



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE CURCUMINAS CON ACTIVIDAD
ANTIPARASITARIA EN INSUMOS DE USO VETERINARIO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

OFELIA VELÁZQUEZ GARCÍA



CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO

AÑO 2016



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: INÉS FUENTES NORIEGA
VOCAL: RACHEL MATA ESSAYAG
SECRETARIO: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ
1ER. SUPLENTE: GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ
2DO. SUPLENTE: KENNETH RUBIO CARRASCO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 113
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO "E"
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

FIRMA

SUSTENTANTE: OFELIA VELÁZQUEZ GARCÍA

FIRMA

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	3
III.	MARCO TEÓRICO	4
3.1	Generalidades de <i>Curcuma longa</i>	4
3.2	Curcuminas: estructura y propiedades fisicoquímicas	5
3.3	Actividad farmacológica y uso como antiparasitario en ovinos	8
IV.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	12
4.1	Estudio espectrofotométrico UV.....	12
4.1.1	Preparación de la solución stock	12
4.1.2	Determinación de puntos de máxima absorción	13
4.1.3	Parámetros de desempeño para la cuantificación de curcuminas por espectrofotometría UV	13
4.1.3.1	Linealidad del sistema	13
4.1.3.2	Precisión del sistema.....	14
4.1.4	Preparación de la muestra y cuantificación de curcuminas por espectrofotometría UV	14
4.2	Identificación de curcuminas por UPLC-ESI/EM	14
4.3	Desarrollo del método analítico para cuantificar curcuminas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)	15
4.4	Validación del método analítico para cuantificar curcuminas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	16
4.4.1	Evaluación del sistema	16
4.4.1.1	Adecuabilidad del sistema	16
4.4.1.2	Precisión del sistema.....	17
4.4.1.3	Linealidad del sistema	17
4.4.2	Evaluación del método.....	18
4.4.2.1	Precisión del método	18
a.	Repetibilidad	18
b.	Reproducibilidad	18



4.4.2.2	Linealidad del método y exactitud.....	19
4.4.2.3	Especificidad.....	19
4.4.2.4	Selectividad	20
4.4.2.5	Robustez.....	20
4.5	Cuantificación de curcuminas en diversas muestras de cúrcuma por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	21
4.6	Cuantificación de curcuminas en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad).....	21
4.7	Estabilidad de curcuminas dentro de una matriz farmacéutica de uso veterinario	22
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1	Estudio espectrofotométrico UV	23
5.1.1	Determinación de puntos de máxima absorción	23
5.1.2	Parámetros de desempeño para la cuantificación de curcuminas por espectrofotometría UV	24
5.1.2.1	Linealidad del sistema	24
5.1.2.2	Precisión del sistema.....	27
5.1.3	Determinación de curcuminas en diferentes muestras comerciales	27
5.1.4	Determinación de curcuminas en galletas con dosis de 50, 100 y 200 mg de extracto de cúrcuma por unidad.....	28
5.2	Identificación de curcuminas por espectrometría de masas.....	29
5.3	Desarrollo del método analítico para cuantificar curcumina y bisdesmetoxicurcumina por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	32
5.4	Validación del método analítico para cuantificar curcuminas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	33
5.4.1	Evaluación del sistema	34
5.4.1.1	Adecuabilidad del sistema	34
5.4.1.1	Precisión del sistema.....	35
5.4.1.2	Linealidad del sistema	36
5.4.2	Evaluación del Método.....	39
5.4.2.1	Precisión del método	39



a. Repetibilidad	39
b. Reproducibilidad	39
5.4.2.2 Linealidad del método	40
5.4.2.3 Exactitud.....	43
5.4.2.4 Especificidad	44
5.4.2.5 Selectividad	46
5.4.2.6 Robustez.....	51
5.5 Cuantificación de curcuminas en diversos extractos de cúrcuma por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	55
5.6 Cuantificación de curcuminas en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad).....	57
5.7 Estabilidad de curcuminas dentro de una matriz farmacéutica de uso veterinario	58
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	60
ANEXO I. Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método para la cuantificación de curcuminas por HPLC.....	61
LISTA DE CUADROS	64
LISTA DE FIGURAS	66
LISTA DE GRÁFICAS	68
REFERENCIAS.....	69



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje o por ciento
ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
β_0	Ordenada al origen
β_1	Pendiente de la recta
°C	Grados Celsius
C	Curcumina
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
DMC	Desmetoxicurcumina
ESI/EM	Ionización por Electro-spray acoplado a espectrometría de masas
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g.l.	Grados de libertad
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
IC(β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC(μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
k'	Factor de capacidad
MeOH	Metanol
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minuto



mL	Mililitro
μ L	Microlitro
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
NPT	Número de platos teóricos
OMS	Organización Mundial de la Salud
r	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
R	Resolución
T	Factor de coeio
t_R	Tiempo de retención
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra presión
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica
UV	Ultravioleta
\bar{x}	Media aritmética



I. INTRODUCCIÓN

Mundialmente la medicina tradicional es un complemento a la prestación de servicios de salud, o bien, es el pilar mismo del sistema. Actualmente, se estima que más del 80% de la población mundial utiliza plantas silvestres para la atención de las enfermedades (OMS, 2013); la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas tiene sus raíces en una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en algunas enfermedades como por los efectos secundarios que generan (Elizondo, 2004).

