del 100% pero debe ser consistente en el rango de concentración.

X.II.V. PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión el método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad.

X.II.VI. REPETIBILIDAD

Se prepararon por sextuplicados puntos control de curcumina a concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL y una curva de calibración preparada el día del análisis. Las muestras se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

Criterios de aceptación: El método es repetible si el coeficiente de variación no excede el 15 %.

X.II.VII. REPRODUCIBILIDAD

Para determinar la reproducibilidad se prepararon por triplicado en tres días o corridas diferentes, puntos control de curcumina a las concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL y una curva de calibración. Las muestras se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

Criterios de aceptación: El método es repetible si el coeficiente de variación no excede el 15%.

X.II.VIII. EXACTITUD

La exactitud del método se determinó preparando por triplicado tres niveles de concentración 30, 90 y 150 ng/mL de curcumina. Para cada uno de los niveles de concentración se determinó la concentración recuperada y su valor promedio respectivo. El porcentaje de desviación absoluta se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\%Des. Absoluta = \left(\frac{Concentración\ adicionada - Concentración\ recuperada}{Concentración\ adicionada} \right) * 100$$

X.II.IX. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

X.II.IX.I. TEÓRICO

De la curva de calibración del método, se determinaron los parámetros estadísticos; coeficiente de determinación (r^2), pendiente (b_1), Ordenada al origen (b), desviación estándar del intercepto (Sb_0)

$$LC = \frac{10 \times Sb_0}{b_1} \quad LD = \frac{3.3 \times Sb_0}{b_1}$$

X.II.IX.II. EXPERIMENTAL

Se prepararon por sextuplicado la concentración de 3 ng/mL. Las muestras se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

X.II.X. ESTABILIDAD DE CURCUMINA EN MATRIZ

1. Condiciones de almacenamiento (-20°C) a corto y largo plazo

La calidad y confiabilidad de un buen resultado no se basa únicamente en el proceso analítico, este comienza desde la toma de muestra hasta tu almacenamiento, por esta razón durante la validación se evalúa la estabilidad del analito en la matriz, por un período equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

Para determinar la estabilidad en matriz se prepararon por triplicado, puntos control de curcumina a las concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL se almacenaron a -20°C durante 5 días en tubos tubo de microcentrifuga de 2 mL, al cumplir el periodo las muestras se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

Criterios de aceptación: Las muestras son estables en la matriz si el coeficiente de variación no excede el 15% con respecto al valor original o al de referencia.

De la misma manera se evaluó la estabilidad de la muestra en la matriz a largo plazo, las condiciones de almacenamiento fueron -20°C durante 105 días.

3.- Ciclos de congelación - descongelación

Considerando que durante un estudio de biodisponibilidad cabe la posibilidad de congelar y descongelar muestras es necesario determinar el número de ciclos en los cuales la curcumina permanece estable, se indica que se evalúen por lo menos dos ciclos.

Para determinar el número de ciclos de congelación – descongelación de la muestra se prepararon por triplicado, puntos control de curcumina a las concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL se almacenaron a -20°C por 24 h. Transcurrido este periodo, se descongeló a temperatura ambiente y se volvió a congelar, y así se culminó el primer ciclo de congelación - descongelación. Esta serie se sometió al procedimiento anterior 2 veces más posteriormente se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

Para cada uno de los puntos, se calculó la concentración recuperada interpolando los valores de respuesta en la curva de calibración preparada el día de análisis.

Criterios de aceptación: Las muestras son estables al tercer ciclo de congelación - descongelación si el coeficiente de variación no excede el 15 % con respecto al valor original o al de referencia.

X.II.XI. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

La estabilidad de la muestra procesada tiene como objetivo determinar si los reactivos o el proceso de extracción modifican o interfieren en la cuantificación de curcumina después de un periodo de almacenamiento

Se prepararon por triplicado, puntos control de curcumina a las concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS. Posteriormente se almacenaron en el automuestreador a 15°C durante 24 horas y nuevamente se inyectaron al sistema.

Criterios de aceptación: Las muestras son estables en el automuestreador si el coeficiente de variación no excede el 15%. con respecto al valor original o al de referencia.

X.II.XII. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ENTRE DÍAS Y ANALISTAS

Para determinar la reproducibilidad se prepararon por triplicado en dos días, dos analistas, puntos control de curcumina a las concentraciones de 30, 90 y 150 ng/mL y una curva de calibración. Las muestras se procesaron empleando el ensayo analítico establecido previamente y se inyectaron al sistema LC MS/MS.

Criterios de aceptación: El método es reproducible si el coeficiente de variación no excede el 15%.

X.II.XIII. SELECTIVIDAD

La selectividad hace referencia a la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar.

Para evaluar la selectividad se prepararon:

1. Muestras blanco de plasma obtenidas de un pool de seis perros diferentes.
2. Muestra blanco de la mezcla de plasma de los seis perros adicionada con curcumina a concentración de 160 ng/mL y 3 ng/mL.
3. Muestra blanco de la mezcla de plasma de los seis perros adicionada con Clopidogrel Bisulfato a la concentración de 40 ng/mL y curcumina a 160 ng/mL y 3 ng/mL.
4. Muestra blanco de sangre hemolizada
5. Muestra blanco de plasma con EDTA y heparina.

A cada una de las muestras se les aplico el método de extracción líquido-líquido y se inyectaron 7.5 µl al LC MS/MS (500 µL)

Criterios de aceptación: No deberá presentarse interferencia en el tiempo de retención de curcumina (analito de interés), ni en el de Clopidogrel Bisulfato (estándar interno). En caso de que se presente alguna señal en el tiempo de retención de la Curcumina este debe ser menor al 20% de la respuesta de una concentración de 3 ng/mL. Para el estándar interno la interferencia no debe ser mayor que el 5% de su respuesta con respecto a la concentración de 40 ng/mL.

X.II.XIII.I. SUPRESIÓN IONICA EN ANTICOAGULANTES

La prueba consiste en inyectar una muestra blanco durante la infusión constante de una concentración alta de curcumina (160 ng/mL) y determinar la no existencia de la baja de señal al tiempo de retención del analito.

Criterios de aceptación: La prueba se considera válida si la línea base no presenta inflexiones positivas o negativas en los tiempos de retención de curcumina y clopidogrel bisulfato.

X.II.XIII.II. SUPRESIÓN IONICA EN MUESTRAS HEMOLIZADAS

La prueba consiste en inyectar una muestra blanco durante la infusión constante de una concentración alta de curcumina (160 ng/mL) y baja (3 ng/mL) y determinar la no existencia de la baja de señal al tiempo de retención del analito.

Criterios de aceptación: La prueba se considera válida si la línea base no presenta inflexiones positivas o negativas en los tiempos de retención de curcumina y clopidogrel bisulfato.

X.II.XIII.III. EFECTO MATRIZ

El efecto matriz es un fenómeno en donde la ionización del analito es afectada al co-eluir con sustancias pertenecientes a la matriz biológica por lo tanto se afecta la sensibilidad, precisión y exactitud del método y cabe la posibilidad de incrementar la ionización del analito.

X.II.XIII.III.I. EFECTO MATRIZ SEGÚN NOM 177

La norma establece que para evaluar el efecto matriz de forma cuantitativa es necesario analizar individualmente, al menos 6 unidades de matriz blanco. Extraer cada muestra blanco de matriz, posteriormente adicionar el analito y el EI en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente. Comparar las respuestas analíticas obtenidas respecto a las respuestas del analito y el EI en solución. Para cada unidad se debe obtener un FMN por el EI, conforme a la siguiente fórmula:

$$FNM = \frac{\frac{\text{Respuesta del analito en la matriz}}{\text{Respuesta del estándar interno en la matriz}}}{\frac{\text{Respuesta del analito en la solución}}{\text{Respuesta del estándar analito en solución}}}$$

Criterios de aceptación: El CV% del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz no debe ser mayor que el 15%. Esta determinación debe ser realizada con punto control bajo y alto.

X.II.XIII.III. EFECTO MATRIZ EN POOLS CLASIFICADOS POR: RAZA, EDAD Y SEXO.

La prueba consiste en inyectar una muestra blanco durante la infusión constante de una concentración alta de curcumina (160 ng/mL y baja (3 ng/mL) y determinar la no existencia de la baja de señal al tiempo de retención del analito.

Para evaluar el efecto de manera cualitativa es necesario tener un pool de plasma que represente a los posible sujetos de investigación que podrían emplearse en un estudio de biodisponibilidad, en la tabla 14 se observa el listado de cada pool que se clasifico por sexo y edad.

Criterios de aceptación: La prueba se considera válida si la línea base no presenta inflexiones positivas o negativas en los tiempos de retención de curcumina y clopidogrel bisulfato.

Tabla 14. Pools empleados para evaluar el efecto de la matriz del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

POOL 1			
CÓDIGO	SUJETO DE INVESTIGACIÓN	EDAD(AÑOS)	SEXO
913153	COCKER	14	HEMBRA
913172	COCKER	11	HEMBRA
913170	COCKER	7	HEMBRA
913247	COCKER	11	HEMBRA
913005	COCKER	SE	HEMBRA
913024	COCKER	11	HEMBRA
913069	COCKER	7 Y 6 MESES	HEMBRA
913154	COCKER	9	HEMBRA
913190	COCKER	13	HEMBRA
POOL 2			
913137	SCHNAUZER	8	HEMBRA
20456	SCHNAUZER	6 Y 6 MESES	HEMBRA
913193	SCHNAUZER	1	HEMBRA
1872-Q	SCHNAUZER	7	HEMBRA
1878-Q	SCHNAUZER	12	HEMBRA
1877-Q	SCHNAUZER	2.5 MESES	HEMBRA
913088	SCHNAUZER	3	HEMBRA

POOL 5			
CÓDIGO	SUJETO DE INVESTIGACIÓN	EDAD(AÑOS)	SEXO
20480	MALTES	10	HEMBRA
913259	P. INGLES	1	HEMBRA
1894-Q	DALMATA	12	HEMBRA
913225	MALTES	14	HEMBRA
913237	CHIHUAHUA	8	HEMBRA
1885-Q	BERNES DE LA MONTAÑA	9	HEMBRA
1886-Q	TERRIER ESCOSES	12	HEMBRA
913220	CRIOLLO	13	HEMBRA
POOL 7			
913162	AMERICAN BULLY	6 MESES	MACHO
913180	BASSET HOUND	2	MACHO
913185	MESTIZO	10	MACHO
913194	MESTIZO	2 y 5 MESES	MACHO
913213	FRENCH POODLE	11	MACHO
913218	P. ALEMAN	7 Y 6 MESES	MACHO
913257	SCHNAUZER	8	MACHO
913261	TERRANOVA	4	MACHO
913064	AKITA	2	MACHO
913226	SCHNAUZER	11	MACHO
1873-Q	PUG	6	MACHO
1876-Q	SCHNAUZER	5	MACHO
913006	SCHNAUZER	5 Y 4 MESES	MACHO
POOL 9			
913049	FRENCH POODLE	10	HEMBRA
1830-Q	FRENCH POODLE	10	HEMBRA
913151	PASTOR ALEMAN	10	HEMBRA
1814-Q	P. BELGA	10	MACHO
913060	C/ PASTOR ALEMAN	10	MACHO
1815-Q	BASSET HOUND	10 Y 5 MESES	MACHO
913040	ROTTWEILER	11	HEMBRA
913059	BOXER	11	HEMBRA
913135	HUSKY	11	HEMBRA
913092	PASTOR ALEMAN	11	MACHO
913103	AFGANO	11 Y 7 MESES	MACHO
913071	PIT BULL	11	HEMBRA
POOL 10			
913097	ROTTWEILER	11	HEMBRA
913033	LABRADOR	12	HEMBRA
913080	FOX TERRIER	12	HEMBRA
1848-Q	MESTIZO	12	HEMBRA
913120	LABRADOR	12	MACHO

CODIGO	SUJETO DE INVESTIGACION	EDAD (AÑOS)	SEXO
913042	COBRADOR DE LABRADOR	13	HEMBRA
20378	ALASKA	13	HEMBRA
20387	MESTIZO	13	MACHO

POOL 11			
913011	BULLDOG I	2	HEMBRA
1849-Q	CHIHUAHUA	2	HEMBRA
913125	MESTIZO	2 Y 5 MESES	MACHO
1818-Q	BOXER	3	HEMBRA
20344	MESTIZO	3	MACHO
913085	SCHNAUZER	3 Y 6 MESES	MACHO
1817-Q	TERRIER ESCOSES	4	HEMBRA
913022	PASTOR ALEMAN	4 MESES	MACHO
913023	GRAN DANES	4 MESES	MACHO
913018	PASTOR ALEMAN	5 Y 4 MESES	HEMBRA
913006	SCHNAUZER	5 Y 4 MESES	MACHO
913021	TERRIER ESCOCES	5 Y 4 MESES	MACHO
913131	DOBERMAN	5 MESES	MACHO
POOL 12			
913096	GANADERO AUSTR.	6	HEMBRA
1840-Q	LABRADOR	6	HEMBRA
913094	GRAN DANES	6	HEMBRA
913016	BULL MASTIF	6 Y 5 MESES	MACHO
1799-Q	GOLDEN RETRIEVER	7	HEMBRA
913102	DACHSUND	7	HEMBRA
913017	LAKELAND TERRIER	7	HEMBRA
913030	DACHSHUND	7	HEMBRA
1804-Q	BULL DOG I	7	MACHO
913072	CHIHUAHUA	7	MACHO
913007	FRENCH POODLE	8	HEMBRA

Las muestras de sangre fueron proporcionadas por el laboratorio DIVET y la Unidad de Enseñanza Quirúrgica FESC-C4.

X.II.XIII.IV. EFECTO DE ACARREO

El efecto de acarreo es un proceso de acumulación del analito en diversas partes del sistema cromatográfico que afectan el análisis sucesivo de las muestras, la sensibilidad, precisión y exactitud del método.

Realizar un mínimo de 3 inyecciones de la misma muestra blanco siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación. Los resultados deben ser comparados respecto a la respuesta del límite inferior de cuantificación.

Criterios de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.

X.II.XIV. APLICACIÓN AL METODO DE ANÁLISIS

Previo al estudio piloto final se realizaron dos estudios piloto con perros sanos, utilizando dos formulaciones:

- a) Nanocápsulas mucoadhesivas (1 mg/mL de curcumina) preparadas por medio de homogeneización por ultra-turrax.
- b) Nanocápsulas de quitosán (1 mg/mL de curcumina) empleando la técnica de evaporación de disolvente.

En el estudio piloto final participaron 3 perros sanos, a los cuales se les administro una dosis oral única de 30 mg/kg de cúrcumina en cápsulas.

Se tomó muestra en los siguientes tiempos: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360 minutos la cantidad de muestra por tiempo fue de 2 mL para el sujeto de investigación A y B y para el sujeto C fue un 1mL por su tamaño

Las muestras de sangre completa fueron centrifugadas para separar el plasma, en el cual se determinaran los niveles de curcumina.

XI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

XI. I. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

XI.I.I. SELECCIÓN DE CONDICIONES UPLC/MS/MS

Previamente se estableció el modo (ESI+) contemplando que la curcumina es inestable a pH superiores a 7 y que las soluciones necesarias para ionizar de forma negativa son alcalinas, se ionizó con ácido fórmico 0.1%. Los parámetros de voltaje de cono y capilar, temperatura de solvatación y la resolución del primer y segundo polo que permitieron el transporte de los iones y la selección del ion padre e hijo de curcumina y clopidogrel bisulfato.

En la tabla 15 se observan los parámetros para fragmentación del ion molecular de curcumina óptimos.

Tabla 15. Parámetros para fragmentación de ion molecular de curcumina.

	Curcumina	Clopidogrel Bisulfato
Voltaje de capilar (kV)	2.45	2.45
Voltaje de cono (V)	26	26
Temperatura de solvatación (°C)	350	350
Flujo de gas de Desolvatación (L/Hr)	650	650
Flujo de gas de cono (L/hr)	0	0
LM Resolución 1	2.90	2.90
HM Resolución 1	14.80	14.80
Energía de ion 1	0.3	0.3
LM Resolución 2	2.85	2.85
HM Resolución 2	14.80	14.80
Energía de ion 2	0.5	0.5
Flujo de gas de colisión (mL/min.)	20	20

Mediante infusión directa de la solución de curcumina y clopidogrel bisulfato (100 ng/mL) y con los parámetros establecidos se obtuvo el primer espectro de masas figura 12 y 13 que sirvió para seleccionar un ion determinado entre los iones producidos en el sistema de ionización conocido como ion precursor o ion padre. Como se observa en la figura 13 ese ion es considerando el peso molecular de curcumina que es de 368 más el peso molecular del protón, es decir el ion 369.

Fragmentación del ion molecular de la Curcumina 369 m/z

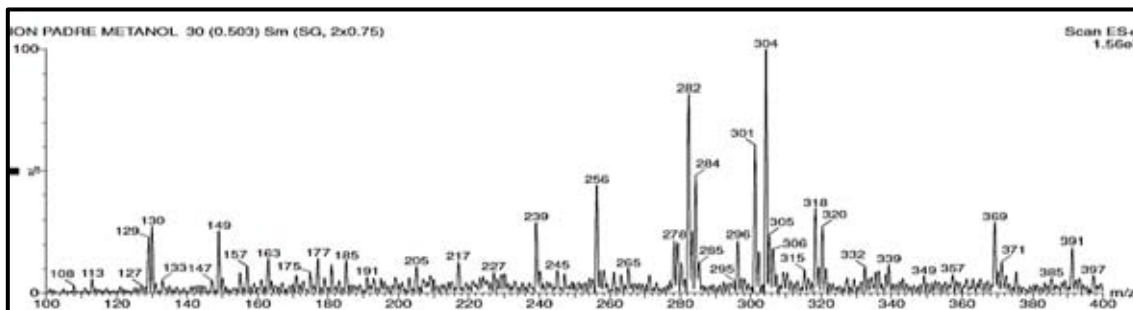


Figura 12. Ion padre de mayor proporción de curcumina empleando como medio de disolución metanol.

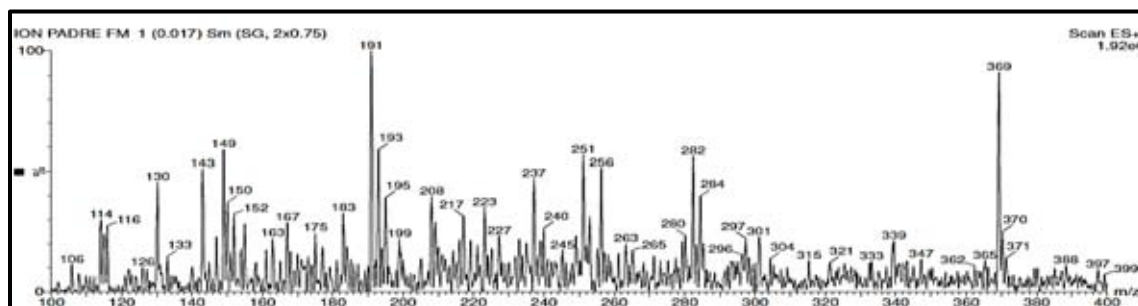


Figura 13. Ion padre de mayor proporción de curcumina empleando como medio de disolución una mezcla 40:60 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

Comparando los espectros de masas se observa mayor intensidad de ese ion al emplear solución diluyente y esto debido a que la molécula de curcumina se encuentra más ionizada con esta mezcla.

Seguidamente este ion precursor se introdujo en una cámara de colisión, en la que se bombeo un gas. Los iones moleculares son acelerados por un potencial eléctrico hasta obtener una energía cinética alta y en la cámara colisionan con las moléculas del gas (argón). En la colisión parte de la energía cinética se transforma en energía interna y se fragmenta el ion precursor en pequeños fragmentos neutros y otros iones, estos fragmentos del ion precursor, denominados iones producto o ion hijo.

La elección del ion hijo de curcumina se realizó considerando la intensidad del ion, es decir que fuera el ion en mayor abundancia (ion base) y que fuera un ion estable. El espectro de masas se observa en la figura 14 y 15.

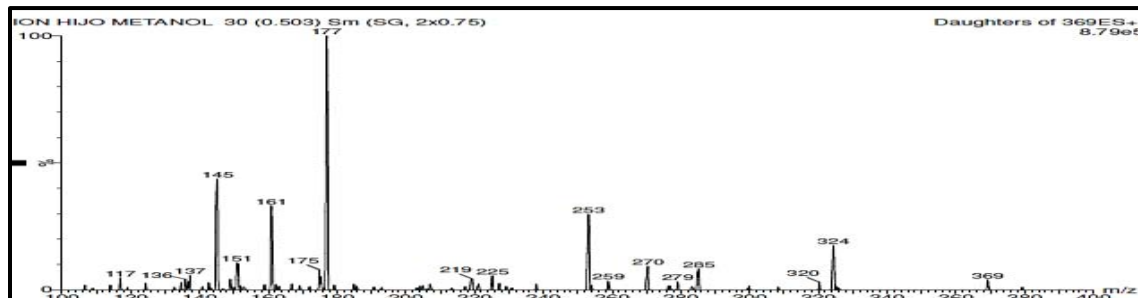


Figura 14. Ion hijo de mayor de proporción de curcumina empleando como medio de disolución metanol.

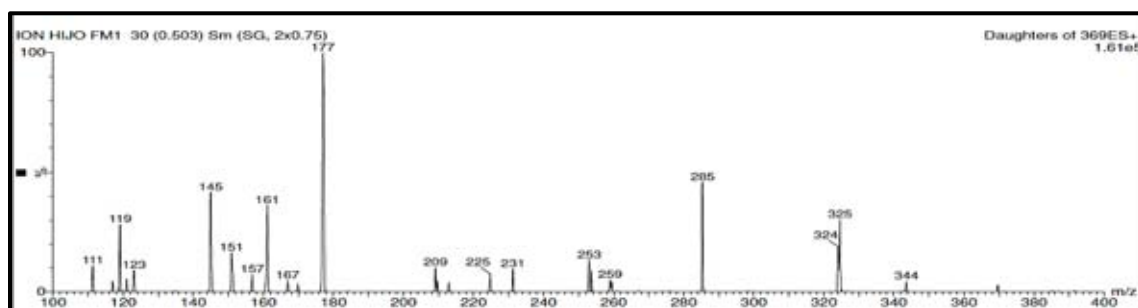


Figura 15. Ion hijo de mayor proporción de curcumina empleando como medio de disolución una mezcla 40:60 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q

Posteriormente se selecciona el modo de funcionamiento del MS/MS contemplando que se empleó un estándar interno en el desarrollo y validación del método bioanalítico y que es indispensable que el espectrómetro de masas pueda ir cambiando rápidamente entre los cuatro iones (dos iones precursores (369.3 y 322 y dos iones producto asociados (177.06 y 212.05)) y las correspondientes intensidades de los iones producto monitoreadas [91], se eligió el modo MRM.

El modo MRM es un equivalente MS/MS sumamente selectivo de la monitorización de iones seleccionados (SIR). Debido a que tanto MS1 como MS2 son estáticos, se puede obtener un mayor tiempo de residencia de los iones de interés y lograr así una mayor sensibilidad en comparación con el MS/MS en modo de barrido. Éste es el modo de adquisición más utilizado para el análisis cuantitativo, ya que permite aislar el compuesto de interés del ruido químico de fondo [74].

Tabla 16. Ion padre e hijo de la curcumina y sus principales curcuminoides.

Compuesto	Ion precursor(m/z)	Ion producto (m/z)
Curcumina	369.3	177.11
DMC	339.1	339.1
BDMC	309.1	309.1
Fuente de ionización	Turbo spray en modo positivo (ESI⁺)	
Tipo de monitoreo	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	

XI.I.I. SELECCIÓN DE FASE MÓVIL

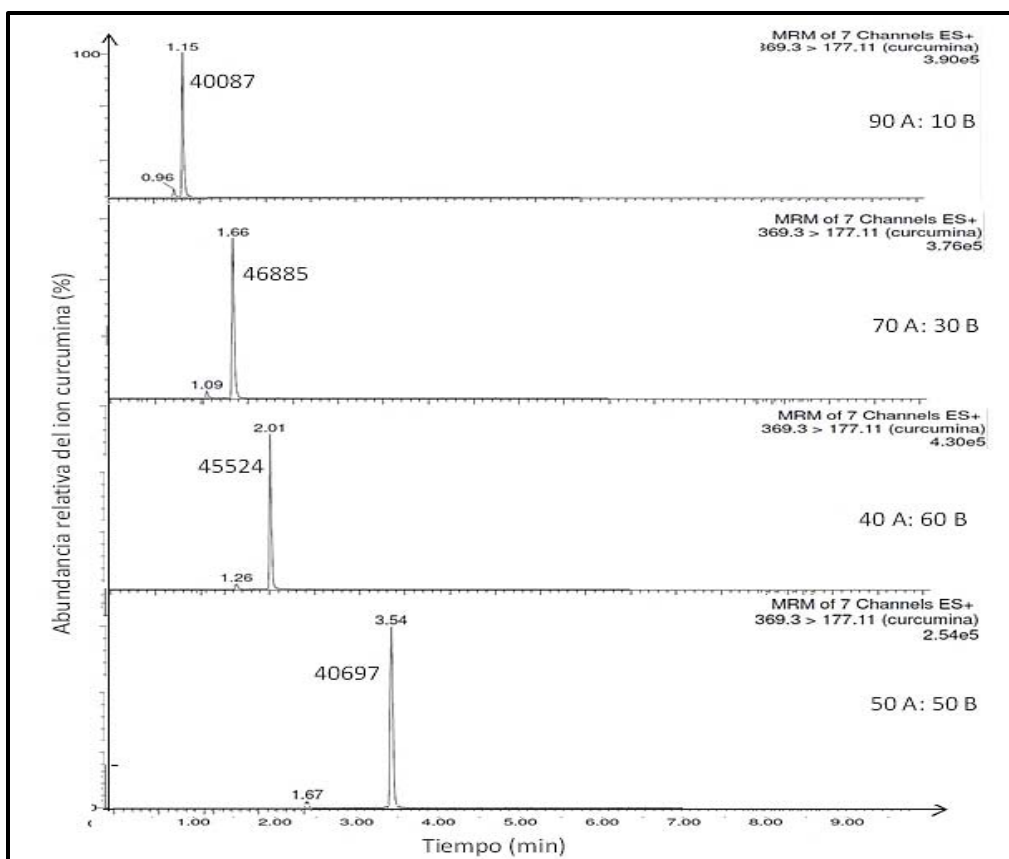


Figura 16. Cromatogramas del tiempo de retención de curcumina con fase móvil 1 en diferentes proporciones.