El uso de plantas se remonta al principio de la historia de la humanidad cuando el hombre recurría a la naturaleza en búsqueda no sólo de su alimento, sino también de opciones para restablecer su salud. De manera empírica aprendió el tipo de plantas que mitigaban sus malestares y, a través de los años, ese conocimiento fue transmitido primero de persona a persona y posteriormente en escritos que datan incluso de hace 2,500 años a. C. (Hernández, 1989).

A pesar de que su origen se remonta civilizaciones antiguas como Egipto, Grecia, China, la India y el Tíbet, la medicina herbolaria nunca tuvo el auge que tiene en este momento en el mundo occidental.

Por otra parte, México cuenta con una amplia gama de libros y referencias acerca de éste tópicos como el Códice Badiano de Martín de la Cruz, “La Historia General de las Cosas de la Nueva España” de Fray Bernardino de Sahagún, el material de referencia en la Nueva España durante el siglo XVI, “Las Plantas Medicinales de México” de Maximino Martínez (Rojas, 2009) y artículos recientes y vanguardistas que día a día son publicados con el fin de estudiar las especies vegetales y sus beneficios.

Actualmente, el uso de la medicina tradicional es una de las prácticas más extendidas en las comunidades del país, sobre todo en aquellas rurales o de difícil acceso, en donde se unen la herencia del conocimiento empírico acerca de la herbolaria y la falta de medicamentos alopáticos. Así, existe una gran variedad de alternativas en insumos herbolarios, entre ellos la cúrcuma: una droga cruda valorada por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimutagénicas y antimicrobianas (Houghton, 2009).



Los curcuminoides, principales metabolitos secundarios descritos en esta especie, han sido extensamente estudiados para su consumo humano. Sin embargo, existen pocos estudios que revelen su utilidad en la medicina veterinaria; en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se realizaron estudios *in vivo* que demuestran que la curcumina tiene un efecto anticoccidiano para combatir los parásitos del género *Eimeria spp.* en ovinos (Pérez, 2010).

Debido al reducido panorama circunscrito a la calidad y las características fisicoquímicas de los insumos de uso veterinario, en este trabajo, se recurrió a documentos con validez oficial, a nivel nacional e internacional, referentes a medicamentos de uso humano para evaluar los extractos utilizados como materia prima y del preparado oral utilizado con fines terapéuticos. En este sentido, la NOM-012-ZOO-1993, en su numeral 7.2.1, establece que los ingredientes activos de las diversas formas farmacéuticas deben cuantificarse de acuerdo con los métodos analíticos descritos en la última edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; si el método analítico no está descrito en ésta, se podrá utilizar cualquier otra farmacopea internacional. Con base en lo antes expuesto en el presente trabajo se desarrolló y validó un método para la cuantificación de curcuminas presentes en muestras de diversa procedencia. El método también se empleó para determinar la cantidad de curcuminas presente en un preparado oral que se administra en ovinos con parásitos.



II. OBJETIVOS

- Desarrollar un método analítico primario por espectrofotometría que permita valorar curcuminas totales.
- Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución que permita la valoración de curcuminas en diferentes extractos de *Curcuma longa*.
- Realizar el análisis de insumos de uso veterinario preparados con extracto de *Curcuma longa*, con la finalidad de cuantificar, de manera exacta la curcumina y la desmetoxicurcumina presentes en el preparado oral.



III. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de *Curcuma longa*.

Tradicionalmente, la cúrcuma (tumeric) se ha utilizado como colorante y condimento. En el siglo XIII los comerciantes árabes introdujeron la cúrcuma al mercado europeo de la India. Posteriormente, durante el dominio de Inglaterra a este mismo país (siglo XV), la cúrcuma fue combinada con otros condimentos para formar lo que conocemos, hoy día, como curry en polvo (Aggarwal, 2007).

El nombre de cúrcuma se deriva de la palabra árabe: *Kourkoum*, nombre original del azafrán (Scartezzini, 2000).

La cúrcuma, al igual que el jengibre, forma parte de la familia *Zingiberaceae*. Es una planta herbácea, perenne; con raíces o tubérculos arrugados en el exterior, marrones por fuera y de color anaranjado en el interior. Mide alrededor de 2 metros de alto y presenta hojas largas. No existe formación de semillas por lo que la planta se reproduce vegetativamente a partir del rizoma; éste órgano es el más importante desde el punto de vista gastronómico, medicinal y cosmético (Saiz de Cos, 2014).



Figura 1. Panta y rizoma de *Curcuma longa*.

Actualmente, se conocen cerca de 120 especies de cúrcuma (Basnet, 2011). Para su crecimiento se requiere de un clima caliente y con buena cantidad de agua. Es por ello que prevalece en regiones tropicales y subtropicales como la India, China y el sureste



de Asia (Houghton, 2009). La principal área de cultivo se encuentra en la India; país productor, consumidor y exportador líder a nivel mundial.

A pesar de que su producción se encuentre localizada en las regiones antes mencionadas su consumo ha aumentado año con año y, con ayuda de diversas tecnologías agrícolas se favorece el cultivo en zonas donde antes no era común observarlo.

3.2 Curcuminas: estructura y propiedades fisicoquímicas

Los rizomas de *Curcuma longa* generalmente contienen de 4 a 6 % de un aceite volátil color amarillo-anaranjado compuesto principalmente por β -tumerona, α -tumerona, tumerol, zingiberona, curcumol, cineol, borneol y xantorrizol, entre otros (Houghton, 2009).

Los curcuminoides más abundantes y característicos de esta especie son la curcumina, la desmetoxicurcumina y la bisdesmetoxicurcumina (Jayaprakasha, 2005). El contenido de curcuminoides en la cúrcuma puede variar dependiendo de las condiciones geográficas. En la Figura 2 se muestra la estructura química de los tres curcuminoides principales.

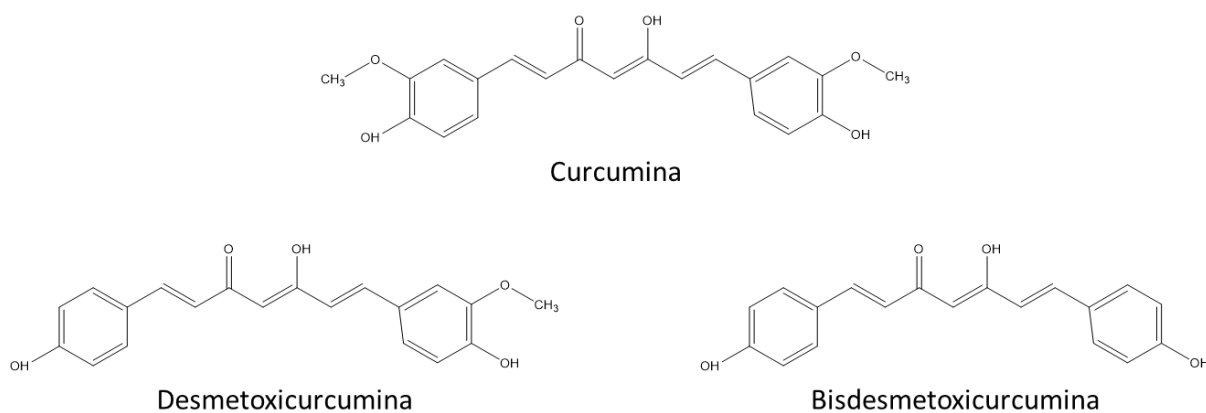


Figura 2. Estructura química de los curcuminas principales.



La curcumina tiene una masa molecular de $368.39 \text{ g mol}^{-1}$; con punto de fusión de $176\text{-}177^\circ\text{C}$; forma una sal de color marrón rojizo en medio alcalino; es insoluble e inestable en agua; y soluble en metanol, cetonas, ácido acético y cloroformo debido a su naturaleza hidrofóbica. Es libre de olor y sensible a la luz (Houghton, 2009).

Su nombre químico (IUPAC) es: (1*E*, 6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxipentil)-1,6-heptadieno-3,5-diona; los anillos aromáticos de su estructura son polifenoles que están conectados por dos grupos carbonilo α , β insaturados, característica que la convierte en un buen aceptor michaeleano susceptible a las adiciones nucleofílicas. Presenta un pico de máxima absorción a 420 nm en disolventes orgánicos, y en solución acuosa se reduce drásticamente esta absorción. Desde el punto de vista biológico, la curcumina es la responsable de los efectos terapéuticos atribuidos a la cúrcuma (Kiran, 2012).

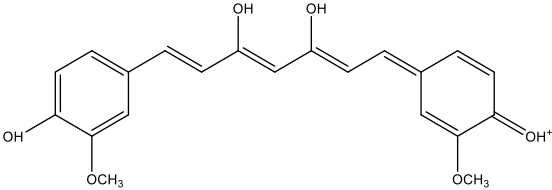
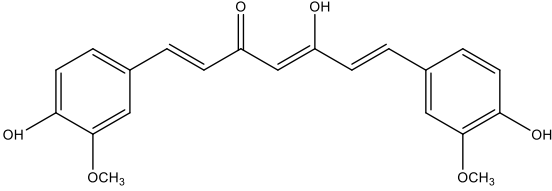
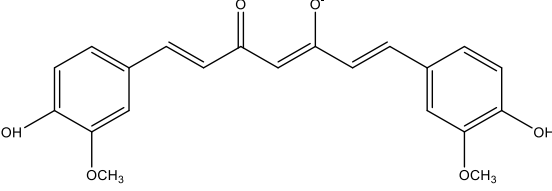
La curcumina comercial suele contener un 77% de curcumina, 17% de desmetoxicurcumina, 3% de bisdesmetoxicurcumina; el resto pertenece a otros curcuminoides o bien, a componentes propios de la cúrcuma diferentes a esta familia de compuestos (Esatbeyoglu, 2012).