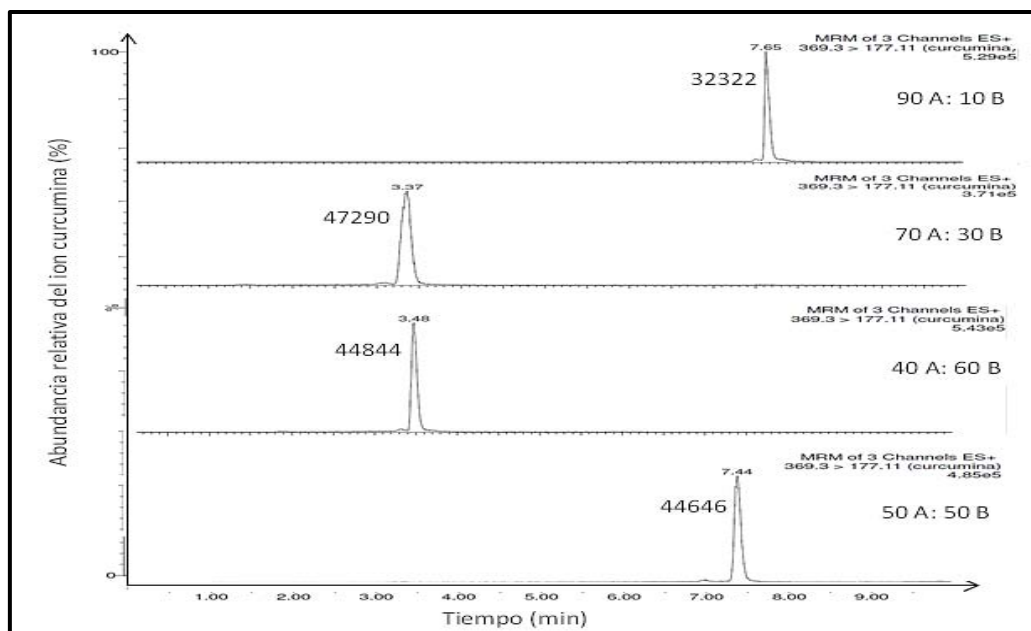


Figura 17. Cromatogramas del tiempo de retención de curcumina con fase móvil 2 en diferentes proporciones.

Al comparar las figuras 16 y 17 se observó que la fase móvil 2 presentó tiempos de retención de cúrcuma mayores, debido a que el metanol presenta mayor polaridad y tiene el menor poder de elución, por esta razón, se seleccionó la fase móvil 1 debido a que la respuesta de la curcumina es mayor y los tiempos de retención son inferiores a 3 minutos.


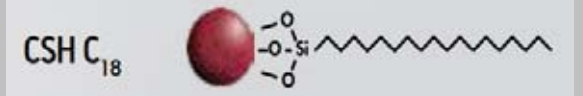
XI.I.I.II. SELECCIÓN DE COLUMNA CROMATOGRÁFICA

La columna Shield RP18 que maximiza la selectividad de la separación explorando pH altos y bajos de la fase móvil. Este tipo de columna tiene un grupo carbamato embebido en el ligando de la fase estacionaria, que proporciona selectividad, especialmente para los compuestos fenólicos en comparación con columnas de cadena lineal alquílica.[92]

La selectividad de las fases estacionarias Shield RP, en especial para compuestos polifenólicos, ha sido atribuida a los grupos polares embebidos que actúan como aceptores de enlaces hidrógeno. Las columnas ACQUITY UPLC™ BEH Shield RP18 están diseñadas para proporcionar selectividades complementarias a las fases ACQUITY UPLC™ BEH C18.

Los resultados obtenidos en cada columna y a diferentes proporciones se muestran en la tabla 17, en esta se observa que los tiempos de retención e intensidad en la respuesta son muy similares, sin embargo la forma del pico y la resolución es mejor con BEH Shield RP18.

Tabla 17. Condiciones cromatográficas en dos columnas diferentes.

Tipo de columna	Flujo (mL/min)	Proporción de fase móvil (A:B)	Tiempo de retención (RT)	Respuesta
Columna 1 ACQUITY UPLC BEH Shield RP 18 1.7 μM 2.1x100 mm 	0.1	90:10	2.94	4.56e5
		70:30	4.06	5.88e5
		40:60	5.00	6.15e5
		50:50	6.94	5.01e5
	0.25	90:10	1.15	3.90e5
		70:30	1.66	3.76e5
		40:60	2.01	4.30e5
		50:50	3.54	2.54e5
	0.5	90:10	0.59	9.66e4
		70:30	0.84	2.61e5
		40:60	1.19	2.36e5
		50:50	2.05	1.88e5
Columna 2 ACQUITY CSH C18 1.7 μm 2.1x100 mm 	0.1	90:10	SP	SR
		70:30	SP	SR
		40:60	SP	SR
		50:50	SP	SR
	0.25	90:10	SP	SR
		70:30	1.50	4.21e5

	Flujo (mL/min)	Proporción de fase móvil (A:B)	Tiempo de retención (RT)	Respuesta
0.25	0.25	40:60	1.85	3.48e5
		50:50	3.15	1.15e5
0.5	0.5	90:10	0.54	1.30e5
		70:30	0.74	1.53e5
		40:60	1.01	2.49e5
		50:50	SP	SR

Se realizaron inyecciones de 5 µL con una concentración de 80 ng/mL de cúrcuma.

SP- SIN PICO, SR- SIN RESPUESTA

A = Solución acuosa con 0.1% de ácido fórmico/ B = Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico

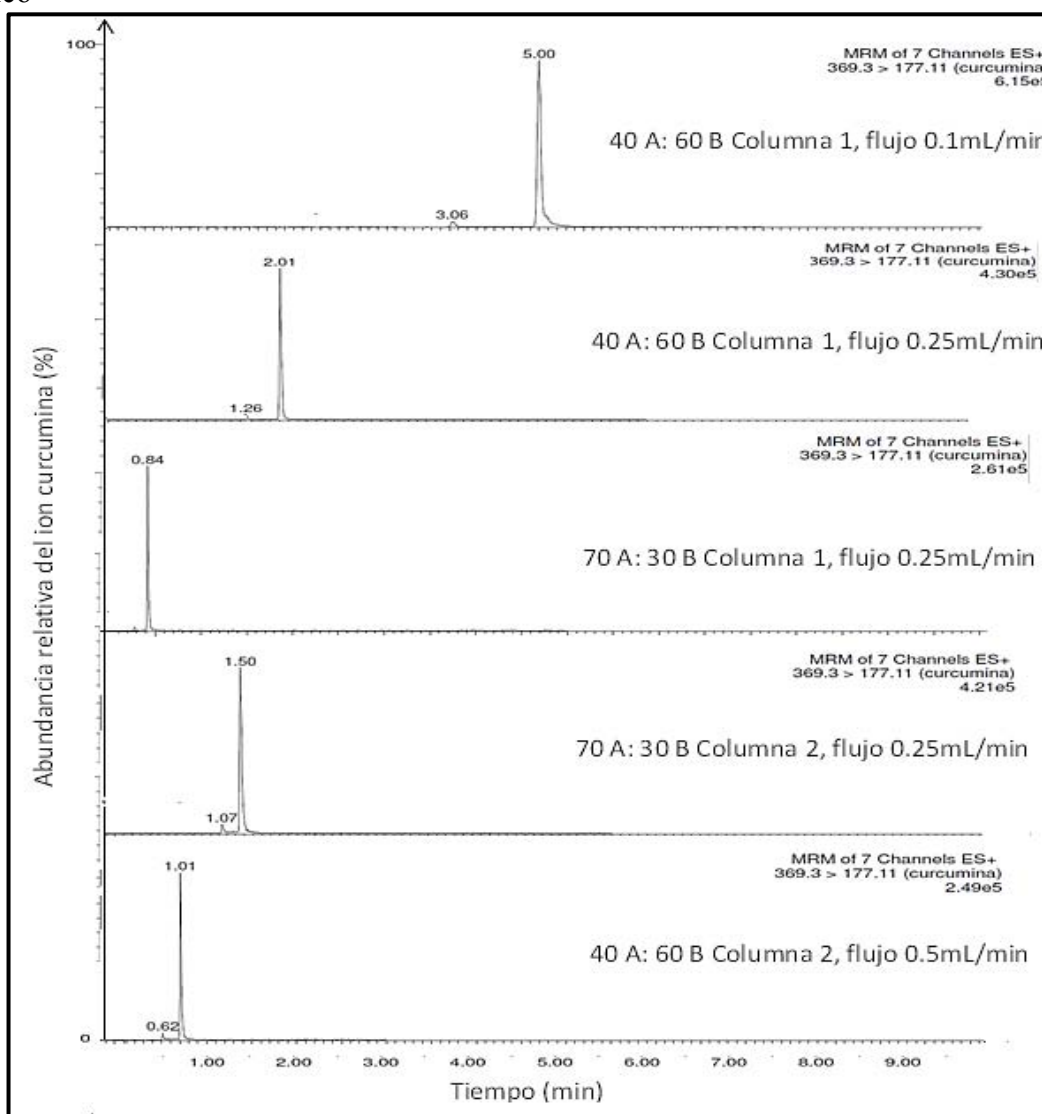


Figura 18. Comparación de cromatogramas en diferentes columnas y condiciones cromatográficas.

En las figura 18 se observan los cromatogramas obtenidos a diferentes condiciones cromatográficas. En la columna 1 la mayor intensidad en respuesta se observó en la proporción 40 % A y 60% B y flujo 0.25 ml/min con una respuesta de 4.30e5. Considerando que el tiempo de retención es inferior a 5 minutos y que el pico tiene una resolución adecuada, se seleccionó como las condiciones óptimas con esa columna.

XII.I.III. VOLUMEN DE INYECCIÓN

El volumen de inyección es directamente proporcional a la respuesta de la curcumina, por ende es posible seleccionar cualquier volumen de inyección. Debido a que las concentraciones de curcumina en el sistema son muy pequeñas se empleara el volumen de inyección de 7.5 µl con la finalidad de mejorar el análisis de trazas y por qué se reduce la cantidad de muestra procesada.

XII.I.II. SELECCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO

Fragmentación del ion molecular de Clopidogrel Bisulfato 322.04 m/z

En la figura 19 se observa el ion padre del clorhidrato de propafenona el cual es 322.04 m/z, en la figura 20 se obtiene un pico con tiempo de retención de 1.76 minutos.

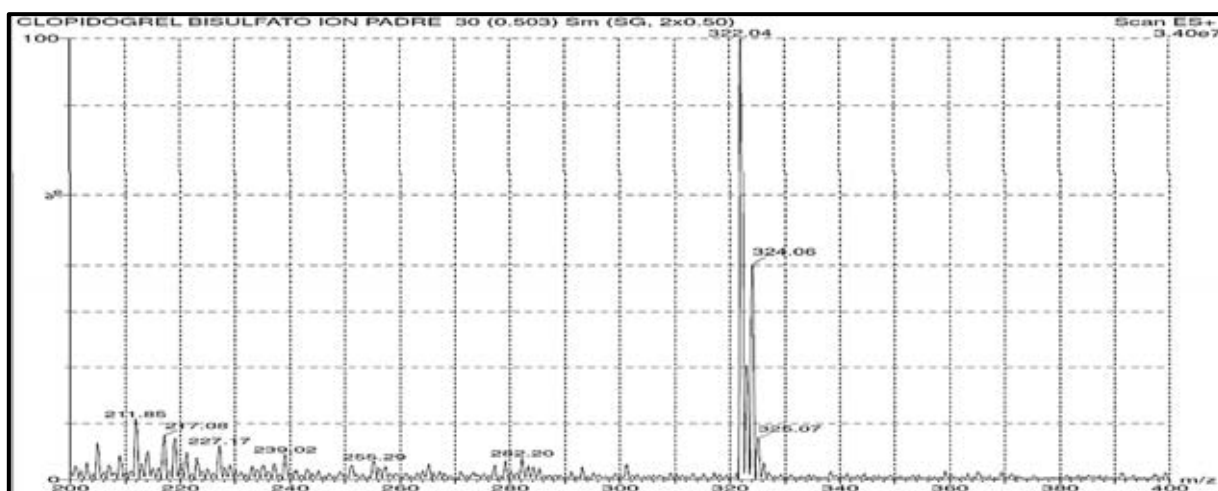


Figura 19. Ion padre de mayor proporción de Clopidogrel Bisulfato empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

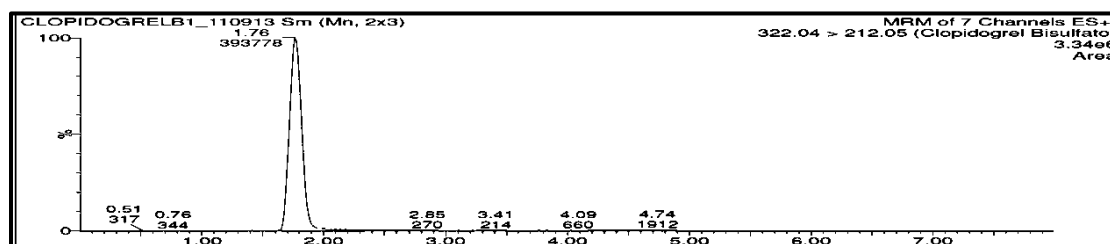


Figura 20. Cromatograma de Clopidogrel Bisulfato.

Tabla 18. Respuesta y transición de los posibles estándares internos.

Estándar interno	Tiempo de retención (RT)	Area	Respuesta	m/z
Clorhidrato de propafenona a 100 ng/mL	0.65	17541	1.98e5	342.26 →265.21
Clorpidrogel Bisulfato a 100 ng/mL	1.76	393778	3.34e6	322 →212.05
Tramadol a 100 ng/mL	0.65	349759	2.94e6	264.2→57.94
Melatonina a 100 ng/mL	1.06	153545	1.31e6	233.11→174.02
Trimetoprim a 100 ng/mL	SP	SR	SR	291.2→123.1
Cafeína a 10 ng/mL	0.97	21075	2.55e5	195.07→138.05

En la tabla 18 se observan la transición e intensidad de las moléculas candidatas para ser utilizadas como estándar interno. La mayoría tiene tiempos de retención inferiores a 1 a excepción de melatonina y clopidogrel bisulfato, de estos dos primero se seleccionó melatonina pero durante la selección de la técnica de extracción se observó que en la combinación la respuesta de la curcumina disminuía, por lo tanto se descartó este estándar interno y se eligió clopidogrel bisulfato por el tiempo de retención que es de 1.76 y porque el área a esa concentración es similar a la curcumina.

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm (principalmente por residuos de triptófano) las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico y a 260 nm los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos.[106] Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0 por lo tanto los cocientes más pequeños indicaran que no hay presencia de proteínas y así se establecerá el mejor agente precipitante.

XII.I.III. SELECCIÓN PRETRATAMIENTO DE MUESTRA.

Como se observa en la tabla 19, en precipitación de proteínas, los agentes precipitantes más eficientes fueron acetona fría a -20°C y acetonitrilo con coeficientes de -0.0347 y 0.9084. Posteriormente se realizó el proceso de precipitación de proteínas con estos agentes por sextuplicado para evaluar la reproducibilidad y el porcentaje de recuperación.

En la técnica de extracción líquido-líquido se eligió al cloroformo y a la mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico, sus coeficientes fueron de 0.7905 y 0.7270 respectivamente los coeficientes son inferiores a los obtenidos en precipitación de proteínas, lo que evidencia que la extracción líquido-líquido es más eficiente para eliminar interferencias como proteínas unidas al fármaco.

Tabla 19. Relación de absorbancias a longitud de onda de 260nm y 280nm en la extracción líquido-líquido y precipitación de proteínas.

Tipo de extracción	Agente precipitante	ABS 260 nm	ABS 280 nm	Cociente A260/A280
Precipitación de proteínas	Metanol	1.5128	1.6526	0.9154
		2.3212	2.470	0.9397
	Acetonitrilo	0.1280	0.1409	0.9084
		0.1326	0.1453	0.9125
	Acetona fría a -20°C	0.0299	-0.8605	-0.0347
		0.1658	0.0887	1.8694
Extracción líquido-líquido	Cloroformo	0.1778	0.2249	0.7905
		0.1051	0.1266	0.8301
	Acetato de etilo	-0.4105	-0.4625	0.8875
		-0.4550	-0.5326	0.8542
	Diclorometano	0.1057	0.1233	0.8572
		0.1118	0.1365	0.8190
	Acetato de etilo /Diclorometano	0.1482	0.1625	0.912
		0.2680	0.3147	0.8516
	Cloroformo con alcohol isoamílico	0.1806	0.2484	0.7270
		0.2033	0.2667	0.7622

XII.I.III.I. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

El fenómeno de desnaturalización se presenta debido a que al añadir un disolvente orgánico la capa solvatada alrededor de la proteína decrece debido a que el disolvente desplaza el agua de la superficie de la proteína, al disminuir la capa de hidratación, las proteínas se agregan por fuerzas de atracción electrostáticas y dipolo-dipolo, los disolventes orgánicos disminuyen la constante dieléctrica del agua, lo cual permite que las proteínas se asocien.[107];[104]

La mayoría de los métodos bioanalíticos emplean la adición de un mínimo de tres partes de disolvente orgánico a una parte de la matriz biológica, posteriormente se somete a centrifugación para formar el precipitado de proteína y el sobrenadante se separa para la cuantificación analítica.

Tabla 20. Precipitación de proteínas empleando acetonitrilo.

Concentración de curcumina	Area de curcumina estándar	Area de curcumina en la muestra	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	23713	15157	64.86
	23191	16733	71.60
	23206	15715	67.24
Promedio	23370.00	15868.33	67.90
Desv.std	297.14	799.11	3.42
C.V.	1.27	5.04	5.04

En la tabla 20 se observan los porcentajes de recobro de cúrcumina, el promedio es de 67.90% y el coeficiente de variación es de 5.04, esta técnica de extracción reproducible debido a que el coeficiente es menor a 15%, sin embargo el porcentaje de recobro es mínimo comparado con las otras técnicas, en consecuencias esta técnica con este agente precipitante se descartó. En la muestra que sólo contenía plasma de perro (blanco) no se presentó ningún pico en el tiempo de retención y en la transición de cúrcumina, el cual es 2.0 min.

Tabla 21. Precipitación de proteínas empleando acetona fría (-20°C).

Concentración de curcumina	Area de curcumina en muestra	Area de curcumina estándar	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	18924	23713	80.98
	19839	23191	84.89
	18856	23206	80.68
Promedio	19206.33	23370.00	82.18
Desv.std	548.96	297.14	2.35
C.V.	2.86	1.27	2.86

Como resultado del proceso de extracción con acetona fría (-20°C) se observa en la tabla 21 que el proceso es reproducible con un coeficiente de variación inferior al 15 % y los porcentaje de recobro son en promedio del 82.18 %.

De tal manera que se realizó nuevamente el proceso de extracción por sextuplicado y estos resultados se observan en la tabla 22, el porcentaje de recobro promedio es de 94.38 % y el coeficiente de variación de 2.16 %. Sin duda alguna esta técnica de extracción es rápida y reproducible sin embargo este tipo de técnica no es muy efectiva para eliminar sales y lípidos, lo que podría provocar una precipitación en el sistema cromatográfico.

Tabla 22. Precipitación de proteínas empleando acetona (-20°C).

Concentración de curcumina	Area de curcumina en muestra	Area de curcumina estándar	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	21240.00	23015	92.28
	22444.00		97.52
	21196.00	23002	92.09
	21991.00		95.55
	21760.00	23030	94.54
	21697.00		94.27
Promedio	21721.33	23015.67	94.38
Desv.std	470.04	14.01	2.04
C.V.	2.16	0.06	2.16

La extracción líquido-líquido con cloroformo tuvo un porcentaje de recobro de 100.79 % a una concentración de curcumina de 50 ng/mL y es reproducible con un coeficiente de recuperación de 7.21. En la muestra que sólo contenía plasma de perro (blanco) no se presentó ningún pico en el tiempo de retención y en la transición de cúrcumina, el cual es 2.0 min.

XII.I.III.II. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Tabla 23. Extracción líquido-líquido utilizando cloroformo.

Concentración de curcumina	Area de curcumina en muestra	Area de curcumina estándar	Porcentaje recuperado (%)
50 ng/mL	15124.00	17121.00	89.83
	16108.00	17743.00	95.67
	16730.00	16643.00	99.37
	17452.00	15438.00	103.66
	18320.00	17281.00	108.81
	18076.00	16791.00	107.36
Promedio	16968.33	16836.17	100.79
Desv.std	1223.63	786.84	7.27
C.V.	7.21	4.67	7.21

Tabla 24. Extracción líquido-líquido utilizando cloroformo/ alcohol isoamílico 24:1.

Concentración de curcumina	Area de curcumina en muestra	Area de curcumina estándar	Porcentaje recuperado (%)
100 ng/mL	20818.00	23015	90.45
	29256.00		127.11
	32933.00	23002	143.09
	21429.00		93.11
	25544.00	23030	110.99
	26669.00		115.87
Promedio	26108.17	23015.67	113.44
Desv.std	4626.02	14.01	20.10
C.V.	17.72	0.06	17.72

En la tabla 24 se observa que el porcentaje promedio es 113.44 % y un coeficiente de variación de 17.72 %, durante el proceso de extracción se observó que es muy volátil y toxico, por esta razón se descartó.

XII.I.III.III. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

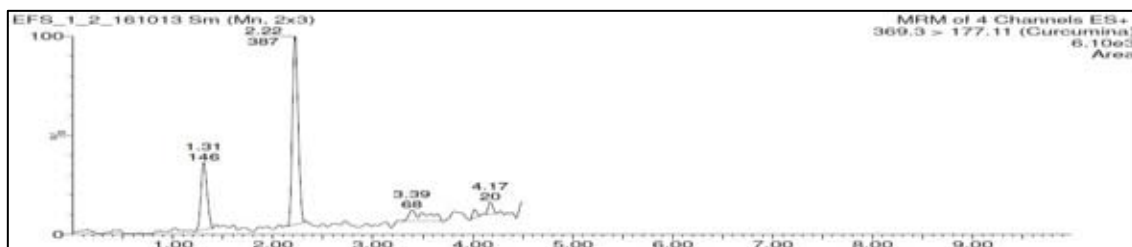


Figura 21. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina al realizar una extracción en fase sólida, acondicionado con metanol/agua 50:50.

Para eluir la muestra se utilizó la misma mezcla que la fase móvil. En la figura 21 se observa el cromatograma obtenido, en él se observa que el tiempo de retención de la curcumina se modifica de 2.22 a 2.21 minutos.

Asimismo se realizó el proceso de extracción en fase sólida pero en la etapa de acondicionamiento se utilizó con una mezcla de acetonitrilo/agua 50:50.

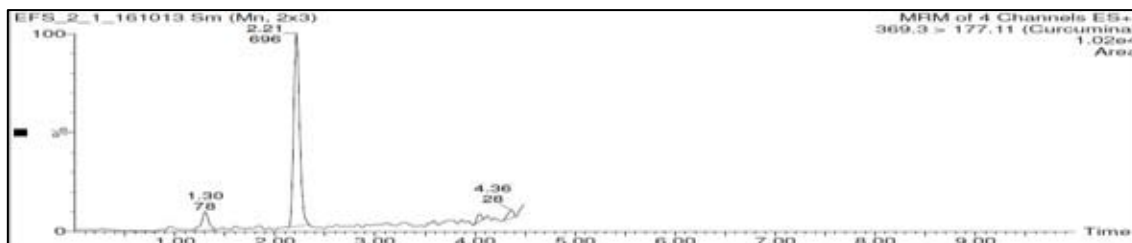


Figura 22. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina al realizar una extracción en fase sólida, acondicionado con acetonitrilo/agua 50:50.

Esta técnica de extracción se descartó por el costo que implicaba el uso de los cartuchos y por qué el proceso se realizaría manualmente lo que provocaría un tiempo prolongado de análisis y los coeficientes de variación serían mayores a 15%.

Finalmente se eligió la técnica de extracción líquido-líquido por el porcentaje de recuperación y porque en comparación con precipitación de proteínas, elimina sales inorgánicas que provoca supresión iónica en métodos por LC /MS/MS.

XI.I.II. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Tabla 25. Resultados de los parámetros de validación del método bioanalítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

	Prueba	Criterio de aceptación [110][112][111]	Resultados
SISTEMA	LINEALIDAD	Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango. Coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.98$	3 a 160 ng/mL $r^2=0.9994$ Pendiente=0.5194 Ordenada al origen= -0.1582
	PRECISIÓN	% C.V. $\leq 15\%$	C.V.% PC1=7.57% PC2=4.93% PC3=3.17%
	EXACTITUD	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de la concentración	Valor promedio= 97.63% Desviación absoluta= -9.44 a 17.17%
MÉTODO	LINEALIDAD	Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango	3 a 160ng/mL $r^2 = 0.9991$ Pendiente = 0.9993 Ordenada al origen =-0.069
	EXACTITUD Y PRECISIÓN	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de la concentración	PC1=5.45% PC2=4.51% PC3=2.26% Valor promedio= 94.58% Desviación absoluta=-14.05 a 12.56%
	REPETIBILIDAD	% C.V. $\leq 15\%$	PC1=6.33% PC2=5.14% PC3=2.17%
	REPRODUCIBILIDAD (ENTRE DÍAS)	% C.V. $\leq 15\%$	C.V % Global 3 días PC1=7.47% PC2=7.88% PC3=7.15%

	Prueba	Criterio de aceptación [110]*[112]*[111]	Resultados
M É T O D O	REPRODUCIBILIDAD (ENTRE DÍAS Y ANALISTAS)	% C.V. ≤ 15%	C.V % Global 3 días y analistas PC1=4.34% PC2=5.94% PC3=4.45%
	RECUPERACIÓN ABSOLUTA (% RECOBRO)	No necesariamente debe ser el 100% en cada nivel de concentración, pero debe ser reproducible	PC1=94.26% PC2=100.20% PC3=94.02%
	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	El valor promedio debe estar dentro del ±20 del valor nominal %C.V no mayor que el 20%	3 ng/mL (Experimental) 0.1764 ng/mL ((Teórico) C.V= 6.54%
	LIMITE DE DETECCIÓN	Sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.	0.0584ng/mL
	ESTABILIDAD. CICLOS DE CONGELACIÓN.	El valor promedio debe estar dentro del ±15 del valor nominal de la concentración. %C.V no mayor que el 15%	PC1=5.78% PC2=0.70% PC3=4.87% Valor promedio= 80.12% Desviación absoluta=-36.31 a -12.87%
	ESTABILIDAD AUTOMUESTREADOR (15°C) 24HRS.	El valor promedio debe estar dentro del ±15 del valor nominal de la concentración. %C.V no mayor que el 15%	PC1=4.59% PC2=7.47% PC3=1.65% Valor promedio= 89.81% Desviación absoluta=-16.27 a 4.23%
	ESTABILIDAD A CORTO PLAZO 5 DÍAS A (-20°C)	El valor promedio debe estar dentro del ±15 del valor nominal de la concentración. %C.V no mayor que el 15%	PC1=5.13% PC2=1.65% PC3=2.38% Valor promedio= 61.73%
	ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 105 DÍAS A (-20°C).	El valor promedio debe estar dentro del ±15 del valor nominal de la concentración. %C.V no mayor que el 15%	PC1=1.54% PC2=8.95% PC3=2.84% Valor promedio= 49.76%
	ESTABILIDAD MUESTRA PROCESADA A (8°C) 24HRS.	El valor promedio debe estar dentro del ±15 del valor nominal de la concentración. %C.V no mayor que el 15%	PC1=13.01% PC2=10.73% PC3=3.03% Valor promedio= 93.68% Desviación absoluta=-9.81 a 3.15%

	Prueba	Criterio de aceptación [110][112][111]	Resultados
MÉTODO	SELECTIVIDAD HEMÓLISIS	No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar. El valor promedio debe estar dentro del ± 15 del valor nominal de la concentración.	SH Valor Promedio= 83.32% Desviación absoluta=-9.81 a 3.15% SMH Valor Promedio= 86.48% H Valor Promedio= 45.08%
	SELECTIVIDAD ANTICOAGULANTE • EDTA • HEPARINA	No deben existir interferencias en el tiempo de retención del analito.	Sin interferencias
	EFEECTO MATRIZ (Matriz=plasma)	El CV% del FMN calculado no debe ser mayor que el 15%.	FMN_PC1=13.87% FMN_PC2=4.79% FMN_PC3=6.82%
	SUPRESION IONICA	La prueba se considera válida si la línea base no presenta inflexiones positivas o negativas en los tiempos de retención de	Sin inflexiones positivas y negativas.
	EFEECTO DE ACARREO	La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI	RA=2.16% Curcumina RA=0.012% EI

XI.II.I. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla 26. Relación de concentración de curcumina (ng/mL) con factor de respuesta.