La curcumina puede emplearse como indicador de pH debido a sus propiedades ácido-base. El punto de transición de color se encuentra entre pH 8 y 9 (Ying, 1997). La colorimetría de su disociación en solución acuosa se muestra en la Cuadro 1 (Tomren, 2007).

En solución acuosa la curcumina es inestable; no obstante, a pH bajo (pH 1 – 6) aumenta su estabilidad (Ying, 1997). A pesar de que el estómago y el intestino delgado presentan un pH bajo (la degradación de la curcumina es lenta) su solubilidad en este rango de pH es pobre (Tomren, 2007). La curcumina se vuelve inestable a $\text{pH} > 7$ y, el 90% de la curcumina, se degrada dentro de los primeros 30 minutos en las preparaciones que son administradas *in vitro* bajo condiciones fisiológicas [pH 7,2, 37°C] (Ying, 1997).

La curcumina se degrada principalmente a *trans*-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil) -2,4-dioxo-5-hexanal y en menor grado a vainillina, ácido ferúlico y feruloilmetano (Ying, 1997). La degradación más rápida se encuentra reportada en rangos de pH 8.2 a 8.5. En la Figura 3 se muestran las estructuras de degradación de la curcumina (Esatbeyoglu, 2012).



Rango de pH	Estado	Color	Estructura
< 1	Protonado	Rojo	
1 – 7	Neutral	Amarillo brillante	
7.5 >	Desprotonado	Rojo	

Cuadro 1. Colorimetría de los indicadores de pH de la curcuminas.

La degradación de la bisdesmetoxicurcumina ocurre de manera más lenta que la de la curcumina y desmetoxicurcumina debido, en parte, a la ausencia de los dos grupos metoxilo. Así, la bisdesmetoxicurcumina presenta una mayor estabilidad térmica y una menor degradación en medios alcalinos; estas propiedades permiten su selección para incluirla en los alimentos y mejorar la estabilidad del color. Además de reducir el valor de pH, la degradación de la curcumina, puede inhibirse mediante la adición de antioxidantes tales como ácido ascórbico, N-acetil-L-cisteína y glutatión (Ying, 1997). Una alternativa para subsanar los inconvenientes de la degradación en soluciones alcalinas y, su poca solubilidad en agua, es la estabilización con ciclodextrinas para formar un complejo curcumina-ciclodextrina que puede utilizarse en alimentos y productos farmacéuticos (Tomren, 2007).



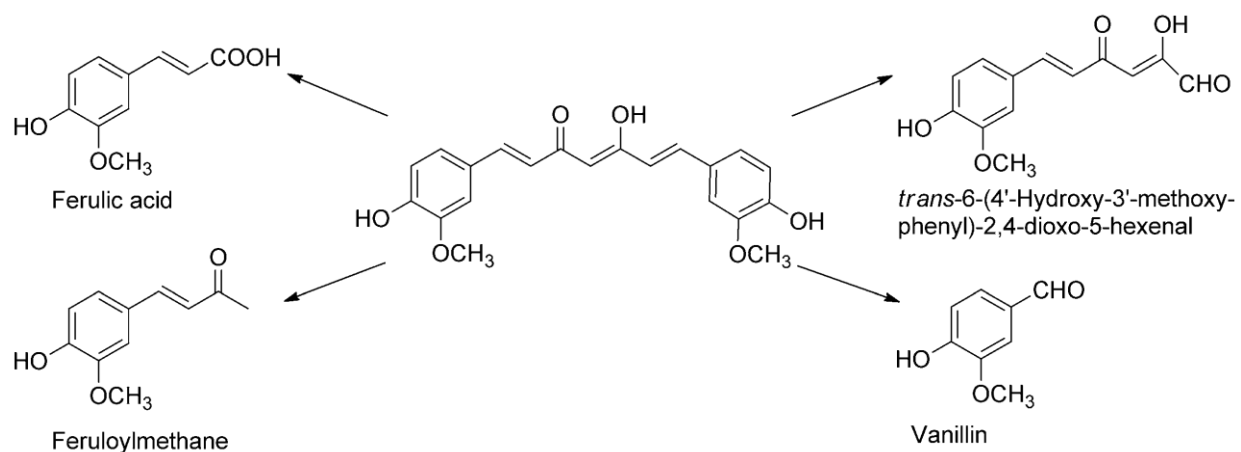


Figura 3. Productos de degradación de la curcumina en condiciones fisiológicas.

3.3 Actividad farmacológica y uso como antiparasitario en ovinos

Los expertos en herbolaria consideran que la cúrcuma es uno de los grandes regalos de la naturaleza porque se relaciona con una gran cantidad de propiedades curativas. En los países del sur de Asia, la cúrcuma, ha sido usada desde tiempos ancestrales como cosmético, agente colorante, conservador de alimentos y como parte de la medicina tradicional (Ravindran, 2007). En la Cuadro 2 se enlistan algunos de los usos que se ha dado a la cúrcuma en la medicina tradicional (Houghton, 2009).

Además de curcuminoides, la cúrcuma tiene en su composición aceites esenciales que son utilizados en aromaterapia y dentro de la industria del perfume.

Desde el punto de vista biológico diversos estudios acerca de la biodisponibilidad de la curcumina han detallado la velocidad y la concentración a la que se absorbe cuando aparece en plasma y cuando alcanza su sitio de acción. En los humanos la biodisponibilidad de los curcuminoides está determinada por su metabolismo en intestino y en hígado principalmente.



Vía de administración	Uso
Tópica	Quemaduras solares
	Conjuntivitis
	Infecciones cutáneas
	Artritis
	Esguinces
	Hemorroides
Oral (polvo, cápsulas, comprimidos, solución)	Mejorar digestión
	Antiinflamatorio
	Antioxidante
	Antipirético
	Dolores musculares
	Vómitos
	Anticancerígeno
	Anti-úlceras pépticas
	Antifúngico
	Antibacteriano
	Antimutagénico

Cuadro 2. Principales usos de la cúrcuma en la medicina tradicional

En modelos con ratones se observa que la biodisponibilidad oral de la curcumina es pobre a causa de una absorción relativamente baja en el intestino delgado, aun cuando existe un metabolismo alto en hígado (esto ocurre de manera similar en los humanos). Para aumentar la biodisponibilidad de la curcumina es necesario aumentar primero su solubilidad en soluciones acuosas; proceso que ha sido exitoso formando complejos metálicos con el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} y Se^{2+} y mediante la adición de albúmina (Basnet, 2011).

Su vía de eliminación primaria es la fecal y de manera secundaria la urinaria. Para que se observen concentraciones significativas de curcumina en plasma es necesaria la administración de grandes cantidades por vía oral.



Además de los usos que se le ha dado a la cúrcuma para tratar padecimientos en humanos, en años recientes, se realizaron estudios en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM que demuestran que el extracto de cúrcuma, en preparaciones (galletas), es de utilidad para tratar y prevenir la coccidiosis causada por parásitos del género *Eimeria spp.* en borregos.

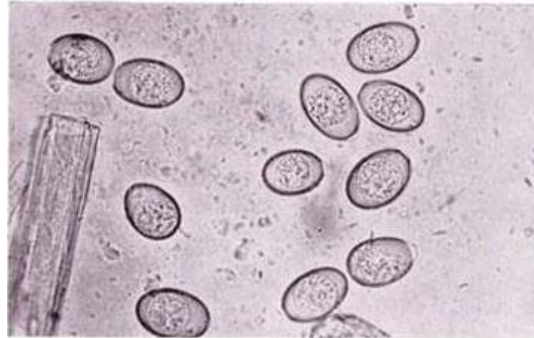


Figura 4. Vista en microscopio del parásito Eimeria (x400).

Los agentes causales de la eimeriosis o coccidiosis en rumiantes son organismos que se desarrollan dentro de las células intestinales de los huéspedes. Debido a que el desarrollo intracelular provoca la destrucción de las células en las que se multiplican se les considera parásitos, aun cuando no lleguen a provocar la enfermedad (Pérez, 2010). A pesar de que en los análisis de diagnóstico rutinario los parásitos se encuentran en altas concentraciones, es frecuente, que la coccidiosis sea asintomática. De manera general todas las especies de *Eimeria* que infectan rumiantes completan su desarrollo y reproducción en el tracto digestivo de huéspedes específicos que sean compatibles en ciertas áreas de su material genético (Taylor, 2007), como es el caso de los ovinos. Dependiendo del estado fisiológico e inmunológico del huésped, la coccidiosis, causa cambios estructurales que reducen la función de los órganos afectados y desencadenan una serie de cambios fisiológicos que van desde la reducción de absorción de nutrientes, la ruptura de vasos sanguíneos, diarrea, deshidratación, hiperplasia y en algunos casos la muerte (Vignau, 2005). El contagio tiene lugar por vía oral, cuando el rumiante ingiere agua o alimento contaminado con heces infectadas. Los signos clínicos, cuando se presentan, incluyen pérdida de peso, debilidad, deshidratación, pérdida del apetito, dolor abdominal y la inactividad que se genera como



consecuencia de lo anteriormente descrito (Taylor, 2007). Cuando se manifiestan estos síntomas en un borrego dentro de un grupo se deben realizar los análisis pertinentes a fin de impedir que éste contagie a los demás del grupo y, de ser posible, se debe analizar clínicamente también al resto debido a la alta tasa del padecimiento asintomático.

El tratamiento una vez que la coccidiosis es detectada en heces suele ser sólo paliativo, ya que no hay un fármaco que elimine por completo las coccidias cuando la enfermedad está en este punto; de aquí la importancia del tratamiento profiláctico.