Concentración de curcumina (ng/mL)	Factor de respuesta			Parámetros estadísticos		
	C1	C2	C3	Promedio	Des.std.	C.V.
3.00	1.57	1.41	1.51	1.50	0.08	5.40
10.01	4.74	4.97	5.12	4.94	0.19	3.87
40.04	20.43	20.95	20.28	20.55	0.35	1.71
80.08	42.31	39.49	41.86	41.22	1.52	3.68
120.12	63.3	61.99	63.46	62.92	0.81	1.28
160.16	82.44	82.16	83.37	82.66	0.63	0.77

Los resultados de la tabla 26 muestran que el sistema es lineal en el rango de concentraciones de 3-160ng/ml, el modelo que mejor describe la relación del factor de

respuesta y la concentración de curcumina, el coeficiente de correlación fue igual o mayor que 0.9997, el valor global para la pendiente fue de 0.5194 y la ordenada al origen -0.1582

Sin embargo se debe considera que el coeficiente de determinación no permite por si solo verificar si la representación concentración de curcumina y factor de respuesta corresponde a una recta.

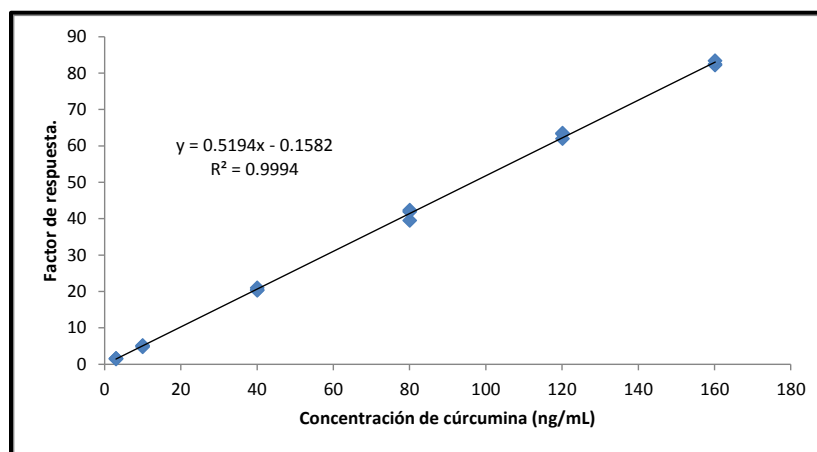


Figura 23. Linealidad del sistema para la cuantificación de Curcumina en plasma de perro.

En la figura 23 se observa la figura de la relación de concentración de curcumina en función del factor de respuesta.

Tabla 27. Comparación de modelos alternativos de la concentración de curcumina (ng/mL) en función del factor de respuesta.

Comparación de Modelos Alternativos		
Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Doble raíz cuadrada	0.9998	99.96%
Multiplicativo	0.9998	99.96%
Lineal	0.9997	99.94%
Doble cuadrado	0.9995	99.91%
Doble inverso	0.9986	99.72%
Raíz cuadrada-X	0.9798	96.00%
Raíz cuadrada-Y	0.9798	96.00%
Log-Y Raíz cuadrada-X	0.9704	94.16%
Raíz cuadrada-Y Log-X	0.9697	94.03%
Y-cuadrada	0.9664	93.40%
X-cuadrada	0.9642	92.97%
Modelo curva-S	0.9075	82.35%

XI.II.II. PRECISIÓN Y EXACTITUD

La precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas, y de acuerdo con los criterios de aceptación, en la tabla 31 se observa que el coeficiente de variación de los niveles de concentración de curcumina se encuentran dentro de los límites de aceptación por lo que se considera que el sistema es preciso.

Tabla 28. Precisión y exactitud del sistema para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)		
	30	90	150
1	27.1	85.1	149.2
2	28.8	79.2	147.7
3	29.2	79.5	142.3
4	31.5	90.3	155.5
5	32.9	84.4	153.9
6	32.4	82.6	148.1
Promedio	30.32	83.52	149.45
Desv.std	2.29	4.12	4.74
C.V.	7.57	4.93	3.17
%DevAbs	-1.06	7.20	0.37

XI.II.III. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Tabla 29. Relación de concentración adicionada de curcumina (ng/mL) en función de la concentración recuperada de curcumina (ng/mL)

CURVA	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)					
	3.00	10.01	40.04	80.08	120.12	160.16
1	2.90	8.20	36.20	73.90	113.90	154.30
2	2.90	8.90	33.30	73.30	115.50	166.0
3	3.10	9.30	37.40	71.70	113.40	146.6
Promedio	2.97	8.80	35.63	72.97	114.27	155.63
Desv.std	0.12	0.56	2.11	1.14	1.10	9.77
C.V.	3.89	6.33	5.92	1.56	0.96	6.28
%D.ABS.	1.12	13.75	12.37	9.75	5.12	2.91

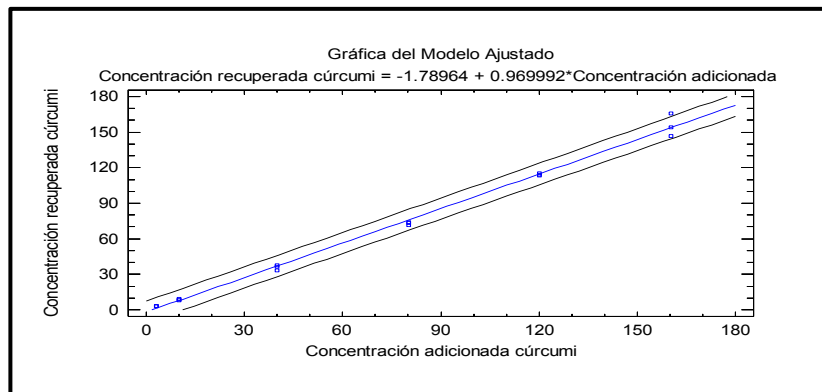


Figura 24. Cantidad adicionada de curcumina en función de la cantidad recuperada de cúrcumina.

Hipótesis

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de curcumina adicionada y la concentración recuperada de curcumina. Si $F_{cal} \leq F_{Crítica}$ no se rechaza Ho
- Ha: Existe una relación lineal entre la concentración de curcumina adicionada y la concentración estimada de curcumina. Si $F_{cal} \geq F_{crítica}$ se rechaza Ho

En la tabla 29 se presentan los valores individuales de la concentración recuperada de cada una de las curvas de calibración, así como su promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. En cada nivel de concentración los valores de desviación absoluta no fueron mayores al 15%.

Tabla 30. Comparación de modelos alternativos de la concentración de curcumina (ng/mL) en función de la cantidad adicionada de curcumina (ng/mL)

Comparación de modelos		
Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Multiplicativo	0.9991	99.83%
Doble raíz cuadrada	0.9988	99.77%
Doble inverso	0.9984	99.68%
Lineal	0.9976	99.53%
Doble cuadrado	0.9927	98.55%
Raíz cuadrada-Y	0.9846	96.95%
Log-Y Raíz cuadrada-X	0.9766	95.37%
Raíz cuadrada-X	0.9717	94.41%
X-cuadrada	0.9712	94.32%
Raíz cuadrada-Y Log-X	0.9623	92.60%
Y-cuadrada	0.9499	90.23%

Se compararon diferentes modelos de calibración estos resultados se observan en la tabla 30, estadísticamente el modelo en el que existe la mejor relación de la concentración adicionada de curcumina y la concentración recuperada, fue el modelo multiplicativo. Sin embargo por fines prácticos se empleó el modelo lineal.

Tabla 31. Análisis de variancia y de regresión de la linealidad del método de curcumina.

<i>Parámetro</i>	<i>Coficiente s</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepto	-1.7896	1.4940	-1.1978	0.2484	-4.9569	1.3776
Pendiente	0.9699	0.0166	58.1930	4.706E-20	0.9346	1.0053
ANÁLISIS DE VARIANCIA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	55664.48	55664.48	3386.42	4.70606E-20	
Residuos	16	263.00	16.43			
Total	17	55927.48				
Coficiente de correlación = 0.997646						
R-Cuadrada = 99.5297 por ciento						
R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.5004 por ciento						

Para evaluar la ausencia de errores sistemáticos es necesario determinar que el intercepto sea insignificante es decir que el intercepto pase a través de cero. Para demostrar estadísticamente se realizó un análisis de variancia con un intervalo de confianza del 95% en la tabla 31 se observa que pasa a través de cero en un rango de -4.956 a 1.3776 por lo tanto es considerado estadísticamente insignificante. De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de variancia de la tabla 34 la $F_{cal} \geq F_{critica}$, lo que comprueba que existe relación lineal entre la entre la concentración de curcumina adicionada y la concentración estimada de curcumina.

XI.II.IV. RECOBRO ABSOLUTO

La recuperación del curcumina puede verse afectada por la presencia de metabolitos, de fármacos administrados conjuntamente. Como se observa en la tabla 32 el porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración de curcumina fue consistente y el promedio de 96.17% con coeficientes de variación menores al 15%, lo que indica que el método es reproducible

Tabla 32. Porcentaje de recobro de curcumina.

Concentración nominal curcumina (ng/mL)	Factor respuesta en plasma(FR)	Factor respuesta en solución(FR)	% de Recobro	Promedio global	Des.std.	C.V
30.03	14.13	12.85	94.26	96.17	3.52	3.66
30.03	12.11	14.01				
30.03	12.71	14.46				
Promedio	12.98	13.77				
Desv.std	1.04	0.83				
C.V	7.99	6.03				
90.09	40.90	38.71	100.24			
90.09	41.21	42.83				
90.09	43.76	44.03				
Promedio	41.96	41.86				
Desv.std	1.57	2.79				
C.V	3.74	6.67				
150.15	69.32	68.89	94.02			
150.15	63.70	72.55				
150.15	68.16	72.54				
Promedio	67.06	71.33				
Desv.std	2.97	2.11				
C.V	4.42	2.96				

XI.IV. PRECISIÓN DEL MÉTODO

Tabla 33 . Precisión del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)		
	30	90	150
1	25.18	77.47	124.06
2	27.10	73.80	131.04
3	27.20	80.53	130.24
4	27.70	73.82	128.30
5	29.85	82.07	133.87
6	27.59	75.50	126.08
Promedio	27.44	77.20	129.90
Desv.std	1.50	3.48	2.93
C.V.	5.45	4.51	2.26

Los resultados de la tabla 33 demuestran que el método es preciso debido a que en cada nivel de concentración los coeficientes de variación son inferiores a 15%.

XI.II.VI. REPETIBILIDAD

Tabla 34. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Replica	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)		
	30	90	150
1	26.18	79.54	123.08
2	27.61	72.95	129.66
3	28.52	81.66	129.28
4	27.67	72.76	128.66
5	31.50	80.61	130.96
6	27.73	80.21	127.04
Promedio	28.20	77.95	128.11
Desv.std	1.79	4.01	2.78
C.V.	6.33	5.14	2.17

XI.II.VII. REPRODUCIBILIDAD

Tabla 35. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Día	Réplica	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)		
		30.00	90.00	150.00
1	1	30.30	83.80	139.40
	2	26.30	83.20	128.30
	3	27.50	88.90	137.10
2	1	25.18	77.47	124.06
	2	27.10	73.80	131.04
	3	27.20	80.53	130.24
3	1	26.42	84.11	136.40
	2	31.30	91.88	152.04
	3	29.90	72.58	119.60
Promedio		27.91	81.81	133.13
Desv.std		2.08	6.45	9.52
C.V.		7.47	7.88	7.15

Los datos de la tabla 34 y 35 indican que el método es repetible y reproducible debido a que en los tres niveles de concentración el coeficiente de variación es menor 15%, con porcentajes en un rango de 2.17 a 7.88%. El método es reproducible entre 3 días diferentes.

XI.II.VIII. EXACTITUD

Tabla 36. Exactitud del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)		
	30	90	150
1	27.90	84.04	135.18
2	27.01	78.50	144.69
3	29.86	87.31	138.40
4	29.07	78.54	137.16
5	33.24	88.05	143.57
6	28.89	86.40	139.72
Promedio	29.33	83.81	139.79
Desv.std	2.16	4.31	3.70
C.V.	7.36	5.15	2.65
%DevAbs	2.23	6.88	6.81

En la tabla 36 se observa que el porcentaje de desviación absoluta del promedio en los tres niveles de concentración recuperada de cúrcuma es menor al 15% lo que indica que existe concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores reales.

XI.II.IX. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

XI.II.IX.I. Teórico

De la curva de calibración del método, se determinaron los parámetros estadísticos y se determinó el límite de detección y cuantificación, obteniéndose lo siguiente:

Coeficiente de determinación (r^2)	0.995297
Pendiente (b_1)	0.96992
Ordenada al origen (b)	-1.78964
Desviación estándar del intercepto (S_{b_0})	0.016668

$$LC = \frac{10 \times (0.0166)}{(0.96992)} = 0.1764 \frac{ng}{mL} \text{ de curcumina}$$

$$LD = \frac{3.3 \times (0.0166)}{(0.96992)} = 0.0584 \frac{ng}{mL} \text{ de curcumina}$$

XI.II.IX.II. Experimental
Tabla 37. Límite de cuantificación del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Replica	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)
1	3.14
2	2.84
3	3.30
4	3.01
5	2.77
6	2.93
Promedio	3.00
Desv.std	0.20
C.V.	6.54

Se determinó el límite de detección y cuantificación con los valores obtenidos en la prueba de linealidad del método. El límite de detección del método fue de 0.1764 ng/mL y el límite de cuantificación fue de 0.05 ng/mL sin embargo en durante el desarrollo se estableció que era de 3 ng/mL, esto se corroboró al preparar muestras con plasma de perro a una concentración de 3 ng/mL. En la tabla 37 se observa que el valor del coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta fueron menores al 20% por lo que se considera como la cantidad mínima cuantificable de curcumina.

XI.II.X. ESTABILIDAD DE CURCUMINA EN MATRIZ
Tabla 38. Estabilidad a corto plazo del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Muestras de referencia						5 días a -20°C					
	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)											
	30		90		150		30		90		150	
	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%
1	30.3	100.9	83.8	93.00	139.4	92.80	18.4	61.2	54.8	60.8	88.1	58.7
2	26.3	87.60	83.2	92.40	128.3	85.40	20.3	67.6	56.4	62.6	86.2	57.4
3	27.5	91.60	88.9	98.6	137.1	91.3	18.9	62.9	56.4	62.6	90.4	60.2
Promedio	28.03	93.37	85.30	94.67	134.93	89.83	19.20	63.90	55.87	62.00	82.39	58.77
Desv.std	2.05		3.13		5.86		0.98		0.92		2.10	
C.V.	7.32		3.67		4.34		5.13		1.65		2.38	
Promedio de % R global	92.62						61.73					

%R = Porcentaje de recobro

En la tabla 38 se presentan los resultados de estabilidad de plasma con curcumina a tres niveles de concentración almacenado durante 5 días a -20°C . En este parámetro se observó que la curcumina no es estable en un tiempo superior a 5 días.

El porcentaje recuperado de curcumina es de 61.73% después de ser almacenado a -20°C durante 5 días como se mencionó con anterioridad la curcumina es inestable a pH alcalinos y el plasma tiene un pH aproximado de 7.32, por consiguiente el tiempo para procesar las muestras debe ser inferior a este plazo.

Tabla 39. Estabilidad del método analítico a largo plazo para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Muestras de referencia						105 días a -20°C					
	Concentración recuperada de cúrcuma (ng/mL)											
	30		90		150		30		90		150	
	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%
1	25.55	85.10	69.63	77.30	126.03	83.90	14.34	47.70	43.06	47.80	70.56	47.0
2	29.14	97.00	78.42	87.00	134.57	89.60	14.75	49.10	47.14	52.30	73.65	49.10
3	26.63	88.70	64.03	71.10	111.86	74.50	14.41	48.0	51.51	57.20	74.49	49.60
Promedio	27.11	90.27	70.69	78.47	124.15	82.67	14.50	48.27	47.24	52.43	72.90	48.57
Desv.std	1.84		7.25		11.47		0.22		4.23		2.07	
C.V.	6.79		10.26		9.24		1.54		8.95		2.84	
Promedio de % R global	83.80						49.76					

En los resultados de la tabla 39 se evidencia que la curcumina no es estable en la matriz, en consecuencia el porcentaje de recobro promedio es de 49.76%, sin duda alguna este resultado era esperado considerando que no es estable a más de 5 días.

Tabla 40. Estabilidad del método analítico en 3 ciclos de congelación - descongelación para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Muestras de referencia						3 Ciclo de congelación y descongelación					
	Concentración recuperada de cúrcuma (ng/mL) y % de recobro											
	30		90		150		30		90		150	
	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%
1	26.58	88.5	74.39	82.6	130.10	86.6	24.12	80.3	72.64	80.6	116.73	77.7
2	28.66	95.5	76.82	85.3	134.57	89.6	26.58	88.5	71.65	79.5	110.04	73.3
3	19.68	65.6	80.07	88.9	138.69	92.4	24.06	80.1	72.31	80.3	121.26	80.8
Promedio	24.97	83.20	77.09	85.60	134.46	89.53	24.92	82.97	72.20	80.13	116.01	77.27
Desv.std	4.70		2.85		4.30		1.44		0.51		5.65	
C.V.	18.84		3.69		3.20		5.78		0.70		4.87	
Promedio de % R global	86.10						80.12					

Las muestras de curcumina en plasma de perro sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación (-20°C- temperatura ambiente). En cada nivel de concentración como se observa en la tabla 40 los coeficientes de variación son inferiores a 15%. El valor promedio de las muestras al ser sometidas a 3 ciclos es igual 80.12%.

XI.II.XI. ESTABILIDAD MUESTRA PROCESADA

En la tabla 41 se observan los resultados de estabilidad en automuestreador, los coeficientes de variación en los tres niveles de concentración en muestras de referencia y muestras almacenadas en automuestreador son inferiores a 15 % el valor promedio de las muestras de referencias es menor es comparación con las muestras almacenadas y esto se debe a que en algunas muestras el porcentaje de recobro fue mayor al inicial.

Tabla 41. Estabilidad del método analítico en automuestreador para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Muestras de referencia						Estabilidad en automuestreador 15°C (24hrs)					
	Concentración recuperada de cúrcuma (ng/mL)											
	30		90		150		30		90		150	
	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%
1	26.30	87.70	74.70	82.90	135.30	90.10	25.80	86.00	74.40	82.60	134.20	89.40
2	27.00	89.90	76.10	84.40	131.80	87.70	27.60	92.00	78.00	86.50	135.20	90.10
3	27.70	92.30	84.30	93.50	135.10	90.00	28.20	93.90	86.00	95.50	138.50	92.30
Promedio	27.00	89.97	78.37	86.93	134.07	89.27	27.20	90.63	79.47	88.20	135.97	90.60
Desv.std .	0.70		5.19		1.97		1.25		5.94		2.25	
C.V.	2.59		6.62		1.47		4.59		7.47		1.65	
Promedio de % R global	88.72						89.81					

Los resultados de la tabla 42 demuestran que la muestra procesada al ser almacenada en a una temperatura de 8°C durante 24 h es estable, al comparar el valor promedio de las muestras iniciales y después de ser almacenadas, no existe diferencia. Por consiguiente estas son las condiciones ideales para almacenar una muestra procesada.

Tabla 42. Estabilidad del método analítico en de muestra procesada y almacenada a 8°C durante 24hrs para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Muestras de referencia						Refrigeración (8°C) 24 hrs					
	Concentración recuperada de cúrcumina (ng/mL)											
	30		90		150		30		90		150	
	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%	[]	%
1	26.42	88.00	84.11	93.40	136.40	90.80	23.98	79.80	74.34	82.50	144.69	96.40
2	31.30	104.20	91.88	102.00	152.04	101.30	29.29	97.50	85.69	95.10	136.59	91.00
3	29.90	99.60	72.58	80.60	119.60	79.70	30.98	103.20	92.15	102.3	143.11	95.30
Promedio	29.21	97.27	82.86	92.00	136.01	90.60	28.08		84.06		141.47	
Desv.std	2.51		9.71		16.23		3.65		9.02		4.29	
C.V.	8.59		11.72		11.93		13.01		10.73		3.03	
Promedio de % R global	93.29						93.68					

XI.II.XII. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ENTRE DÍAS Y ANALISTAS
Tabla 43. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Día	Analista	Replica	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)					
			30.00		90.00		150.00	
			[]	%	[]	%	[]	%
1	1	1	30.30	100.90	83.80	93.00	139.40	92.80
		2	26.30	87.60	83.20	92.40	128.30	85.40
		3	27.50	91.60	88.90	98.60	137.10	91.30
	2	1	28.40	92.20	84.50	81.90	130.60	85.40
		2	28.00	99.40	84.00	91.10	121.50	89.20
		3	27.70	91.90	80.50	83.80	121.40	84.00
2	1	1	27.70	94.70	73.82	93.80	128.30	87.00
		2	29.85	93.30	82.07	93.20	133.87	80.90
		3	27.59	92.30	75.50	89.40	126.08	80.90
	2	1	26.30	87.70	74.70	82.90	135.30	90.10
		2	27.00	89.90	76.10	84.40	131.80	87.70
		3	27.70	92.30	84.30	93.50	135.10	90.00
Promedio Global			27.86	92.82	80.95	89.83	130.73	93.00
Desv.std Global			1.21		4.81		5.82	
C.V. Global			4.34		5.94		4.45	

Al evaluar los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como día (repetibilidad) y analista (reproducibilidad) y como se observa en la tabla 43 y en la figura 25 no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recobro obtenidos por diferentes analistas y diferentes días. El método es reproducible debido a que la variación es menor a 15%, en ambos días y analistas por tanto el método es reproducible y repetible siempre y cuando se realice en condiciones establecidas.

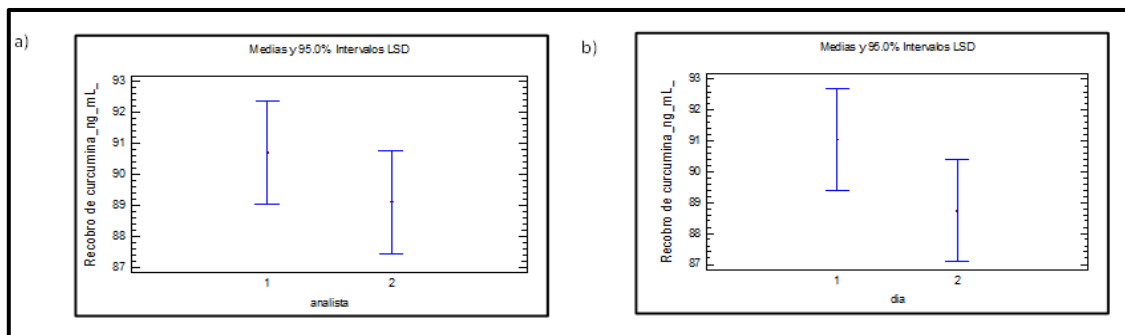


Figura 25. Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de Curcumina entre a) analistas y b) días con intervalo de confianza LSD del 95%

Tabla 44. Análisis de variancia para analista y día.

Análisis de Variancia para Recobro de cúrcumina (ng/mL)					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	92.18	3	30.73	1.29	0.2944
Residuo	761.73	32	23.80		
Total (Corr.)	853.91	35			
Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
analista	22.56	1	22.56	0.95	0.3376
día	48.30	1	48.30	2.03	0.164
analista*día	21.31	1	21.31	0.9	0.3511
Residuo	761.73	32	23.80		
Total (corregido)	853.9	35			

En la tabla 44 estadísticamente se comprueba ya que el valor de P es mayor a 0.05, con un intervalo de confianza de 95%.

XI.II.XIII. SELECTIVIDAD

Durante proceso de extracción se utilizó solución diluyente para reconstituir la muestra, por esta razón se evaluó si bajo las condiciones de fragmentación de la molécula de curcumina la solución presenta iones de masa semejante al ion padre e hijo de curcumina y clopidogrel

bisulfato. Para evaluar este parámetro se realizó una infusión directa de solución diluyente para observar los iones aportados.