Los estudios realizados por la FMVZ determinaron que, al administrar por vía oral galletas añadidas con extracto de *Curcuma longa*, se reducía la excreción de ooquistes del parásito *Eimeria*, responsables del contagio y la propagación de la enfermedad (tres dosis evaluadas: 50, 100 y 200 mg de polvo de cúrcuma/unidad). Entonces, el extracto de cúrcuma es eficaz para tratar el padecimiento y evitar la propagación entre los individuos de un grupo (Pérez, 2010). El extracto de cúrcuma ofrece una alternativa no tóxica, práctica y eficiente para tratar una enfermedad con impacto sanitario y económico.

Finalmente, todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y biodisponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales y no menos importantes, los éticos. En este sentido, los métodos analíticos son herramientas que miden las características críticas de calidad de un producto y, permiten asegurar la calidad y eficacia para el usuario final: bien sea un ser humano o un animal. En este sentido, y de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio para que los resultados sean confiables las metodologías analíticas y los procesos deben validarse.



IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La metodología analítica fue realizada a temperatura ambiente y las diferentes condiciones de almacenamiento se describen en cada caso. La procedencia de las diferentes muestras en polvo de *Curcuma longa* se resumen en la Cuadro 3.

Muestra	Procedencia
EC-1	Extracto comercial fabricado en la India
EC-2	Droga cruda comercial cultivada en el Estado de México
EC-3	Extracto metanólico preparado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)
EC-4	Extracto comercial fabricado en Monterrey, Nuevo León
EC-5	Droga cruda de origen desconocido
EC-6	Droga cruda de origen desconocido
EC-7	Droga cruda de origen desconocido
EC-8	Droga cruda de origen desconocido

Cuadro 3. Procedencia de las muestras de *C. longa*.

4.1 Estudio espectrofotométrico UV

4.1.1 Preparación de la solución stock

Las soluciones de curcumina empleadas en todos los ensayos fueron obtenidas utilizando un estándar marca Sigma Aldrich ($\geq 94.0\%$ curcuminas, $\geq 80\%$ curcumina). La solución stock de curcuminas empleada para realizar todas las determinaciones se preparó a una concentración de 1 mg/mL (10 mg del estándar de referencia en 10 mL de metanol).



4.1.2 Determinación de puntos de máxima absorción

El espectro en el UV se registró empleando un espectrofotómetro Evolution 60 marca Thermo Scientific en un intervalo de 200 a 800 nm. Para ello, se empleó una dilución 1:10 en metanol de la solución stock con concentración final de 100 µg/mL.

4.1.3 Parámetros de desempeño para la cuantificación de curcuminas por espectrofotometría UV

4.1.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad se determinó construyendo una curva de calibración, considerando la sensibilidad del equipo, de acuerdo con el siguiente procedimiento: a partir de la solución stock (1 mg/mL) se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones finales de 1 a 5 µg/mL de acuerdo con la Cuadro 4.

Nivel	Alícuota (µL)	Aforo con MeOH (mL)	Concentración final (µg/mL)
1	12.5	25	0.5
2	25	25	1
3	20	10	2
4	40	10	4
5	60	10	6

Cuadro 4. Niveles de concentración de la curva de calibración.

Para demostrar que el sistema es lineal se realizó un análisis estadístico mediante una regresión lineal entre la concentración final y la absorbancia; los parámetros estadísticos calculados fueron: la pendiente (β_0), la ordenada al origen (β_1), el coeficiente de determinación (r) y el coeficiente de correlación (r^2). Los criterios de



aceptación para este parámetro son: $r^2 > 0.98$ y $r \geq 0.99$; el intervalo de confianza para la pendiente $[IC(\beta_1)]$ no debe incluir el cero (USP 37, 2014).

4.1.3.2 Precisión del sistema

Éste parámetro se evaluó a través del análisis por sextuplicado de una solución de curcuminas en metanol a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$, de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos el CV no debe ser mayor a 2.0% (USP 37, 2014).

4.1.4 Preparación de la muestra y cuantificación de curcuminas por espectrofotometría UV

Para cada muestra pulverizada se pesaron entre 5 - 10 mg y se extrajeron con 10 mL de metanol durante 15 min en un baño de ultrasonido. La solución resultante se filtró a través de una membrana de 0.45 μm y se determinó la absorbancia a 420 nm.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para preparar las muestras derivadas de las galletas. Antes de triturar las muestras se sometieron a un proceso de secado durante 24 horas a 35 °C para facilitar su manejo.

La determinación del peso promedio se realizó con 20 galletas de cada lote (un lote por cada dosis evaluada). Las galletas se trituraron hasta polvo fino; a partir del polvo homogéneo se pesaron de 20 a 40 mg de muestra para extraerse con ultrasonido durante 15 minutos, empleando 10 mL de metanol. La suspensión resultante se filtró a través de una membrana de 45 μm de tamaño de poro y se analizó con el método desarrollado.

Los resultados se expresan como equivalentes de curcuminas totales a partir de la curva estándar preparada bajo las mismas condiciones de análisis.

4.2 Identificación de curcuminas por UPLC-ESI/EM

La identificación de la curcumina, la desmetoxicurcumina y la bisdesmetoxicurcumina en el estándar y el extracto EC-2 se realizó mediante el análisis comparativo de sus tiempos de retención. Para ello, la solución muestra del extracto y el estándar se



prepararon a una concentración de 1 mg/mL utilizando como disolvente metanol. El análisis se realizó en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia UPLC, clase H, marca Waters (Milford, MA, EE.UU.), equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un horno para columna y un detector UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA) acoplado a un detector de masas SQD2 simple cuadrupolo con una fuente de ionización por electrospray (ESI/EM). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa MassLynk version 4.1. El desarrollo del método analítico se llevó a cabo en una columna BEH C-18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) [Waters, Milford, MA, USA]. La fase móvil empleada consistió en un sistema isocrático compuesto por CH₃CN-Agua (0.1% Ácido fórmico; 1:1). La longitud de onda empleada para la detección fue de 270 nm, con un flujo de 0.3 mL/min, una temperatura de 40 °C y un volumen de inyección de 3 μL. Las condiciones para el detector fueron: voltaje del cono 4.5 kV; voltaje del capilar 60 V; temperatura de solvatación 300 °C y flujo de nitrógeno de 350 L/h

4.3 Desarrollo del método analítico para cuantificar curcuminas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

El desarrollo y la validación del método analítico se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU [Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón] equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el software LC Solution.

El análisis cromatográfico cuantitativo por HPLC se realizó en una columna Symmetry Shield RP8, 5 μm, 150 x 4.6 mm (Waters). Como sistema de elución se utilizó una mezcla ternaria compuesta por ácido acético (J. T. Baker) al 1.0% en agua (Merck Milli Q), Acetonitrilo (Merck) 36.0% y Metanol (Merck) 10.0% a un flujo de 1.3 mL/min y un volumen de inyección de 20 μL. La longitud de onda utilizada para la detección fue de 360 nm; la respuesta analítica fue el área bajo la curva (ABC).



4.4 Validación del método analítico para cuantificar curcuminas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La validación del método se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos emitida por la ICH en el 2013, también se utilizó la Guía de Validación de Métodos Analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. en el 2002, la USP 37 y la FEUM 11^a Edición 2014. De acuerdo con las referencias mencionadas, los parámetros de desempeño que se deben evaluar para validar los métodos analíticos conducentes a cuantificar fármacos son: adecuabilidad, linealidad, selectividad, especificidad, precisión, repetibilidad, exactitud y robustez.

4.4.1 Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se evaluó la adecuabilidad, linealidad y precisión del sistema. De acuerdo a las guías de validación se recomienda que para cada inyección la resolución sea mayor a 2 y el factor de coelexión menor a 2.

4.4.1.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema se evaluó mediante el análisis por sextuplicado de una solución estándar que contenía 60 µg/mL de curcumina preparada por dilución a partir de la solución stock. Los parámetros registrados fueron el tiempo de retención (t_R), el factor de coelexión (T), la resolución (R) y el número de platos teóricos (NPT); todos los parámetros se calcularon tomando como referencia el pico de la curcumina. El criterio de aceptación establecido en los protocolos de validación establece que el coeficiente de variación (CV) entre réplicas debe de ser menor del 2.0% para considerar que el sistema es adecuado (USP 37, 2014).



4.4.1.2 Precisión del sistema

La precisión del sistema se determinó mediante el análisis, por sextuplicado, de soluciones preparadas de manera independiente a una concentración exacta de 48 µg/mL de curcumina. Una vez registrada la respuesta analítica se determinó el coeficiente de variación (CV) entre las réplicas. Para esta característica de calidad el CV debe encontrarse por debajo de 1.5% para métodos físico-químicos (USP 37, 2014). También, se registró el tiempo de retención (t_R), el factor de coeio (T), la resolución y el número de platos teóricos (NPT).

4.4.1.3 Linealidad del sistema

La linealidad se determinó preparando tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración de acuerdo a la sensibilidad del equipo y la calidad de la señal cromatográfica arrojada (20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL) resumidos en la Cuadro 5. Cada curva se preparó mediante diluciones independientes a partir de la solución stock. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre la suma de las respuestas de la curcumina y desmetoxicurcumina y la concentración real de curcumina. Los parámetros calculados fueron la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), el coeficiente de determinación (r), el coeficiente de correlación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$] y para la ordenada al origen [$IC(\beta_0)$].

Nivel	Alícuota (µL)	Aforo con MeOH (mL)	Concentración final (µg/mL)
1	200	10	16
2	400	10	32
3	600	10	48
4	800	10	64
5	1000	10	80

Cuadro 5. Preparación de curvas para evaluar la linealidad del sistema.