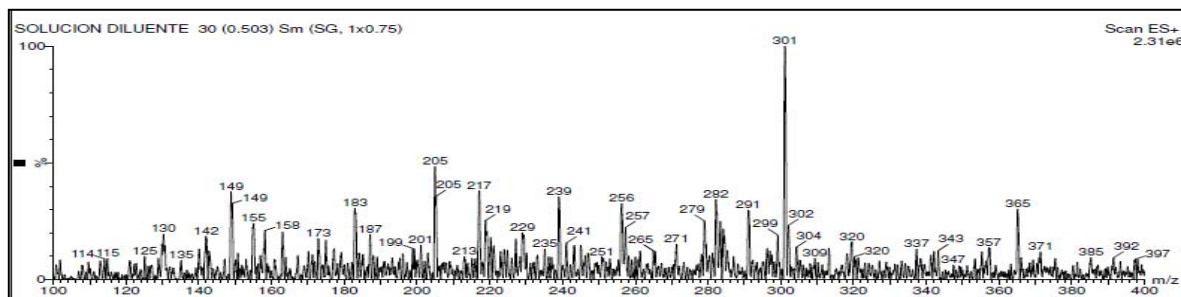


Figura 26. Ion padre de mayor proporción de solución diluyente.

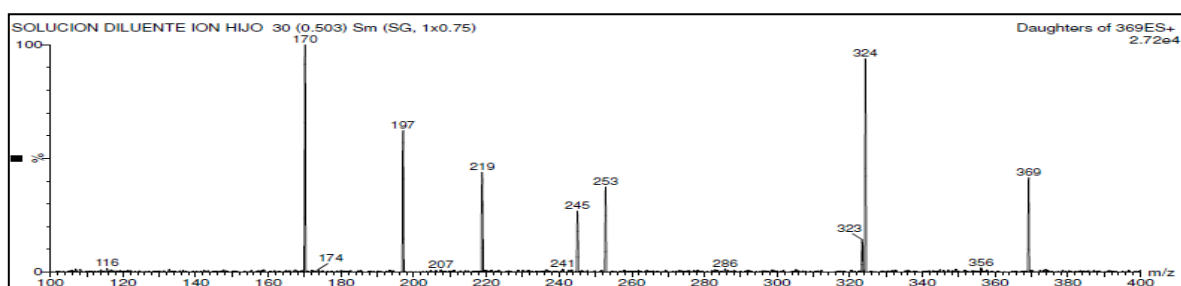


Figura 27. Ion hijo de mayor proporción de solución diluyente.

En el espectrómetro de masas de la figura 26 y 27 se observa que no existe un ion de relación masa/carga semejante que interfiera en la cuantificación de curcumina.

XLII.XIII.I. SUPRESIÓN IONICA EN ANTICOAGULANTES

Durante la toma de muestra se emplean anticoagulantes (EDTA y heparina) para evitar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados, debido a que las enzimas y factores de coagulación son sustancias muy lábiles.

El anticoagulante EDTA es una solución de sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético, estas sales inhiben la participación del ion calcio en la cascada de la coagulación de la sangre.

La heparina es un glicosaminoglicano compuesto de cadenas residuos de D-glucosamina y ácido urónico. Su efecto anticoagulante está determinado por un pentasacárido único con alta afinidad por la antitrombina III (ATIII), que está presente en sólo un tercio de las moléculas de heparina. La interacción de la heparina con la ATIII induce un cambio conformacional en esta última, acelerando en forma importante su capacidad para inactivar la trombina y los factores IXa, Xa, XIa y XIIa; de éstos, la trombina y el factor Xa son los más sensibles a la inhibición.

Considerando que la composición de ambos anticoagulantes está basada en sales y que las sales en espectrometría de masas provocan un fenómeno llamado “supresión iónica” es necesario determinar si existe la presencia o ausencia de esta en blancos de plasma de perro.

En las figuras 28 se presentan los cromatogramas correspondientes el estándar de curcumina y clopidogrel bisulfato a una concentración de 160 ng/mL y 40 ng/mL, respectivamente. Del mismo modo se presenta el cromatograma en la transición de curcumina de un blanco de plasma de perro con EDTA, en la imagen c de esa figura se observa que no existe una inflexión ni positiva ni negativa en el tiempo de retención de curcumina al contrario en la transición de clopidogrel bisulfato dónde se presenta un pico en el tiempo de retención de clopidogrel bisulfato estos cromatogramas fueron los puntos de comparación para determinar la presencia o ausencia del fenómeno.

Para evaluar la presencia de supresión iónica en muestras de plasma obtenidas con anticoagulante EDTA y heparina se realizó una infusión directa de una muestra obtenida con EDTA y otra muestra con heparina, para esto se inyectó una muestra blanco de plasma de perro y mediante un infusión post-columna se infundió curcumina a dos niveles de concentración 3 ng/mL y 160 ng/mL (figura 28 e y d), de la misma manera se realizó con clopidogrel bisulfato pero a una concentración de 40 ng/mL (figura 28 h). Se seleccionaron estas dos concentraciones de curcumina debido a que son los extremos de la curva de calibración y son los niveles de concentración que serían más susceptibles a un fenómeno de supresión iónica.

En los paneles d y e de la figura 28 no se observan puntos de inflexión en el tiempo de retención de curcumina, sin embargo en la transición de clopidogrel bisulfato en la figura 28 h se observa un pico que coincide con el tiempo de retención de curcumina, el cuál coincide con el pico de la muestra blanco sin infundir clopidogrel bisulfato.

El procedimiento para evaluar la supresión iónica utilizando heparina como anticoagulante fue el mismo y los resultados al igual que con EDTA se asemejan en el panel i y l de la figura 29 se observan los blancos de plasma de perro con heparina en la transición de curcumina no se observa puntos de inflexión por el contrario en la transición de clopidogrel bisulfato existe un pico en el tiempo de retención de clopidogrel bisulfato.

Por consiguiente se realizó un espectro de masas en ese tiempo de retención utilizando una muestra blanco de plasma con EDTA y con heparina, los espectros se observan en la figura 30 y 31 respectivamente. En este espectro de masas el ion base para EDTA es 119.04 m/z y para heparina 183.06 m/z con este espectro se descarta un posible contaminación de la muestra con clopidogrel bisulfato y se atribuye a un compuesto endógena.

Sin embargo la norma establece que si existiera una interferencia esta no debe ser mayor al 5% de la respuesta del estándar interno por esta razón no se considera y se establece que no existe supresión iónica al emplear EDTA y heparina.

Transición de Cúrcumina 369.3 →177.1

Transición de Clopidogrel bisulfato 322 →122.05

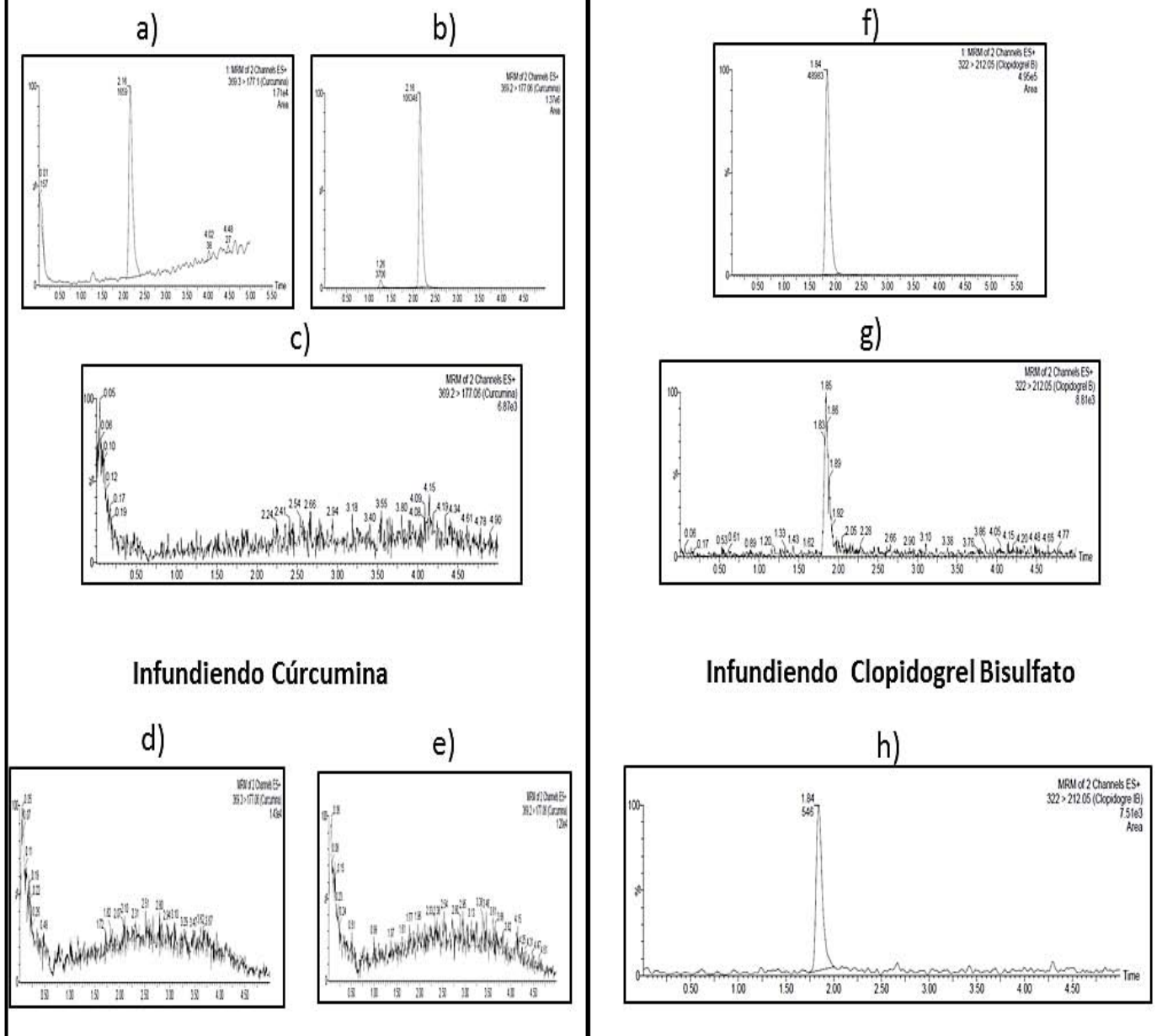


Figura 28. Cromatograma de **a)** Estándar de curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente **b)** Estándar de curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente **f)** Estándar de Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL **c,g)** Blanco de plasma de perro con EDTA **d)** Blanco de plasma con EDTA e infundiendo curcumina a una concentración de 3 ng/mL **e)** Blanco de plasma con EDTA e infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL **h)** Blanco de plasma con EDTA e infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.

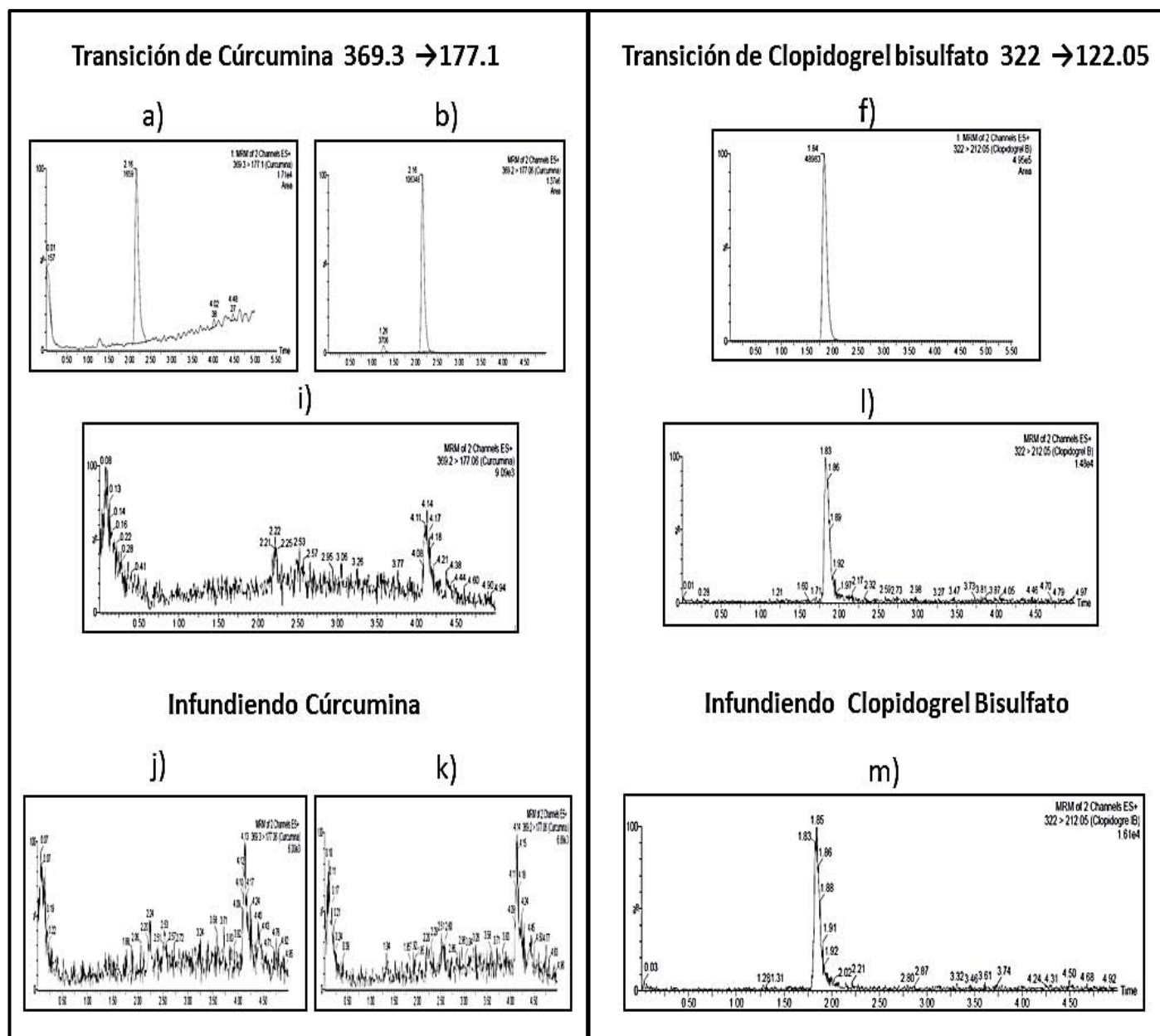


Figura 29. Cromatograma de a) Estándar de curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente b) Estándar de curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente f) Estándar de Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL i,l) Blanco de plasma de perro con heparina j) Blanco de plasma con heparina e infundiendo curcumina a una concentración de 3ng/mL k) Blanco de plasma con heparina e infundiendo curcumina a una concentración de 160 ng/mL m) Blanco de plasma con heparina e infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL.

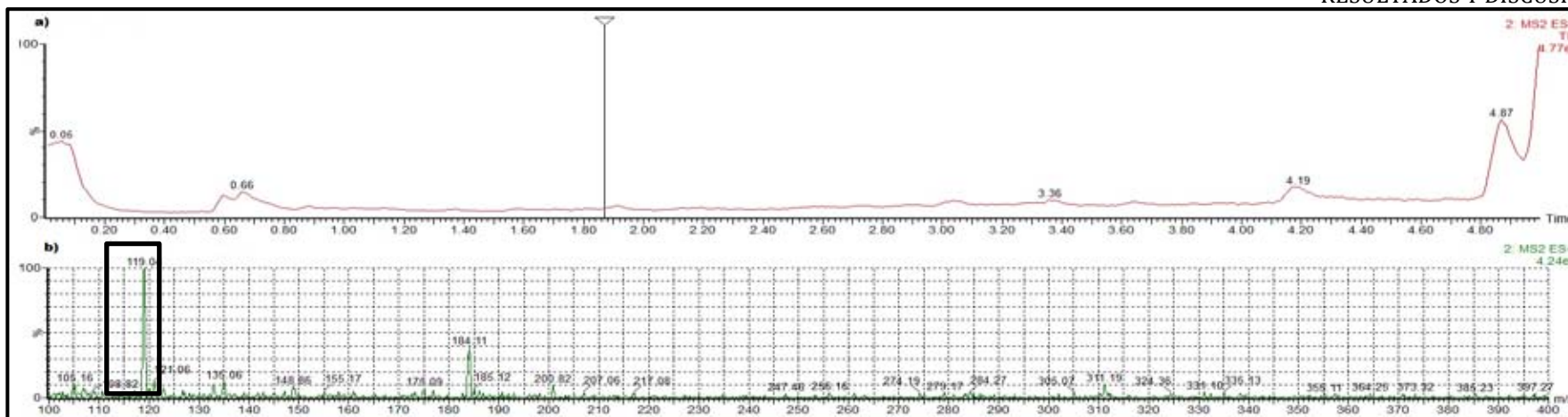


Figura 31 Espectro de masas en el tiempo de retención (1.84 min) del cromatograma de blanco de plasma con EDTA en transición 322-122.05 m/z

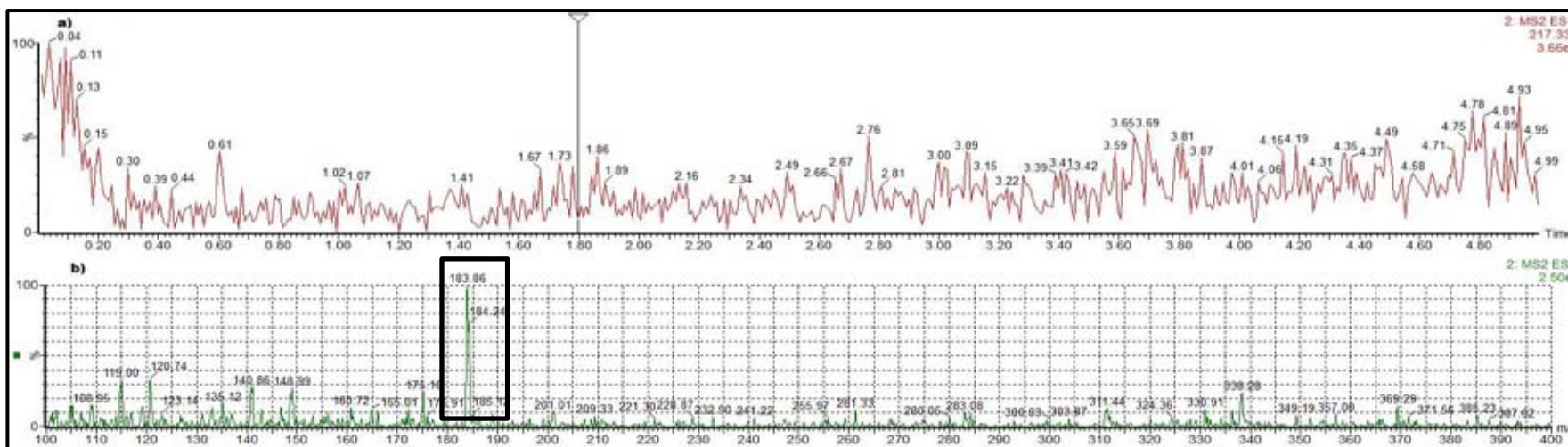


Figura 30. Espectro de masas en el tiempo de retención (1.84 min) del cromatograma de blanco de plasma con heparina en transición 322-122.05 m/z.

XI.II.XIII.II. SUPRESIÓN IÓNICA EN MUESTRAS HEMOLIZADAS

En la toma de muestra y almacenamiento en un estudio en algunas muestras existe la posibilidad de que la sangre sufre un fenómeno llamado hemólisis que se refiere a la rotura de la membrana de los eritrocitos, lo que provoca la liberación de hemoglobina y otros componentes internos en el líquido circundante de las células. La hemólisis se detecta visualmente por muestra de color rosa a rojo en el suero o muestra de plasma durante o después del proceso de la muestra [114].

Además de hemoglobina, los eritrocitos también contienen varias proteínas estructurales, enzimas, lípidos, y carbohidratos, pigmentos, que pueden interferir en la cuantificación y que pueden provocar una supresión iónica de curcumina o clopidogrel bisulfato. Para determinar la presencia de este fenómeno se realizó la inyección de un estándar de curcumina a dos concentraciones 3 y 160 ng/mL, estos se observan en la figura 32 panel a y b, posteriormente se preparó e inyectó un blanco de plasma sin presencia aparente de hemólisis, semihemolizado y hemolizado al mismo tiempo que se realizaba una infusión post-columna de curcumina a 3 ng/mL y 160 ng/mL. En los paneles c-h de la figura 32 se observa que la línea base no presenta inflexiones ni positivas ni negativas en el tiempo de retención de curcumina y en la transición de curcumina.

Del mismo modo se evaluó en la transición de clopidogrel e infundiendo clopidogrel bisulfato a una concentración de 40 ng/mL, en el panel g-l de la figura 33 se observa un pico en el tiempo de retención de clopidogrel bisulfato al igual que en las muestras de EDTA y heparina, por consiguiente se elaboró un espectro de masas a cada plasma en el tiempo de retención 1.84 minutos para descartar una posible contaminación de clopidogrel bisulfato.

Los espectros de masas se observan en la figura 34 en esta se encuentra el ion de 184 m/z que se relaciona con el grado de hemólisis de la muestra de plasma, la intensidad de este ion aumenta según el grado de hemólisis de la muestra, por esta razón se piensa que el pico al tiempo de retención de clopidogrel es de un compuesto endógeno asociado al grado de hemólisis de la muestra.

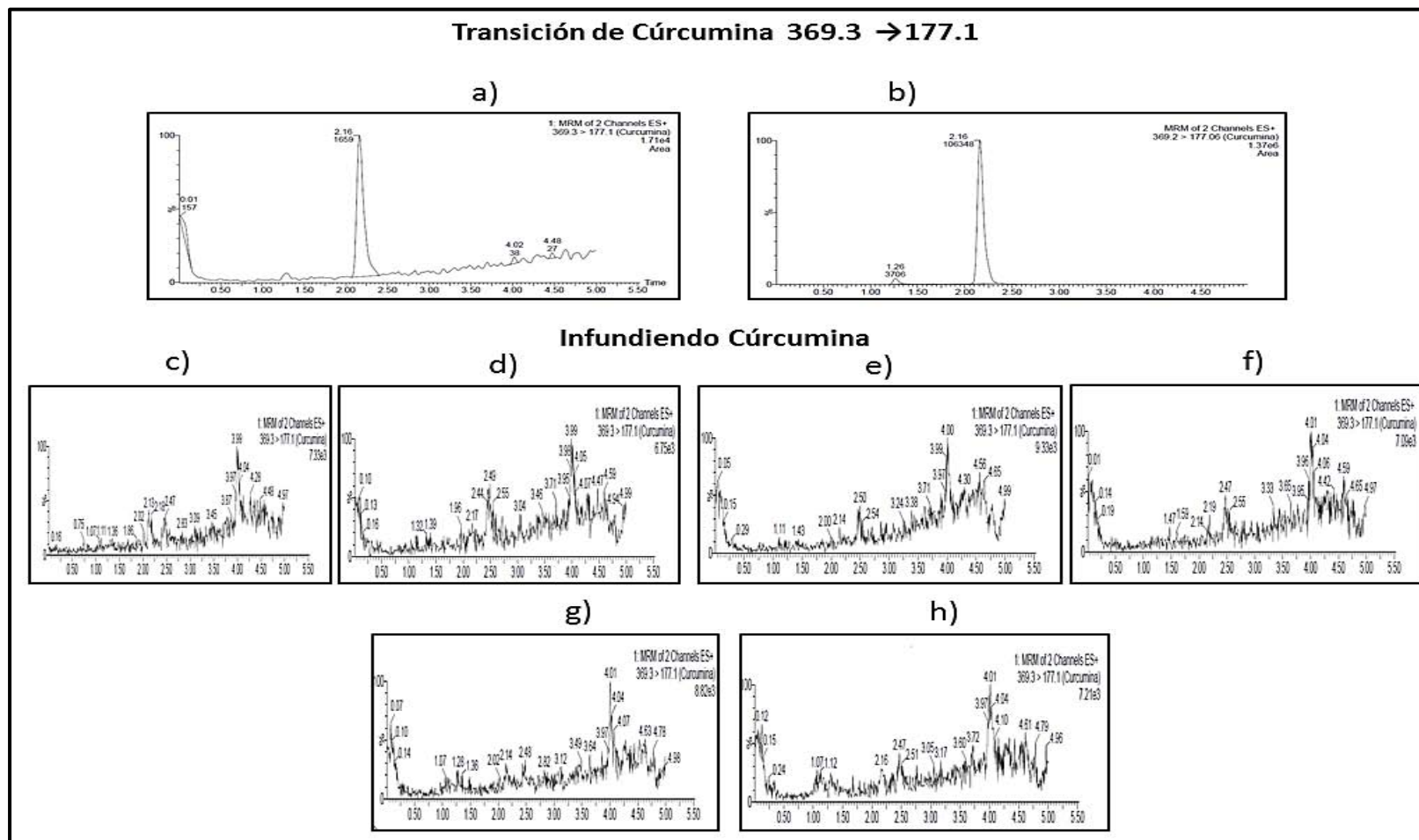


Figura 32. Cromatograma de **a)** Estándar de cúrcuma a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente **b)** Estándar de cúrcuma a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente **c)** Blanco de plasma sin presencia de hemólisis infundiendo cúrcuma a una concentración de 3 ng/mL **d)** Blanco de plasma sin presencia de hemólisis infundiendo cúrcuma a una concentración de 160 ng/mL **e)** Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo cúrcuma a una concentración de 3 ng/mL **f)** Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo cúrcuma a una concentración de 160 ng/mL **g)** Blanco de plasma hemolizado infundiendo cúrcuma a una concentración de 3 ng/mL **h)** Blanco de plasma hemolizado infundiendo cúrcuma a una concentración de 160 ng/mL.

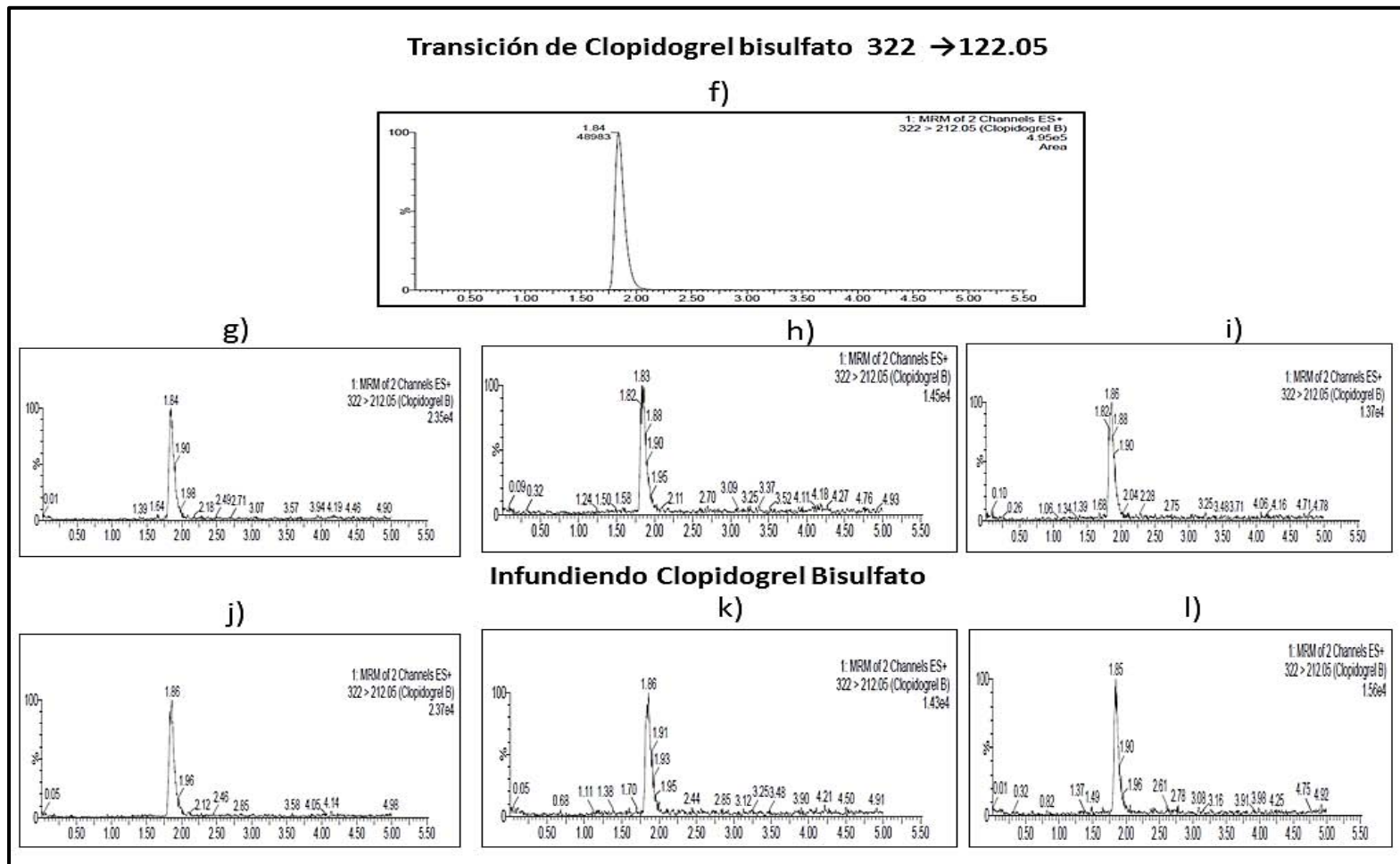


Figura 33. Cromatograma de **f)** Estándar de Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL **g)** Blanco de plasma sin presencia de hemolisis **h)** Blanco de plasma semi hemolizado **i)** Blanco de plasma hemolizado **j)** Blanco de plasma sin presencia de hemólisis infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL **k)** Blanco de plasma semi hemolizado infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL **l)** Blanco de plasma hemolizado infundiendo Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL

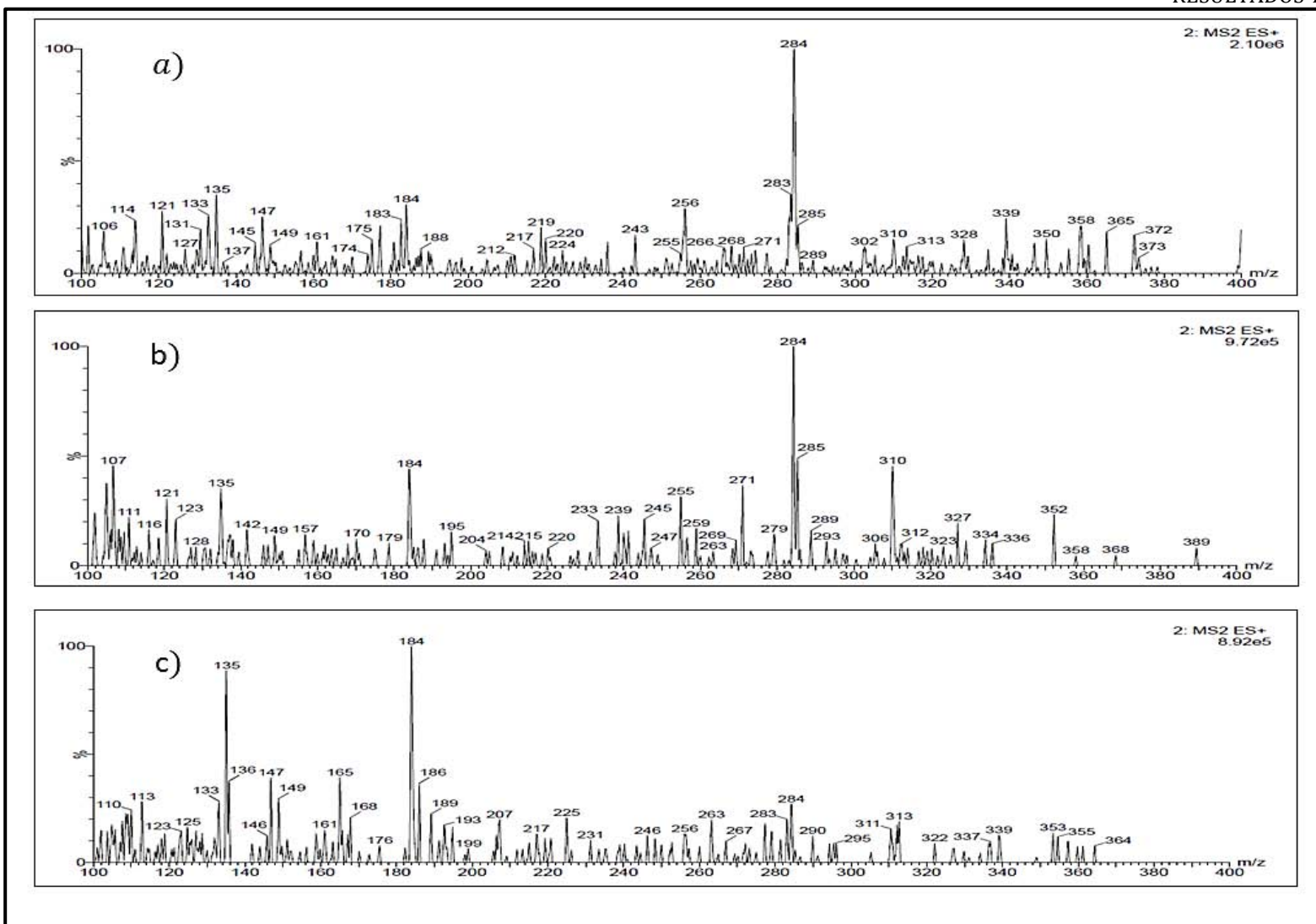


Figura 34 Espectro de masas de pico en tiempo de retención de 1.84 minutos en plasma a) sin presencia de hemólisis b) semi hemolizado c) hemolizado

Tabla 45. Efecto de hemólisis en plasma de perro del método analítico para la cuantificación de cúrcuma.

Muestra	SIN HEMÓLISIS			SEMI HEMOLIZADO			HEMOLIZADO					
	Concentración recuperada de curcumina (ng/mL)											
	30	90	150	30	90	150	30		90		150	
							[]	%	[]	%	[]	%
1	25.9	72.7	131.5	23	83.6	135.6	13.00	43.10	41.40	45.90	66.6	44.30
2	26.2	75.3	114.6	27.2	74.9	127.8	13.60	45.40	42.60	47.20	72.70	48.40
3	25.9	73.7	121.8	26.5	75.6	133	11.50	38.40	41.70	46.30	70.40	46.80
Promedio	26.00	73.90	122.63	25.57	78.03	132.13	12.70	42.30	41.90	46.47	69.90	46.50
Desv.std	0.17	1.31	8.48	2.25	4.83	3.97	1.08		0.62		3.08	
C.V.	0.67	1.77	6.92	8.80	6.19	3.01	8.52		1.49		4.41	
Promedio de % R global							45.09					

%R =Porcentaje de recobro

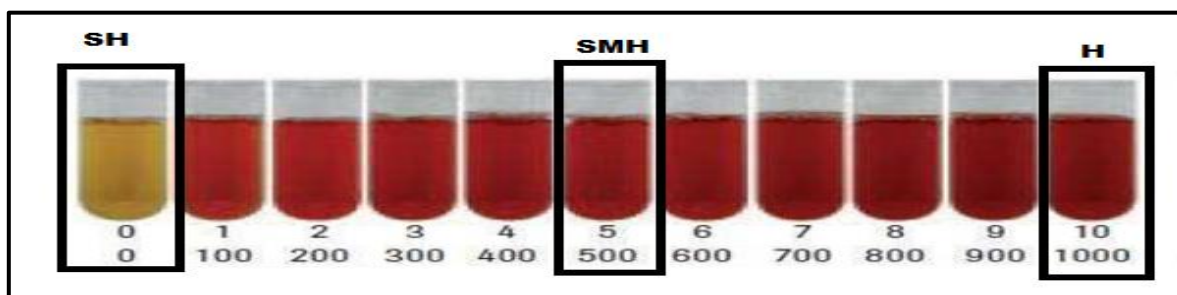


Figura 35. Escala de hemólisis en plasma.

Se consideró la escala de hemólisis en plasma de la figura 35. Para tener una referencia del grado de hemólisis de las muestras analizadas.

Debido a que este compuesto se encuentra relacionado con el grado de hemólisis de las muestras, fue necesario evaluar si al aumentar la intensidad de este compuesto la respuesta de la curcumina disminuía, por lo cual se prepararon muestras a tres niveles de concentración 30, 90 y 150 ng/mL utilizando el plasma sin presencia de hemólisis, semihemolizado y hemolizado.

En la tabla 45 se puede observar que la hemólisis de la SH Y SMH no presentan interferencia, sin embargo en las muestras hemolizadas el porcentaje promedio recuperado es de 45.09%, considerando que la hemólisis en escala 10 afecta la cuantificación de cúrcuma, es recomendable que durante la adquisición de las muestras se evite este proceso de hemólisis.

XII.XIII.III. EFECTO MATRIZ

El efecto de la matriz debe ser investigado para asegurar que la precisión, selectividad, sensibilidad no se verá comprometida. El efecto de la matriz se refiere a la supresión o mejora de ionización de analitos por la presencia de componentes de la matriz en las muestras biológicas como proteínas (albumina, globulinas, fibrinógeno), nitrógeno residual (urea, creatinina, ácido úrico, carbohidratos (glucosa, galactosa, fructosa), lípidos (ácidos grasos, colesterol), pigmentos (bilirrubina), otras sustancias como hormonas, enzimas, vitaminas y sales minerales y puede evaluarse manera cualitativa y cuantitativa.

En los paneles d y f de la figura 36 se observa que la línea base no presenta inflexiones ni positivas ni negativas en el tiempo de retención de curcumina y en la transición de curcumina. Sin embargo en clopidogrel bisulfato se observa un pico en el tiempo de retención del mismo.

Del mismo modo se evaluó cada pool de plasma y los resultados se observan en la figura 36 y 39.

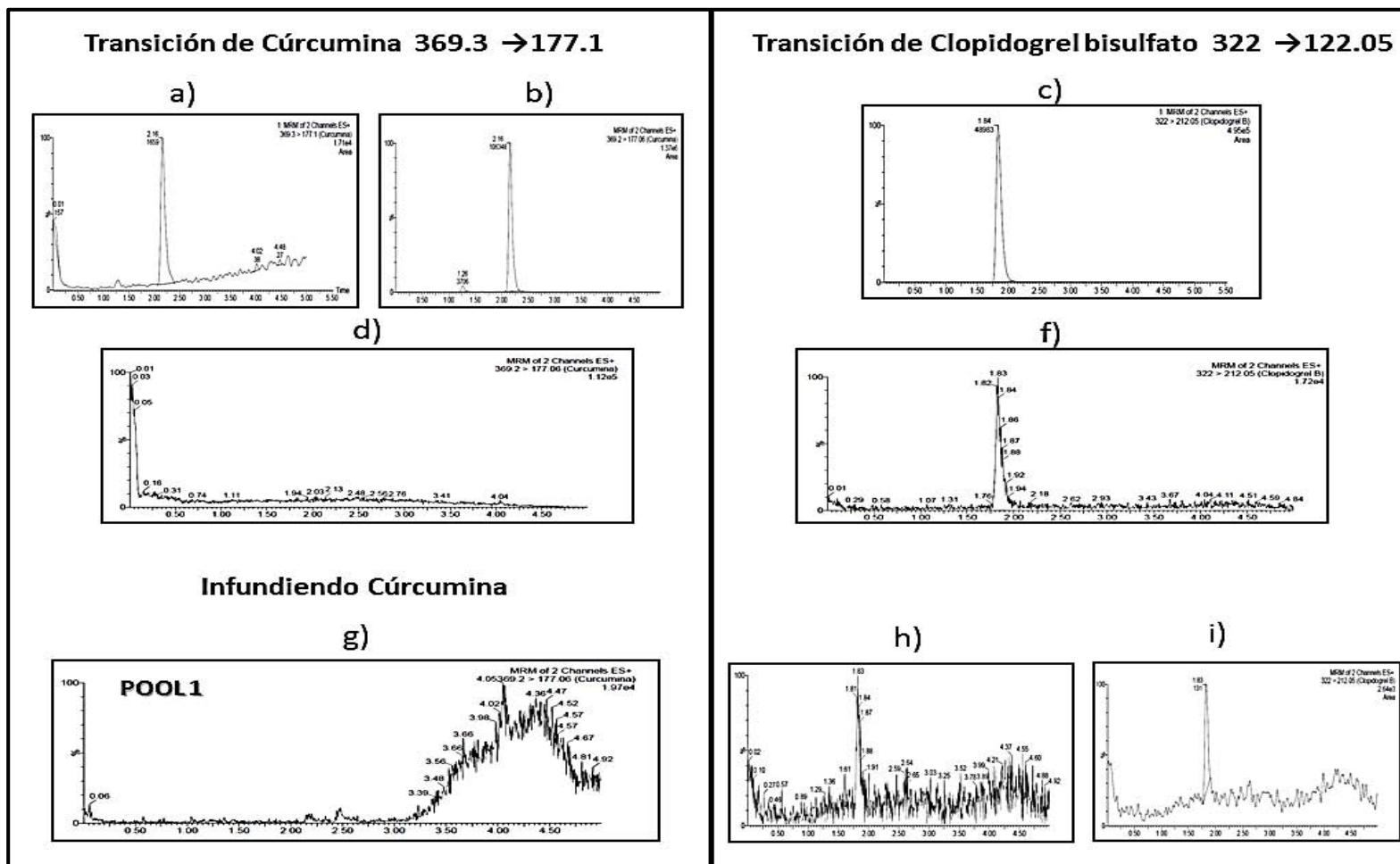


Figura 36. Cromatograma de **a)** Estándar de curcumina a una concentración de 3 ng/mL en solución diluyente **b)** Estándar de curcumina a una concentración de 160 ng/mL en solución diluyente **c)** Estándar de Clopidogrel Bisulfato a una concentración de 40 ng/mL en solución diluyente **d)** Blanco de plasma de perro en transición de curcumina **f)** Blanco de plasma en transición Clopidogrel Bisulfato **g)** Blanco de plasma de pool 1 infundiendo 3 ng/ml de curcumina **h)** Blanco de plasma de pool 1 infundiendo 3 ng/mL de curcumina **i)** Blanco de plasma de pool 1 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina..

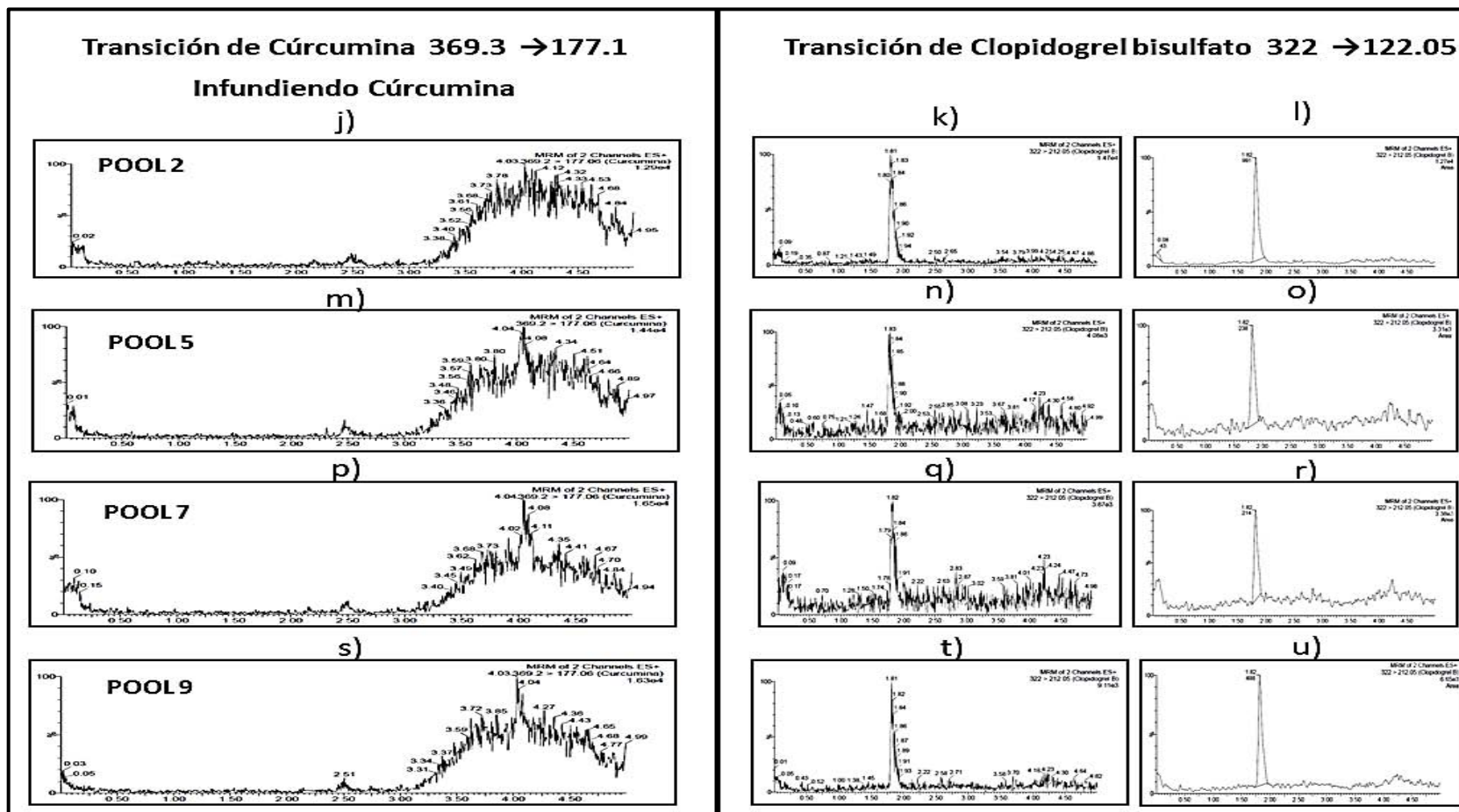


Figura 37. Cromatograma de **j)** Blanco de plasma de pool 2 infundiendo 3 ng/ml de curcumina **k)** Blanco de plasma de pool 2 infundiendo 3 ng/mL de curcumina **l)** Blanco de plasma de pool 2 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina **m)** Blanco de plasma de pool 5 infundiendo 3 ng/ml de curcumina **n)** Blanco de plasma de pool 5 infundiendo 3 ng/mL de curcumina **o)** Blanco de plasma de pool 5 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina **p)** Blanco de plasma de pool 7 infundiendo 3 ng/ml de curcumina **q)** Blanco de plasma de pool 7 infundiendo 3 ng/mL de curcumina **r)** Blanco de plasma de pool 7 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina **s)** Blanco de plasma de pool 9 infundiendo 3 ng/ml de curcumina **t)** Blanco de plasma de pool 9 infundiendo 3 ng/mL de curcumina **u)** Blanco de plasma de pool 9 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina.

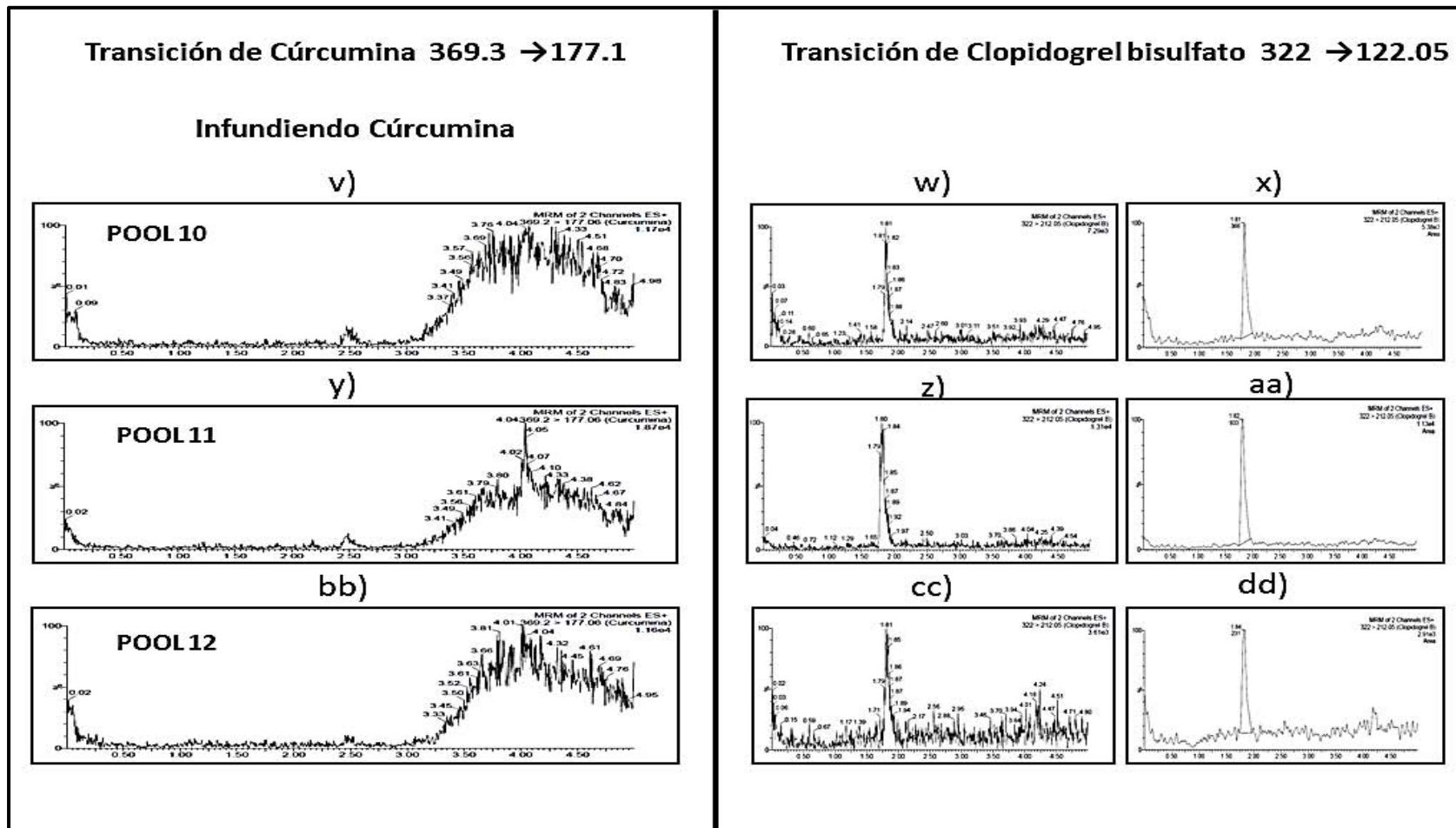


Figura 38. Cromatograma de v) Blanco de plasma de pool 10 infundiendo 3 ng/ml de curcumina w) Blanco de plasma de pool 10 infundiendo 3 ng/mL de curcumina x) Blanco de plasma de pool 10 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina .y) Blanco de plasma de pool 11 infundiendo 3 ng/ml de curcumina z) Blanco de plasma de pool 11 infundiendo 3 ng/mL de curcumina aa) Blanco de plasma de pool 11 integrado e infundiendo 3 ng/mL de curcumina. bb) Blanco de plasma de pool 11 infundiendo 3 ng/ml de curcumina cc) Blanco de plasma de pool 11 infundiendo 3 ng/mL de curcumina dd) Blanco de plasma de pool 11 integrado e infundiendo 3 ng/mL de cúrcumina.

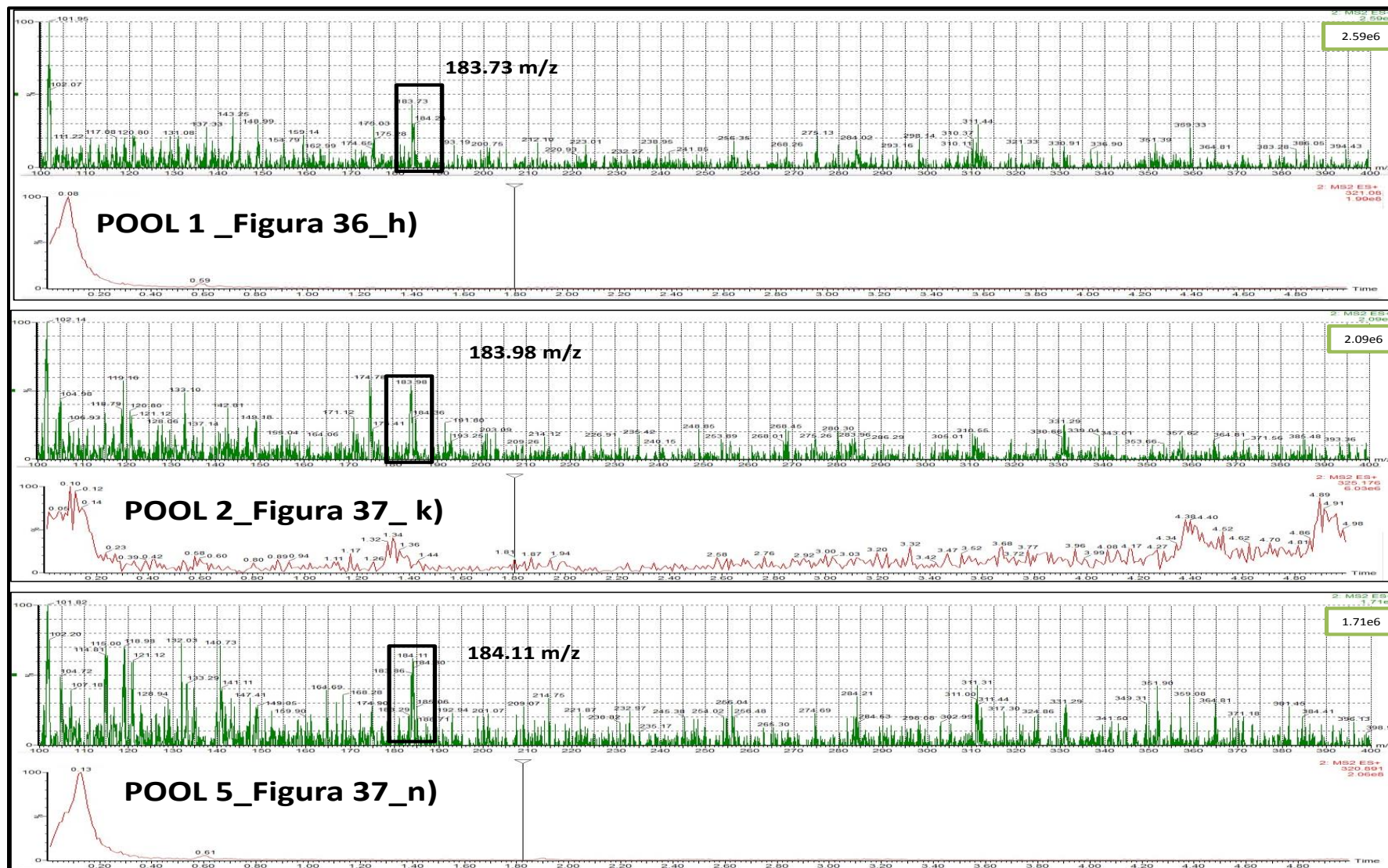


Figura 39. Espectro de masas de blanco de plasma de pool 1, 2,5 infundiendo 3 ng/mL de curcumina a 1.84 minutos en transición de Clopidogrel Bisulfato.

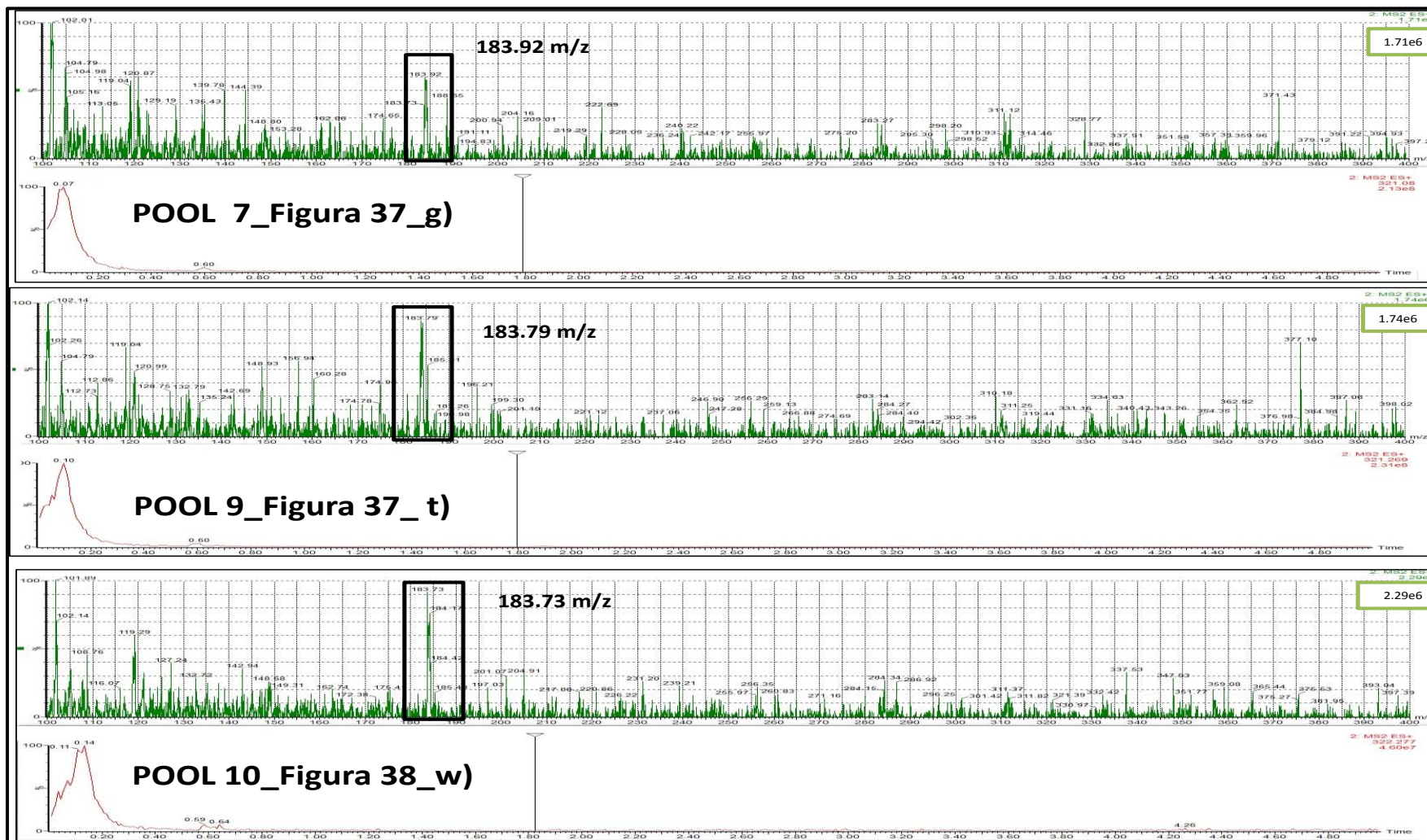


Figura 40. Espectro de masas de blanco de plasma de pool 7, 9,10 infundiendo 3 ng/mL de curcumina a 1.84 minutos en transición de Clopidogrel Bisulfato

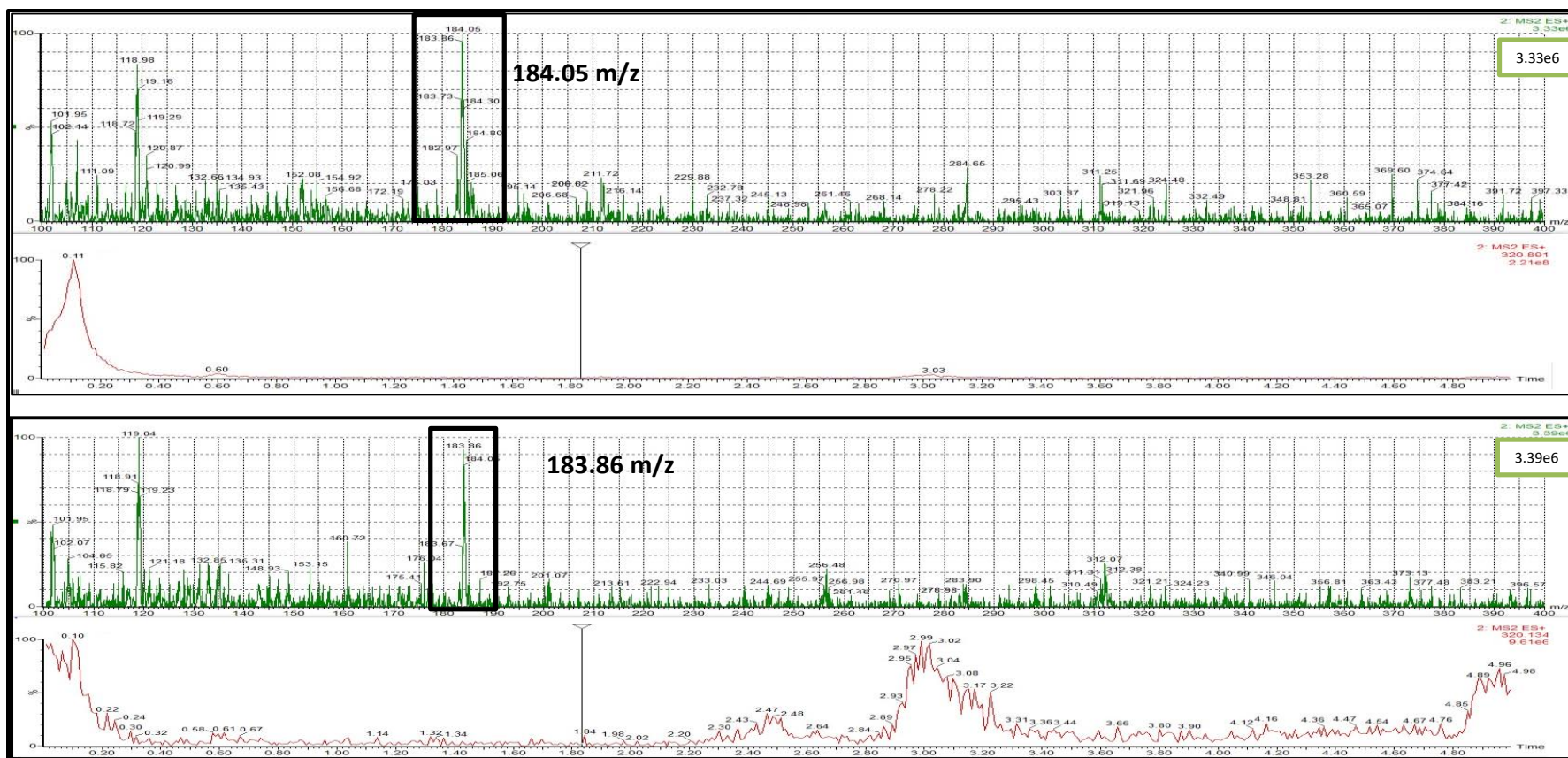


Figura 41. Espectro de masas de blanco de plasma de pool 11,12 infundiendo 3 ng/mL de curcumina a 1.84 minutos en transición de Clopidogrel Bisulfato.

En la figura 36-38 se observan los cromatogramas de todos los pools. En la transición de curcumina e infundiendo curcumina a 3 ng/mL, no se observa ninguna inflexión ni positiva ni negativa en la línea base. Caso contrario en la transición de clopidogrel bisulfato en el panel h-dd de la figura 36-38 se visualiza un pico en el tiempo de retención de clopidogrel bisulfato, en las figuras se observa el pico y la integración del mismo.

Comparando la respuesta del estándar interno (área) con la obtenida en estos cromatogramas no sobrepasa el 5% que establece la norma. Con anterioridad se mostraron los espectros de masas de muestras hemolizadas que relacionan la intensidad del ion 184 m/z con el grado de hemólisis, por esta razón se realizó un espectro de masas a todos los pools, para establecer si existe alguna relación con sexo o edad del sujeto de investigación.

Los espectros de masas se observan en la figura 39 a 41, en todos los espectros el ion de mayor intensidad es 183 m/z en algunos es 184, este ion coincide con las muestra de EDTA, heparina y hemolizadas, en cuanto a las muestras de plasma de sexo y edad no existe una relación con la intensidad del ion.

En los pools 10, 11 y 12 que se clasificaron por edad del sujeto de investigación, se nota una ligera relación entre la edad y la intensidad del ion pero se debe considerar que algunas de las muestras tenían una ligera hemolisis, por lo tanto la presencia de este ion no debe atribuirse a la edad. Para afirmar o descartar esta relación es necesario realizar el mismo proceso pero sin presencia de hemólisis.

XII.III.III.I. EFECTO MATRIZ SEGÚN NOM 177

Tabla 46. Efecto matriz del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Concentración nominal curcumina (ng/mL)	Respuesta en plasma de curcumina	Respuesta en solución de curcumina	Respuesta en plasma de Clopidogrel bisulfato	Respuesta en solución de Clopidogrel bisulfato	FMN
30.03	13123.00	13889.00	37892.00	44092.00	1.10
30.03	11322.00	14446.00	38131.00	42078.00	0.86
30.03	11810.00	14778.00	37909.00	41705.00	0.88
Promedio	12085.00	14371.00	37977.33	42625.00	0.95
Desv.	931.46	449.22	133.35	1284.08	0.13
C.V	7.71	3.13	0.35	3.01	13.87
90.09	38561.00	40500.00	38463.00	42686.00	1.06
90.09	36164.00	45660.00	35808.00	43495.00	0.96
90.09	38499.00	46794.00	35892.00	43356.00	0.99
Promedio	37741.33	44318.00	36721.00	43179.00	1.00
Desv.	1366.36	3354.75	1509.20	432.57	0.05
C.V	3.62	7.57	4.11	1.00	4.79

Concentración nominal curcumina (ng/mL)	Respuesta en plasma de curcumina	Respuesta en solución de curcumina	Respuesta en plasma de Clopidogrel bisulfato	Respuesta en solución de Clopidogrel bisulfato	FMN
150.15	64620.00	70287.00	38033.00	41628.00	1.01
150.15	56820.00	72701.00	36395.00	40886.00	0.88
150.15	71292.00	75152.00	42674.00	42269.00	0.94
Promedio	64244.00	72713.33	39034.00	41594.33	0.94
Desv.	7243.32	2432.52	3256.99	692.11	0.06
C.V	11.27	3.35	8.34	1.66	6.82

En los tres niveles de concentración el coeficiente de variación es inferior al 15% demostrando que no existe efecto matriz y por lo tanto la ionización de curcumina no se afectará por las sustancias que constituyen al plasma de perro.

XI.II.XIII.IV. EFECTO DE ACARREO

Asimismo los resultados de la tabla 47 establecen que no existe efecto de acarreo debido a que la respuesta de clopidogrel es inferior al 5% con áreas menores a 6 del mismo modo para curcumina con áreas no mayores a 41 y que por lo tanto no superar el 20% de la respuesta que equivale a 379.

Tabla 47. Efecto de acarreo del método analítico para la cuantificación de curcumina en plasma de perro.

Muestra	Area de curcumina	Area de Clopidogrel Bisulfato	Concentración de curcumina
BLANCO 1	5.00	3	0
BLANCO 1	41.00	4	0
BLANCO 3	0.00	6	0
100 ng/mL de curcumina	65164.00	54051	98.1
BLANCO 4	9.00	6	0
BLANCO 5	7.00	6	0
5% de Area de clopidogrel bisulfato= 2476.1			
20% Area de límite de Cuantificación de curcumina = 379			

XI.II.XIII.V. APLICACIÓN AL METODO DE ANÁLISIS

Como se observa en la figura 42 después de administrar la formulación a), la cantidad determinada de curcumina fue a nivel de trazas y esto muy probablemente a la dosis administrada, debido a que la cantidad de cúrcuma encapsulada era de 1mg/mL. En la formulación b) no presento ni trazas de cúrcuma, por esta razón se decidió encapsular cúrcuma y administrar por vía oral a una dosis de 30 mg/Kg de peso.

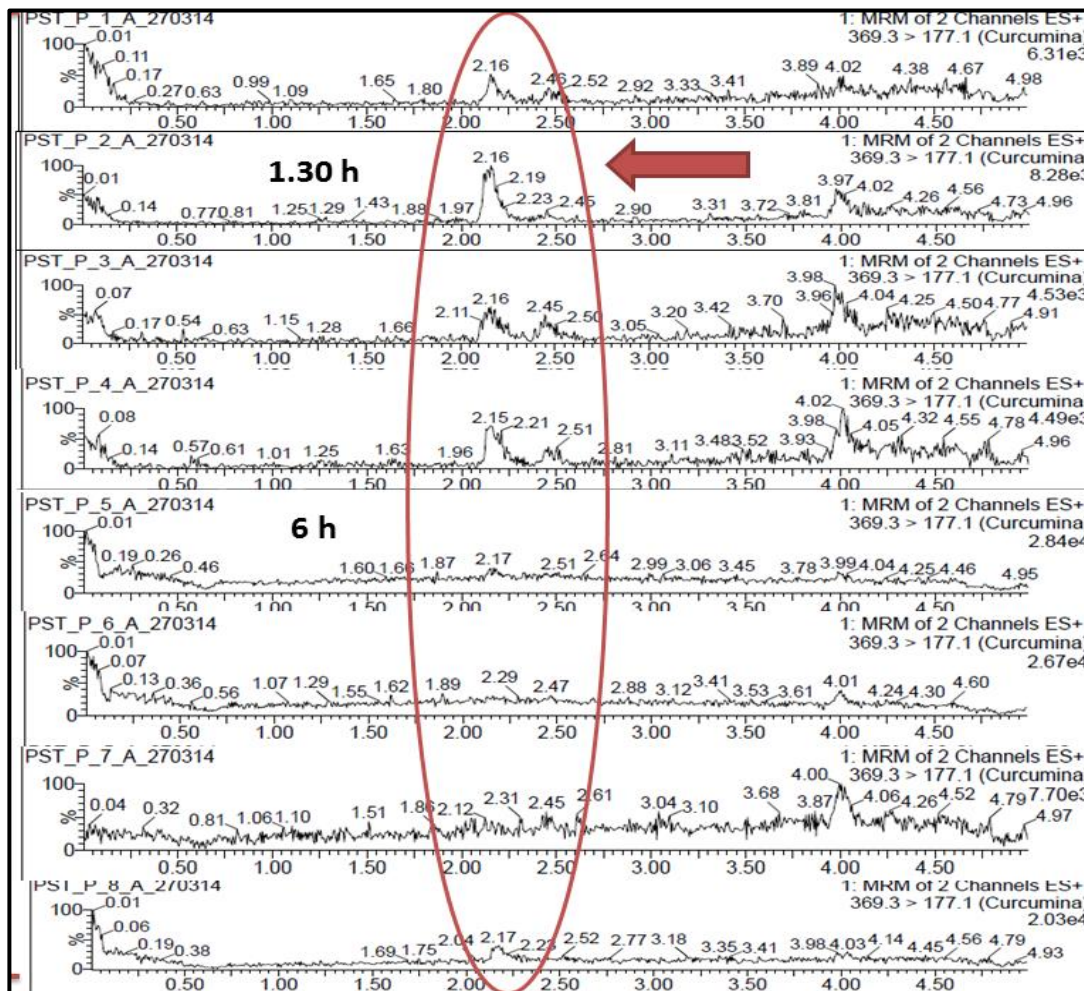


Figura 42. Cromatogramas de estudio piloto de nanocápsulas mucoadhesivas.

Tabla 48. Información de sujetos de investigación

SUJETO DE INVESTIGACIÓN	Sexo	Edad	Peso (kg)	Raza
A	Hembra	12 años	6.8	Caniche
B	Hembra	4 años	21.3	Mestizo
C	Macho	9 meses	3.5	Chihuahueño

Tabla 49. Concentración de curcumina en plasma en función del tiempo.

Tiempos de muestreo(min)	Concentración de curcumina en plasma después de administrar 30 mg/Kg de peso de curcumina contenida en cápsulas.		
	SUJETO DE INVESTIGACION		
	A	B	C
0	0.0	0.0	0.0
30	6.2	4.5	2.9
60	9.0	2.6	6.1
90	1.4	1.6	2.0
120	1.7	1.3	1.5
150	2.7	2.2	2.2
180	1.4	1.5	2.4
210	1.1	3.6	2.9
240	0.8	2.0	1.7
300	1.6	4.8	2.0

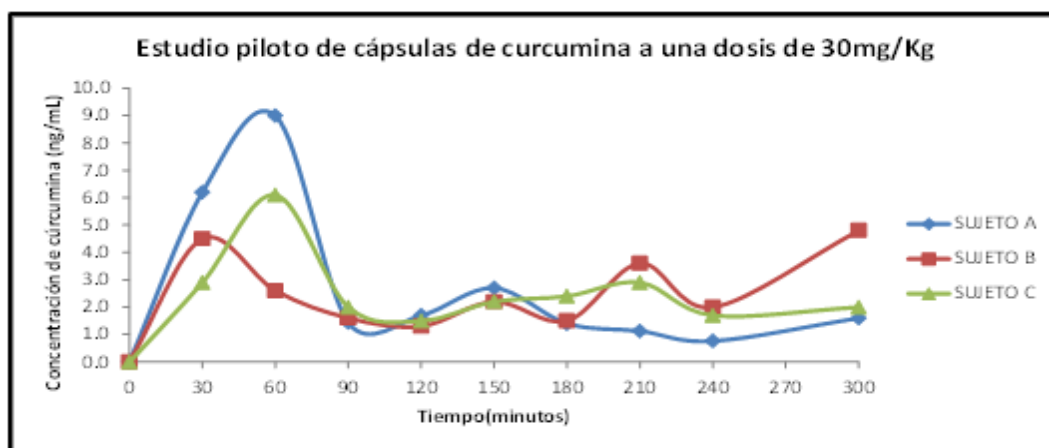


Figura 43. Estudio piloto de cápsulas de curcumina.

Al analizar las muestras de los sujetos de investigación se obtuvieron los valores individuales de concentración plasmática a los tiempos de muestreo establecidos, estos se visualizan en la tabla 49. Sin embargo en algunos tiempos de muestreo los niveles de concentración en plasma son inferiores al límite de cuantificación de la curcumina. De acuerdo con los resultados, se visualiza que es necesario prolongar los tiempos de muestreo, para caracterizar de forma correcta la biodisponibilidad de curcumina en perros.

La concentración máxima de curcumina fue 9, 4.5, y 6 ng/mL respectivamente, los niveles plasmáticos de curcumina son inferiores a 10 ng/mL como ya se sabe la curcumina metaboliza rápidamente y posee una eliminación sistemática rápida, lo que genera que la biodisponibilidad se reduzca.

XII. - CONCLUSIONES

- ❖ Se demostró que el método analítico para evaluar la biodisponibilidad en perros de formas farmacéuticas orales es lineal y exacto en el rango de concentración de 3-160 ng/mL, con un por ciento de recobro promedio de 90%. Además el método es selectivo debido a que no existe interferencias del plasma, ni de otros fármacos que pueden administrarse junto con la curcumina tales como cafeína, trimetoprim, salbutamol, maleato de clorfenamina, paracetamol, tramadol, clorhidrato de propafenona, ni en presencia de anticoagulantes como heparina o EDTA que se encuentran en los tubos de tomas de muestra de la sangre,
- ❖ Se demostró que la hemólisis de las muestras afecta la cuantificación de cúrcumina en plasma.
- ❖ Se realizó el estudio piloto administrando capsulas de curcumina a una dosis de 30mg/kg de peso, encontrándose concentraciones de curcumina en plasma inferiores a 10 ng/mL.
- ❖ El pretratamiento de la muestra bajo las condiciones propuestas en el presente trabajo representa una alternativa para evaluar la biodisponibilidad de formas de dosificación orales de cúrcumina.
- ❖ Se validó un método bioanalítico demostrando que es sensible, preciso, exacto, lineal, específico, rápido y relativamente económico comparado con extracción en fase sólida.

XIV. - PERSPECTIVAS

- ❖ Llevar a cabo estudios en otro tipo de formas farmacéuticas que contengan curcumina como, liposomas, microemulsión, complejación con fosfolípidos y ciclodextrinas, dispersiones que mejoren la biodisponibilidad de curcumina.
- ❖ Realizar estudio de biodisponibilidad de diferentes formas farmacéuticas de cúrcumina en perros.
- ❖ El método desarrollado y validado puede emplearse para evaluar tratamiento con cúrcumina en perros con osteoartritis con el fin de seleccionar el tratamiento más efectivo.

XIII. – REFERENCIAS

- [1] M. Mesa, M. Ramírez-Tortosa, Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides, *Ars Pharm.* 41 (2000) 307–321. <http://digibug.ugr.es/handle/10481/28322> (accessed September 03, 2014).
- [2] P. Basnet, N. Skalko-Basnet, Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment., *Molecules.* 16 (2011) 4567–98. doi:10.3390/molecules16064567.
- [3] S. V Jovanovic, S. Steenken, C.W. Boone, M.G. Simic, H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin, *Am. Chem. Soc.* (1999) 9677–9681.
- [4] H.H.T. and J. Karlsen, Studies on Curcumin and Curcuminoids VI. Kinetics of Curcumin Degradation in Aqueous Solution, (1985) 7–9.
- [5] R.A. Sharma, H.R. Mclelland, K.A. Hill, C.R. Ireson, S.A. Euden, M.M. Manson, et al., Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Study of Oral Curcuma Extract in Patients with Colorectal Cancer Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Study of Oral Curcuma Extract in Patients with Colorectal Cancer I, *Clin Cancer Res.* (2001) 1894–1900.
- [6] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R. a Newman, B.B. Aggarwal, Bioavailability of curcumin: problems and promises., *Mol. Pharm.* 4 (2007) 807–18. doi:10.1021/mp700113r.
- [7] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R. a Newman, B.B. Aggarwal, Bioavailability of curcumin: problems and promises., *Mol. Pharm.* 4 (2007) 807–18. doi:10.1021/mp700113r.
- [8] V. Kakkar, S. Singh, D. Singla, S. Sahwney, A.S. Chauhan, G. Singh, et al., Pharmacokinetic applicability of a validated liquid chromatography tandem mass spectroscopy method for orally administered curcumin loaded solid lipid nanoparticles to rats., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 3427–31. doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.017.
- [9] R. Li, X. Qiao, Q. Li, R. He, M. Ye, C. Xiang, et al., Metabolic and pharmacokinetic studies of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in mice tumor after intragastric administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 2751–8. doi:10.1016/j.jchromb.2011.07.042.
- [10] P.S. Shoba, G; Joy, D; Joseph, T; Majeed, M; Rajendran, R; Srinivas, Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers., *Planta Med.* (1998) 353–6.
- [11] S. Prasad, A.K. Tyagi, B.B. Aggarwal, Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice., *Cancer Res. Treat.* 46 (2014) 2–18. doi:10.4143/crt.2014.46.1.2.
- [12] M. Pan, T. Huang, J. Lin, Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice abstract ;, *druG Metab. Dispos.* 27 (1999) 486–494.
- [13] S. Perkins, R.D. Verschoyle, K. Hill, I. Parveen, M.D. Threadgill, R.A. Sharma, et al., Chemopreventive Efficacy and Pharmacokinetics of Curcumin in the Min / + Mouse , a Model of Familial Adenomatous Polyposis Chemopreventive Efficacy and Pharmacokinetics of Curcumin in the Min / 2 Mouse , a Model of Familial Adenomatous Polyposis 1, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2002) 535–540.
- [14] D. Suresh, K. Srinivasan, Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats., *Indian J. Med. Res.* 131 (2010) 682–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516541>.
- [15] T.H. Marczylo, R.D. Verschoyle, D.N. Cooke, P. Morazzoni, W.P. Steward, A.J. Gescher, Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 171–7. doi:10.1007/s00280-006-0355-x.
- [16] K. Maiti, K. Mukherjee, A. Gantait, B.P. Saha, P.K. Mukherjee, Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats., *Int. J. Pharm.* 330 (2007) 155–63. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.09.025.
- [17] K.-Y. Yang, L.-C. Lin, T.-Y. Tseng, S.-C. Wang, T.-H. Tsai, Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 853 (2007) 183–9. doi:10.1016/j.jchromb.2007.03.010.
- [18] C.Y. Cheng, A. L.; Hsu, C. H.; Lin, J. K.; Hsu, M. M.; Ho, Y. F.; Shen, T. S.; Ko, J. Y.; Lin, J. T.; Lin, B. R.; Ming-Shiang, W; Yu, H. S.; Jee, S. H.; Chen, G. S.; Chen, T. M.; Chen, C. A.; Lai, M. K.;

- Pu, Y. S.; Pan, M. H.; Wang, Y. J.; Tsai, C. C.; Hsieh, Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions, *Anticancer Res.* 21 (2001) 2895–900.
- [19] C.D. Lao, M.T. Ruffin, D. Normolle, D.D. Heath, S.I. Murray, J.M. Bailey, et al., Dose escalation of a curcuminoid formulation., *BMC Complement. Altern. Med.* 6 (2006) 10. doi:10.1186/1472-6882-6-10.
- [20] R.A. Sharma, S.A. Euden, S.L. Platton, D.N. Cooke, A. Shafayat, H.R. Hewitt, et al., Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance, (2004) 6847–6854.
- [21] J.L. Arbiser, N. Klauber, R. Rohan, R. Van Leeuwen, M. Huang, C. Fisher, et al., Curcumin Is In Vivo Inhibitor of, (1998) 376–383.
- [22] M. Pan, T. Huang, J. Lin, BIOTRANSFORMATION OF CURCUMIN THROUGH REDUCTION AND GLUCURONIDATION IN MICE ABSTRACT :, *Drug Metab. Dispos.* 27 (1999) 486–494.
- [23] H. Sasaki, Y. Sunagawa, K. Takahashi, A. Imaizumi, H. Fukuda, T. Hashimoto, et al., Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability., *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 660–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532153>.
- [24] V. Kakkar, S. Singh, D. Singla, S. Sahwney, A.S. Chauhan, G. Singh, et al., Pharmacokinetic applicability of a validated liquid chromatography tandem mass spectroscopy method for orally administered curcumin loaded solid lipid nanoparticles to rats., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 3427–31. doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.017.
- [25] F. Akhtar, M.M.A. Rizvi, S.K. Kar, Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii* infected mice., *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 310–20. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.009.
- [26] K. Hao, X.P. Zhao, X.Q. Liu, G.J. Wang, LC Determination of Curcumin in Dog Plasma for a Pharmacokinetic Study, *Chromatographia.* 64 (2006) 531–535. doi:10.1365/s10337-006-0047-z.
- [27] L. Helson, G. Bolger, M. Majeed, B. Vcelar, K. Pucaj, D. Matabudul, Infusion pharmacokinetics of Lipocurc™ (liposomal curcumin) and its metabolite tetrahydrocurcumin in Beagle dogs., *Anticancer Res.* 32 (2012) 4365–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060560>.
- [28] C.V.M. Alberto, Desarrollo de un nanosistema mucoadhesivo para la administración oral de agentes antioxidantes en rumiantes, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [29] H.P. Daniel, Desarrollo de una formulación de nanocápsulas de curcumina en suspensión para uso veterinario., Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- [30] A. Bagchi, Extraction of Curcumin, 1 (2012) 1–16.
- [31] A. Barzegar, A. a Moosavi-Movahedi, Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin., *PLoS One.* 6 (2011) e26012. doi:10.1371/journal.pone.0026012.
- [32] Y.J. Wang, M.H. Pan, a L. Cheng, L.I. Lin, Y.S. Ho, C.Y. Hsieh, et al., Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1867–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278892>.
- [33] K. Shenghani, P. Duvvuri, DEGRADATION STUDIES OF CURCUMIN, *Int. J. Pharm. Rev. Res.* 3 (2013) 50–55.
- [34] H.H. Tonnesen, J. Karlsen, Studies on Curcumin and Curcuminoids V. Alkaline Degradation of Curcumin, 180 (1985) 132–134. doi:10.1007/BF01042637.
- [35] M. Bernabé-Pineda, M.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, E. González-Vergara, A. Rojas-Hernández, Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 60 (2004) 1091–7. doi:10.1016/S1386-1425(03)00342-1.
- [36] L. Shen, H. Ji, The pharmacology of curcumin: is it the degradation products, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 138–144. doi:10.1016/j.molmed.2012.01.004.
- [37] V.P. Menon, A.R. Sudheer, Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin., 2007. doi:10.1007/978-0-387-46401-5_3.
- [38] A. Barik, B. Mishra, L. Shen, H. Mohan, R.M. Kadam, S. Dutta, et al., Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions., *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 811–22. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.005.
- [39] L. Shen, H.-F. Ji, Theoretical study on physicochemical properties of curcumin., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 67 (2007) 619–23. doi:10.1016/j.saa.2006.08.018.

- [40] J. Kanski, M. Aksenova, A. Stoyanova, D.A. Butterfield, Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies., *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 273–281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015157>.
- [41] M. Thiyagarajan, S.S. Sharma, Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats, *Life Sci.* 74 (2004) 969–985. doi:10.1016/j.lfs.2003.06.042.
- [42] M. Makni, Y. Chtourou, H. Fetoui, E.M. Garoui, T. Boudawara, N. Zeghal, Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats., *Eur. J. Pharmacol.* 668 (2011) 133–9. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.001.
- [43] B.B. Aggarwal, Y.-J. Surh, S. Shishodia, *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 2007.
- [44] Y. Murakami, A. Hirata, S. Ito, M. Shoji, S. Tanaka, T. Yasui, et al., Re-evaluation of cyclooxygenase-2-inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide., *Anticancer Res.* 27 (2007) 801–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465205>.
- [45] M. Makni, Y. Chtourou, M. Barkallah, H. Fetoui, Protective effect of vanillin against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced oxidative brain injury in rats., *Toxicol. Ind. Health.* 28 (2012) 655–62. doi:10.1177/0748233711420472.
- [46] L. Baum, A. Ng, Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models, 6 (2004) 367–377.
- [47] T. Hamaguchi, K. Ono, M. Yamada, REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease., *CNS Neurosci. Ther.* 16 (2010) 285–97. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00147.x.
- [48] J. Kim, H.J. Lee, K.W. Lee, Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease., *J. Neurochem.* 112 (2010) 1415–30. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06562.x.
- [49] R. Sultana, A. Ravagna, H. Mohammad-Abdul, V. Calabrese, D.A. Butterfield, Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity., *J. Neurochem.* 92 (2005) 749–58. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02899.x.
- [50] J.J. Yan, J.Y. Cho, H.S. Kim, K.L. Kim, J.S. Jung, S.O. Huh, et al., Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid., *Br. J. Pharmacol.* 133 (2001) 89–96. doi:10.1038/sj.bjp.0704047.
- [51] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, Curcumin Has Potent Anti-Amyloidogenic Effects for Alzheimer's β -Amyloid Fibrils In Vitro, *J. Neurosci. Res.* 75742–750. 750 (2004) 742–750.
- [52] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, et al., Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5892–901. doi:10.1074/jbc.M404751200.
- [53] K. Ono, M. Hirohata, M. Yamada, Ferulic acid destabilizes preformed, / *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 444–449. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.148.
- [54] T. Ahmed, A.-H. Gilani, Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91 (2009) 554–9. doi:10.1016/j.pbb.2008.09.010.
- [55] S.K. Sandur, H. Ichikawa, M.K. Pandey, A.B. Kunnumakkara, B. Sung, G. Sethi, et al., Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane), *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 568–80. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.009.
- [56] M. Srinivasan, A.R. Sudheer, V.P. Menon, Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property, *J.Clin.Biochem.Nutr.* (2007) 92–100.
- [57] M.C. Leu, T.H. and Maa, The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr., Med. Chem. Anticancer Agents.* 2 (2002) 357–370.
- [58] V.B. Patel, S. Misra, B.B. Patel, A.P.N. Majumdar, Colorectal cancer: chemopreventive role of curcumin and resveratrol., *Nutr. Cancer.* 62 (2010) 958–67. doi:10.1080/01635581.2010.510259.
- [59] K. Lirdprapamongkol, H. Sakurai, S. Suzuki, K. Koizumi, O. Prangsaengtong, A. Viriyaroj, et al., Vanillin enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells through inhibition of NF-kappaB activation., *In Vivo.* 24 (2010) 501–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668316>.

- [60] Y. Katanasaka, Y. Sunagawa, K. Hasegawa, T. Morimoto, Pathophysiological and Pharmacological Research in Cardiology Application of Curcumin to Heart Failure Therapy by Targeting Transcriptional Pathway in Cardiomyocytes, 36 (2013) 13–17.
- [61] S.Z. Moghadamtousi, H.A. Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, K. Zandi, A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin, 2014 (2014).
- [62] A. Shehzad, T. Ha, F. Subhan, Y.S. Lee, New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases., *Eur. J. Nutr.* 50 (2011) 151–61. doi:10.1007/s00394-011-0188-1.
- [63] C.J. Lee, J.H. Lee, J.H. Seok, G.M. Hur, Y.C. Park, I.C. Seol, et al., Effects of baicalein, berberine, curcumin and hesperidin on mucin release from airway goblet cells., *Planta Med.* 69 (2003) 523–6. doi:10.1055/s-2003-40655.
- [64] a Rasyid, a Lelo, The effect of curcumin and placebo on human gall-bladder function: an ultrasound study., *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13 (1999) 245–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102956>.
- [65] C.N. Hussain MS1, Biliary proteins from hepatic bile of rats fed curcumin or capsaicin inhibit cholesterol crystal nucleation in supersaturated model bile, *Indian J Biochem Biophys.* 5 (1994) 407–12.
- [66] C. Zazueta, E. Tapia, Curcumin Attenuates Cr (VI)-Induced Ascites and Changes in the Activity of Aconitase and F 1 F 0 ATPase and the ATP Content in Rat Liver Mitochondria, 00 (2014) 1–6. doi:10.1002/jbt.
- [67] S.S. Agarwal KA, Tripathi CD, Agarwal BB, Efficacy of turmeric (curcumin) in pain and postoperative fatigue after laparoscopic cholecystectomy: a double-blind, randomized placebo-controlled study., *Surg Endosc.* 25 (2011) 3805– 10.
- [68] M.A. De Paz-campos, A. Evangelina, M.I. Ortiz, G. Casta, Evidence for the Participation of ATP-sensitive Potassium Channels in the Antinociceptive Effect of Curcumin, 25 (2012) 221–227.
- [69] M. a. De Paz-Campos, M.I. Ortiz, A.E. Chávez Piña, L. Zazueta-Beltrán, G. Castañeda-Hernández, Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats, *Phytomedicine.* 21 (2014) 1543–1548. doi:10.1016/j.phymed.2014.06.015.
- [70] V.K.P.D.W.T.M.B.P.L.C.C.J.S.K. Tantayakom7, S. Laongpech8, Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis : a multicenter study, *Clin. Interv. Aging.* (2014) 451–458.
- [71] A. Shakibaei, M., John, T., Schulze-Tanzil, G., Lehmann, I., Mobasheri, Suppression of NF-B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: implications for the treatment of osteoarthritis. , *Biochem. Farm.* 73 (2007) 1434–1445.
- [72] K.J. Snyder L., Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2da. Edici, 1979.
- [73] A.G. Pérez/, Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos en leche y tejido muscular de origen animal, Universidad Politécnica de Valencia, 2012.
- [74] W. Corporation, Detector TQ de Waters Guía rápida, 2009.
- [75] M. Carmen, M. Gómez, M.B. González, Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores, n.d.
- [76] N. Suwannateep, W. Banlunara, S.P. Wanichwecharungruang, K. Chiablaem, K. Lirdprapamongkol, J. Svasti, Mucoadhesive curcumin nanospheres: biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation., *J. Control. Release.* 151 (2011) 176–82. doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.011.
- [77] B. Avula, Y.-H. Wang, I. a. Khan, Quantitative Determination of Curcuminoids from the Roots of Curcuma longa, Curcuma species and Dietary Supplements Using an UPLC-UV-MS Method, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 03 (2012) 3–8. doi:10.4172/2157-7064.1000120.
- [78] Y.B. Pawar, G. Shete, D. Popat, A.K. Bansal, Phase behavior and oral bioavailability of amorphous Curcumin., *Eur. J. Pharm. Sci.* 47 (2012) 56–64. doi:10.1016/j.ejps.2012.05.003.
- [79] K.-Y. Yang, L.-C. Lin, T.-Y. Tseng, S.-C. Wang, T.-H. Tsai, Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from Curcuma longa by LC-MS/MS., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 853 (2007) 183–9. doi:10.1016/j.jchromb.2007.03.010.
- [80] R.A. Sharma, S.A. Euden, S.L. Platton, D.N. Cooke, A. Shafayat, H.R. Hewitt, et al., Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 6847–6854.

- [81] J. Cheng, K. Weijun, L. Yun, W. Jiabo, W. Haitao, L. Qingmiao, et al., Development and validation of UPLC method for quality control of *Curcuma longa* Linn.: Fast simultaneous quantitation of three curcuminoids., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 43–9. doi:10.1016/j.jpba.2010.03.021.
- [82] T.H. Marczylo, W.P. Steward, A.J. Gescher, Rapid analysis of curcumin and curcumin metabolites in rat biomatrices using a novel ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method., *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 797–803. doi:10.1021/jf803038f.
- [83] X. Wang, Q. Zhang, J. Yang, R. Zhu, J. Zhang, Validated HPLC – MS / MS Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Piperine in Human Plasma, *Trop. J. Pharm. Res.* 11 (2012) 621–629.
- [84] L.S. Buttgerit, F., Burmester, G.R., Simon, Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase- 2-specific inhibitors., *Am. J. Med.* 110 (3A) (2001) 13S–19S.
- [85] M. Henrotin, Y., Sanchez, C., Balligand, Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: present and future perspectives, *Vet. J.* 170 (2005) 113–123.
- [86] M.N.A. Sreejayan, N., Rao, Free radical scavenging by curcuminoids., *Arzneim. Forsch. – Drug Res.* 46 (1996) 169–171.
- [87] M.N.A. Sreejayan, N., Rao, Nitric oxide scavenging by curcuminoids., *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 105–107.
- [88] W. Tiyaboonchai, W. Tungpradit, P. Plianbangchang, Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles., *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 299–306. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.043.
- [89] Y. Chang, C. Chen, H.A.O. Wu, L. Du, R. Yi, X.U. Jing, et al., HIGH SENSITIVITY METHOD FOR DETERMINATION OF TRACE CURCUMIN IN THE AQUEOUS PHASE, *J. Chil. Chem. Soc.* 1 (2014) 30–32.
- [90] Z. Ma, A. Shayeganpour, D.R. Brocks, A. Lavasanifar, J. Samuel, High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma : application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin, *Biomed. Chromatogr.* 552 (2007) 546–552. doi:10.1002/bmc.
- [91] J.M. Hernández, ESPECTROMETRÍA DE MASAS. APLICACIONES CLÍNICAS, *Educ. Contin. EN EL Lab. CLÍNICO.* (2007) 19–30.
- [92] Waters, ACQUITY UPLC™ Columns, in: 2005: p. 11.
- [93] E. de H. and V. Stroobant, *Mass Spectrometry .Principles and Applications*, 2014. doi:10.1002/9783527654703.ch11.
- [94] N.K. Patel, G. Subbaiah, H. Shah, M. Kundlik, P.S. Shrivastav, Rapid LC-ESI-MS-MS method for the simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma., *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 867–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007493>.
- [95] N.V. de Moraes, G.R. Lauretti, M.N. Napolitano, N.R. Santos, A.L.P.C. Godoy, V.L. Lanchote, Enantioselective analysis of unbound tramadol, O-desmethyltramadol and N-desmethyltramadol in plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS: application to clinical pharmacokinetics., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 880 (2012) 140–7. doi:10.1016/j.jchromb.2011.11.033.
- [96] B.N. Patel, N. Sharma, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC-MS/MS., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 354–66. doi:10.1016/j.jpba.2008.10.030.
- [97] M.A. Jensen, A.M. Hansen, P. Abrahamsson, A.W. Nørgaard, Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 2527–32. doi:10.1016/j.jchromb.2011.07.005.
- [98] M. Stürtz, A.B. Cerezo, E. Cantos-Villar, M.C. Garcia-Parrilla, Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragaria ananassa*), *Food Chem.* 127 (2011) 1329–1334. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.093.
- [99] H.-G. Lou, H. Yuan, Z.-R. Ruan, B. Jiang, Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine, dextrophan and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 682–8. doi:10.1016/j.jchromb.2010.01.005.
- [100] H.N. Mistri, A.G. Jangid, A. Pudage, A. Shah, P.S. Shrivastav, Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in microgram quantities from low plasma volume by liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry, *Microchem. J.* 94 (2010) 130–138. doi:10.1016/j.microc.2009.10.002.
- [101] J. Wu, C. Ding, Q. Ge, Z. Li, Z. Zhou, X. Zhi, Simultaneous determination of ipratropium and salbutamol in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 3475–83. doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.027.
- [102] L.G. Dodson, R.A. Vogt, J. Marks, C. Reichardt, C.E. Crespo-Hernández, Photophysical and photochemical properties of the pharmaceutical compound salbutamol in aqueous solutions., *Chemosphere*. 83 (2011) 1513–23. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.048.
- [103] E.J. Choi, S.H. Bae, J.B. Park, M.J. Kwon, S.M. Jang, Y.F. Zheng, et al., Simultaneous quantification of caffeine and its three primary metabolites in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *Food Chem.* 141 (2013) 2735–42. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.069.
- [104] S. G.Schulman, Analysis of biological fluids, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2002.
- [105] P.L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods., *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 199–217. doi:10.1002/bmc.1560.
- [106] M. Somma, Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos Sesión n° 4 Extracción y Purificación de ADN, in: *JRC Eur. Comm.*, n.d.
- [107] S.E. and S. SEIFTER, Precipitation Techniques, in: 1990: pp. 285–300.
- [108] S. Zhou, Q. Song, Y. Tang, W. Naidong, Critical Review of Development , Validation , and Transfer for High Throughput Bioanalytical LC-MS / MS Methods, (2005) 3–14.
- [109] Krishnan TR and Ibrahim I., Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples., *J. Pharm. Biomed. Cal Anal.* 12 (1994) 287–294.
- [110] D. Oficial, NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos , in: 2013: pp. 1–63.
- [111] C. Wharf, U. Kingdom, Guideline on the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products Guideline on the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products Table of contents, 44 (2011).
- [112] M. Whitmire, J. Ammerman, P. De Lisio, LC-MS/MS Bioanalysis Method Development, Validation, and Sample Analysis: Points to Consider When Conducting Nonclinical and Clinical Studies in Accordance with Current Regulatory Guidances, *J. Anal. Bioanal. Tech.* 01 (2011) 1–10. doi:10.4172/2155-9872.S4-001.
- [113] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, et al., Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress., *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11303967>.
- [114] J. Zhao, Q. Kan, J. Wen, Y. Li, Y. Sheng, L. Yang, et al., Hemolysis of Blood Samples has no Significant Impact on the Results of Pharmacokinetic Data, 4 (2012) 82–85. doi:10.4172/jbb.1000117.
- [115] B.B. Aggarwal, B. Sung, Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets., *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 85–94. doi:10.1016/j.tips.2008.11.002.

XIV. - ANEXOS

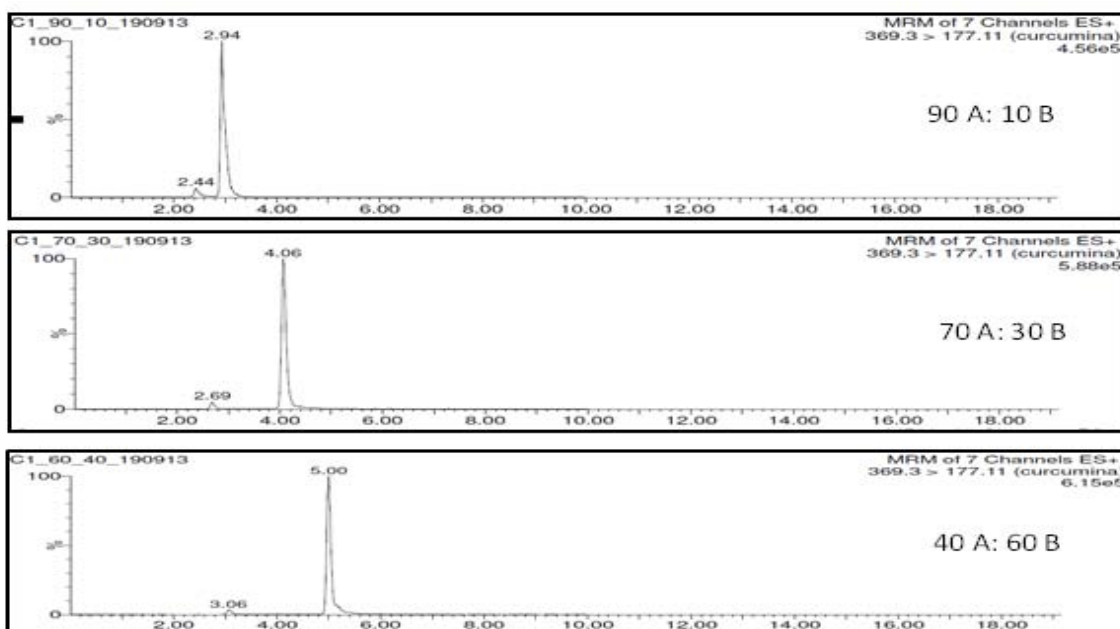


Figura 44. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B y 40A:60B y flujo 0.1 ml/min, columna 1.

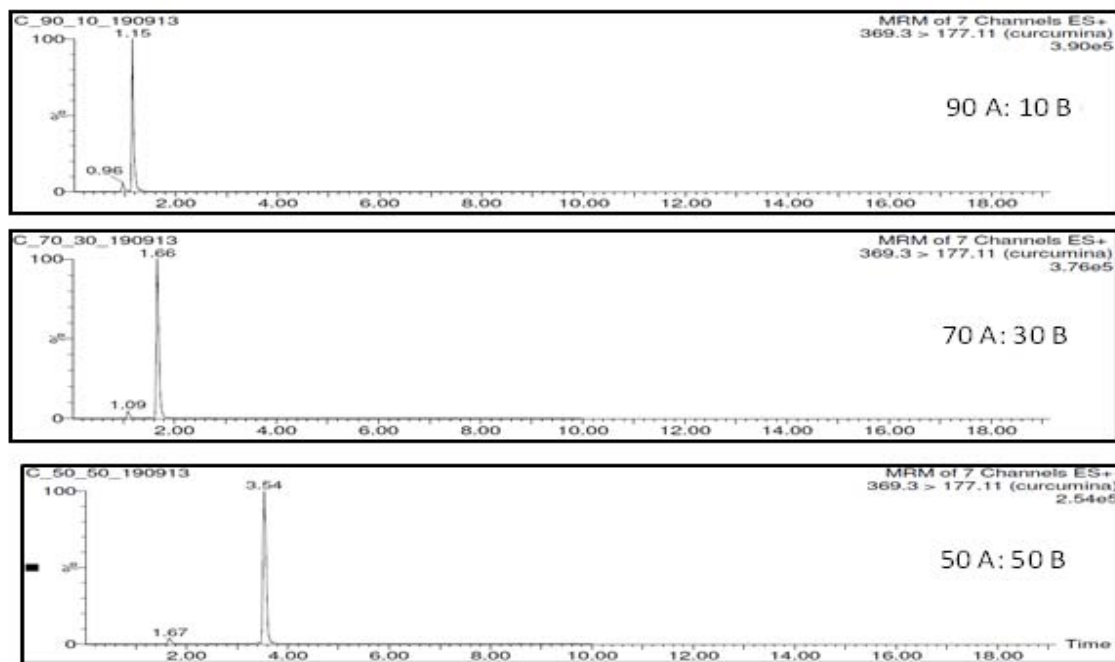


Figura 45. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B y 40A:60B y flujo 0.25 ml/min, columna 1.

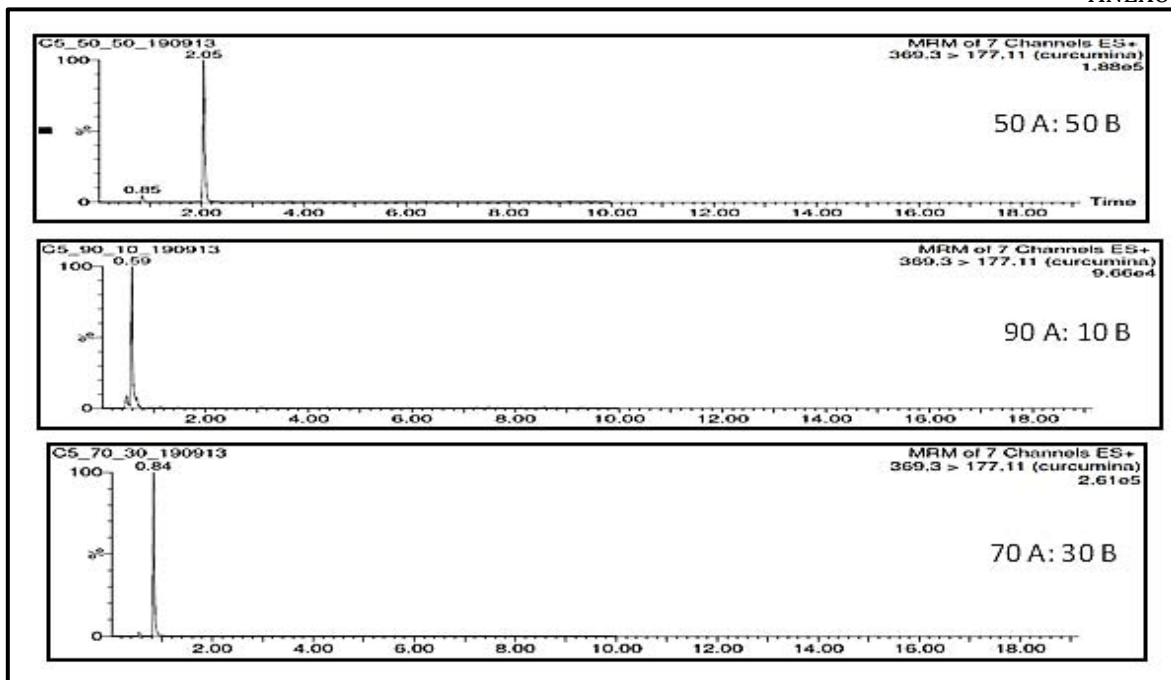


Figura 46. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B y 40A:60B y flujo 0.5 ml/min, columna 1.

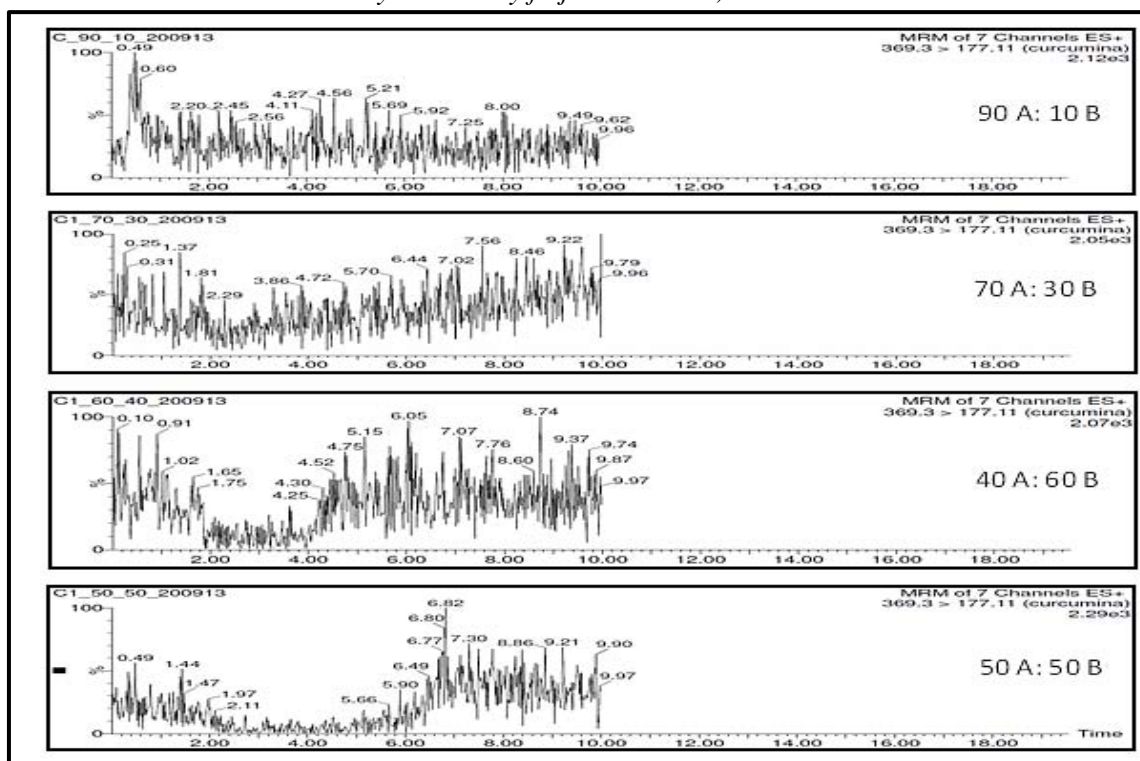


Figura 47. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B, 40A:60B, 50A:50B y flujo 0.1 ml/min, columna 2.

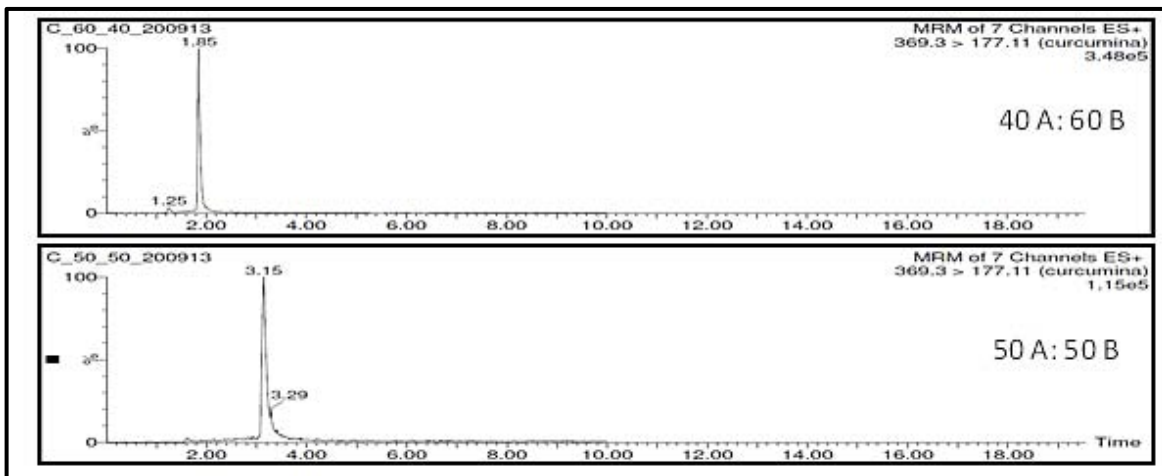


Figura 48. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 40A:60B y 50A:50B y flujo 0.25 ml/min, columna 2.

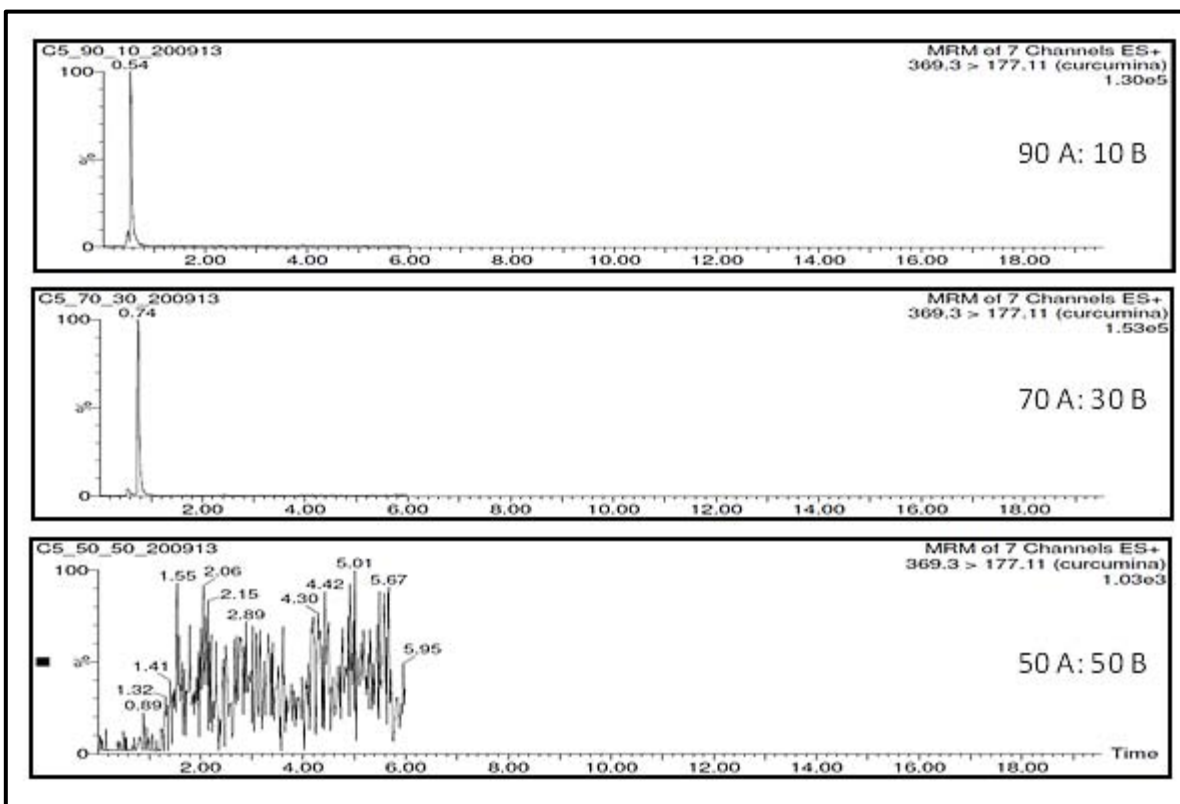


Figura 49. Cromatograma del tiempo de retención de curcumina con proporción 90A:10B, 70A:30B, 50A:50B y flujo 0.5 ml/min, columna 2

Fragmentación del ion molecular de la Clorhidrato de propafenona 342.19m/z

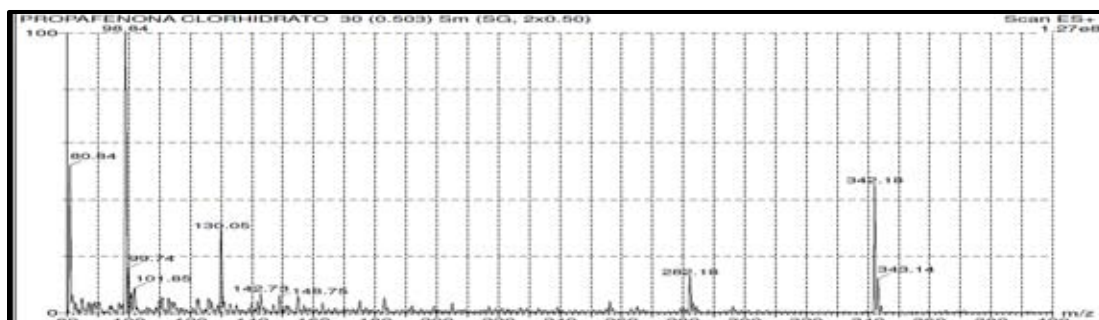


Figura 50. Ion padre de mayor proporción de clorhidrato de propafenona empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

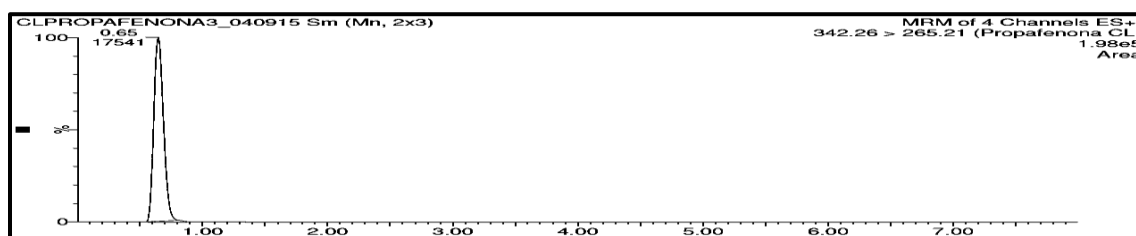


Figura 51. Cromatograma de Clorhidrato de propafenona.

Fragmentación del ion molecular de Tramadol 264.2 m/z

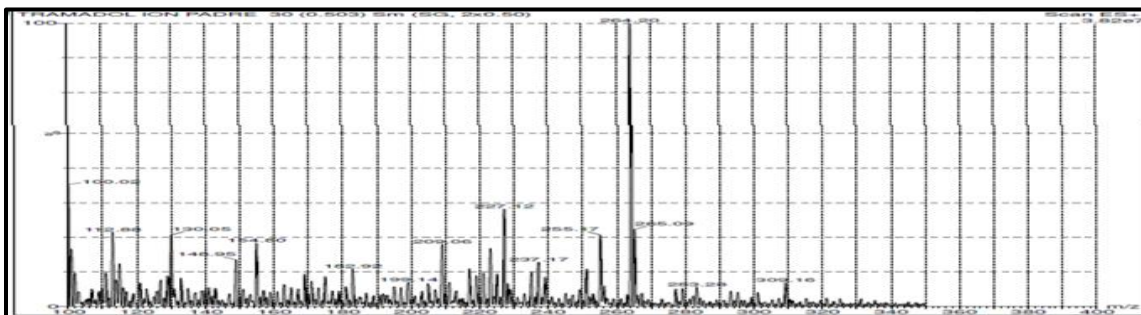


Figura 52. Ion padre de mayor proporción de Tramadol empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

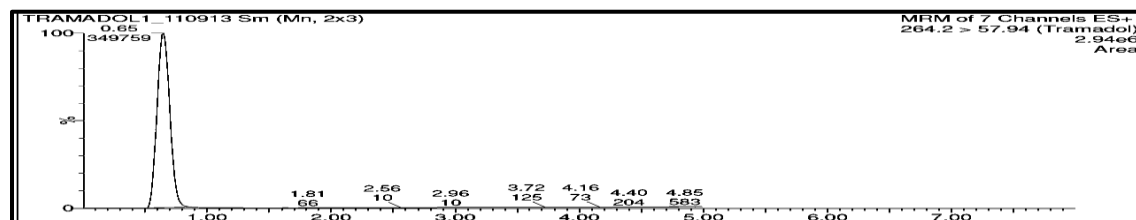


Figura 53. Cromatograma de Tramadol.

Fragmentación del ion molecular de Melatonina 233.11 m/z

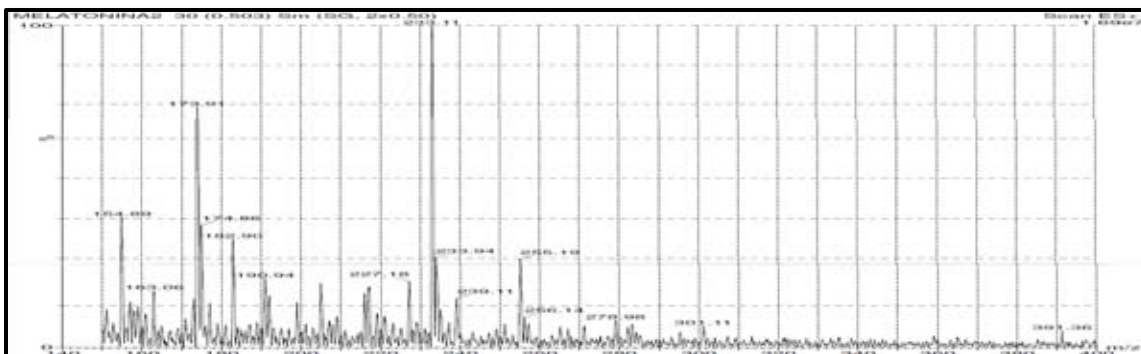


Figura 54. Ion padre de mayor proporción de melatonina empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

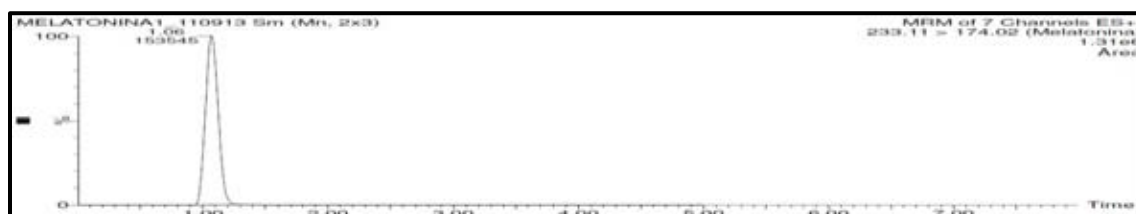


Figura 55. Cromatograma de melatonina.

Fragmentación del ion molecular de Trimetropim 291.2-123.1 m/z

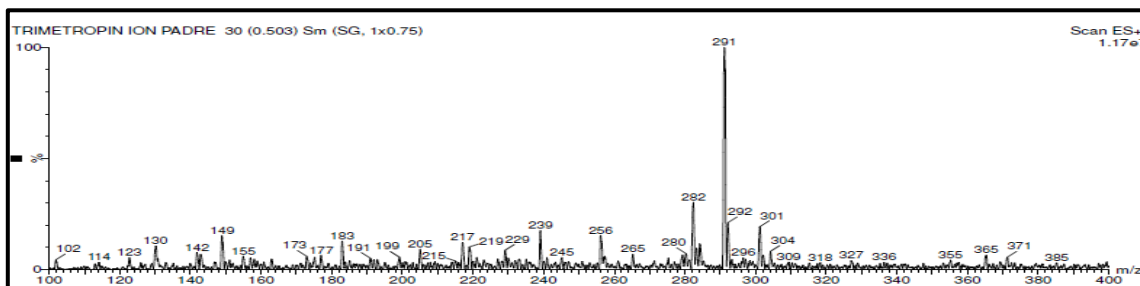


Figura 56. Ion padre de mayor proporción de Trimetropim empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

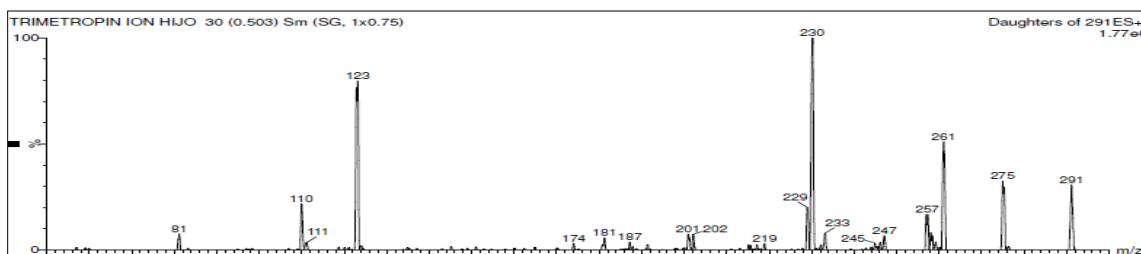


Figura 57. Ion hijo de mayor proporción de Trimetropim empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

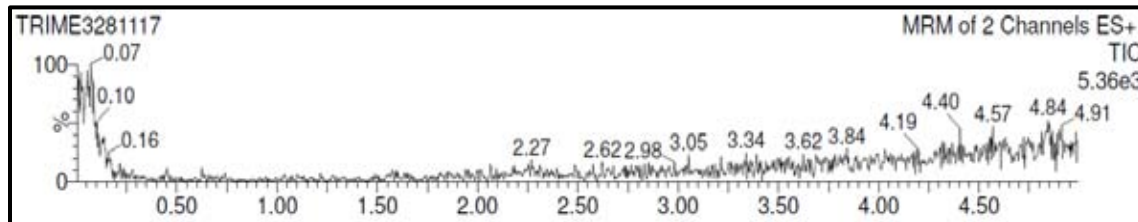


Figura 58. Cromatograma de trimetoprim.

Fragmentación del ion molecular de Cafeína 195-138 m/z

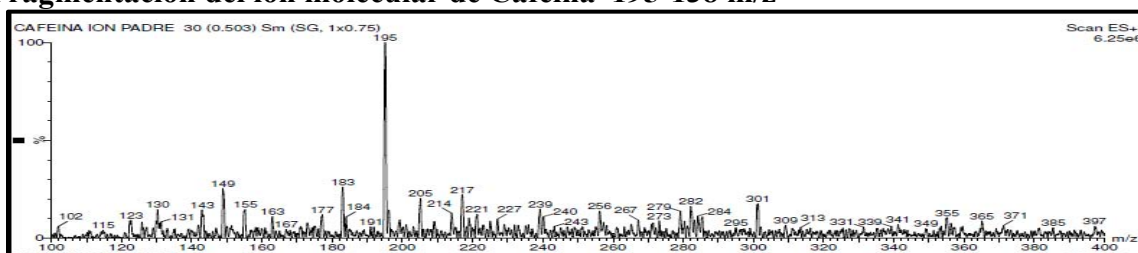


Figura 59. Ion padre de mayor proporción de Cafeína empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 AF 0.1% en ACN y AF 0.1% en Agua Milli-Q.

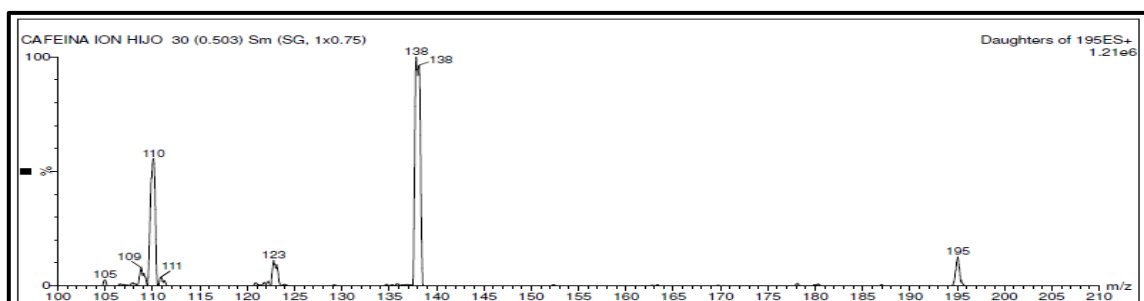


Figura 60. Ion hijo de mayor proporción de Cafeína empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 af 0.1% en ACN y AF 0.1% en agua milli-Q.

Fragmentación del ion molecular de salbutamol 240-148 m/z

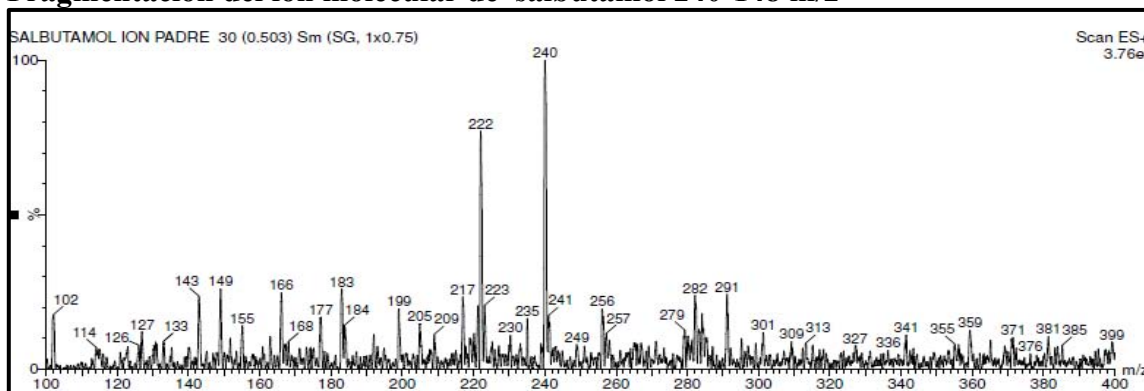


Figura 61. Ion padre de mayor proporción de Salbutamol empleando como medio de disolución una mezcla 60:40 af 0.1% en ACN y AF 0.1% en agua milli-Q.

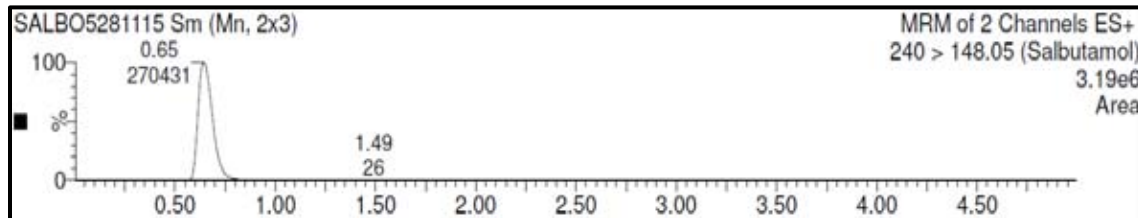


Figura 62. Cromatograma de Salbutamol

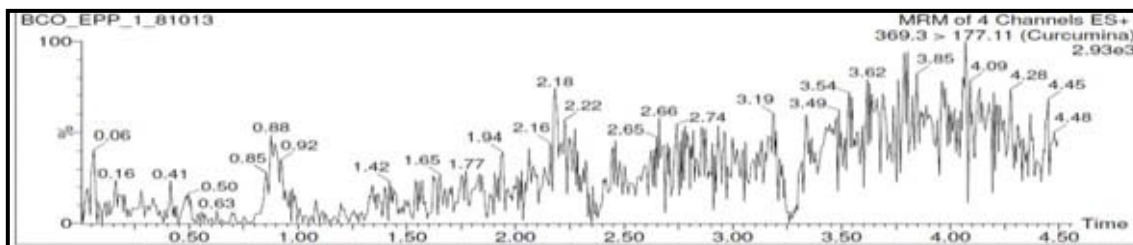


Figura 63. Cromatograma de muestra blanco utilizando acetonitrilo como agente precipitante con proporción 40 %A y 60%B y flujo 0.25 ml/min.

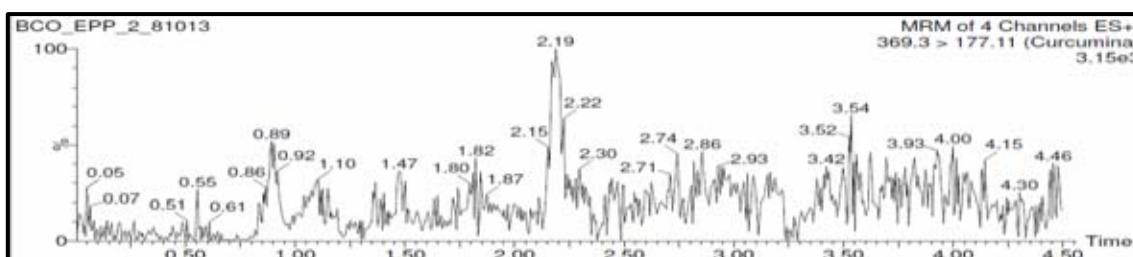


Figura 64. Cromatograma de muestra blanco utilizando acetona fría como agente precipitante con proporción 40 %A y 60%B y flujo 0.25 ml/min.

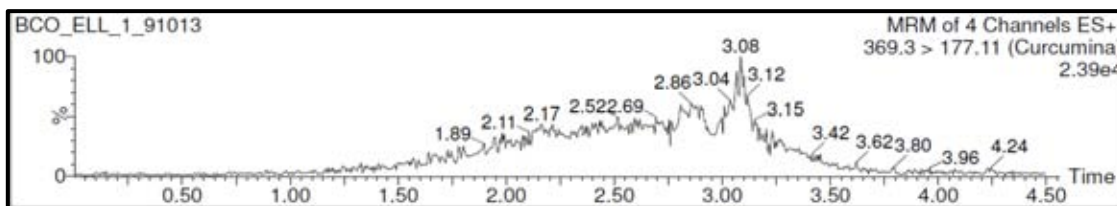


Figura 65. Cromatograma de muestra blanco utilizando cloroformo en extracción líquido-líquido con proporción 40 %A y 60%B y flujo 0.25 ml/min.