Los criterios de aceptación establecidos son: $r^2 > 0.98$, $r \geq 0.999$, el IC (β_1) no debe incluir al cero mientras que, el IC (β_0) debe incluir al cero (USP 37, 2014).

4.4.2 Evaluación del método

Todas las soluciones empleadas en la validación del método se realizaron diluyendo la solución stock (1 000 $\mu\text{g/mL}$) con metanol.

4.4.2.1 Precisión del método

Este parámetro se evaluó por medio de dos propiedades críticas: la repetibilidad y la reproducibilidad.

a. Repetibilidad

Este parámetro se evaluó mediante la preparación, por sextuplicado, de una muestra con concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$. La respuesta analítica obtenida permitió calcular la desviación estándar (*DE*) y el coeficiente de variación (*CV*). El criterio de aceptación para esta característica de calidad establece un *CV* no mayor a 2.0 % (USP 37, 2014).

b. Reproducibilidad

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis, por triplicado, de muestras placebo adicionadas con 60 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina. Las muestras se prepararon, de forma independiente, en diferentes días (mínimo dos) y por diferentes analistas (al menos dos). Este parámetro se evalúa de nueva cuenta con el cálculo del coeficiente de variación de todos los resultados analíticos; para cumplir con el criterio de aceptación el *CV* debe ser menor a 2.0% (USP 37, 2014).



4.4.2.2 Linealidad del método y exactitud

Para evaluar este parámetro de desempeño se prepararon, aplicando el método analítico, muestras placebo adicionadas con curcumina en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Se trabajaron tres réplicas independientes en cada nivel.

Para demostrar la linealidad del método se realizó el ajuste de los datos por el método de mínimos cuadrados entre la concentración adicionada (x) y la concentración recuperada (y) calculándose los siguientes parámetros: β_0 , β_1 , r , r^2 , $\text{IC}(\beta_0)$, $\text{IC}(\beta_1)$ y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro [$\text{IC}(\mu)$]. Por otro lado, la exactitud del método se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recobro (cociente porcentual entre la concentración recuperada y la concentración adicionada). Con la diferencia entre el valor promedio del porcentaje de recobro y el valor verdadero (100%); también se evaluó el sesgo del método. Un método estadístico que demuestra que el sesgo es cero indica que el método es exacto (FEUM, 2014).

Para cumplir con este parámetro los criterios establecidos son: $r^2 > 0.98$, $r \geq 0.999$, el $\text{IC}(\beta_1)$ debe incluir la unidad, el $\text{IC}(\beta_0)$ debe incluir el cero, el CV del porcentaje de recobro debe ser menor a 2.0%, el $\text{IC}(\mu)$ debe incluir el 100% o bien el promedio aritmético del % de recobro este incluido en el intervalo 98.0 – 102.0% (USP 37, 2014).

4.4.2.3 Especificidad

Para el caso de la especificidad se debe determinar la respuesta a componentes como aditivos, sustancias auxiliares, vehículos del fármaco, etc. (FEUM, 2014).

En este caso la especificidad del método se evaluó mediante el análisis de muestras placebo, preparadas en metanol, con los ingredientes de la matriz (galleta): harina de trigo, saborizante artificial de piña y destilado de caña. Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes se verificó que no se presentara ninguna interferencia de los aditivos sobre la respuesta generada por las curcuminas.



4.4.2.4 Selectividad

Para evaluar la selectividad del método se determinó la posible interferencia de los productos de degradación obtenidos mediante la oxidación y las hidrólisis ácida y básica de la curcuminas sobre la respuesta cromatográfica. Las muestras provienen, en el primer caso, de la solución estándar de curcuminas (60 µg/mL), y en el segundo de la matriz estipulada como *galleta* (Cuadro 6). Las soluciones así obtenidas se inyectaron en el sistema cromatográfico y se determinó el porcentaje de degradación del analito. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad del método indica que la respuesta debe corresponder únicamente al analito de interés (USP 37, 2014).

	Curcumina (60 µg/mL)	Reactivo adicionado	Condiciones de degradación
Hidrólisis ácida	1 mL	1 mL HCl 1 M	Reflujo por 1 h
Hidrólisis básica	1 mL	1 mL NaOH 1 M	Reflujo por 1 h
Oxidación	1 mL	1 mL H ₂ O ₂ (5%)	Reflujo por 1 h

Cuadro 6. Condiciones de degradación de la curcumina.

4.4.2.5 Robustez

La robustez es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas en los parámetros normales de operación. Así, la robustez se evaluó mediante un diseño de experimentos factorial 2³; los factores seleccionados fueron: el flujo, el volumen de inyección y la proporción de metanol en la fase móvil (Cuadro 7). Se preparó una solución placebo de la matriz de trabajo adicionada con curcuminas a una concentración de 60 µg/mL. La respuesta medida en cada experimento fue la resolución. El efecto de cada factor se evaluó mediante el análisis por duplicado de todas las combinaciones posibles entre los factores seleccionados. Para estimar los coeficientes del modelo factorial se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.



Experimento	% Metanol	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección
1	5	1.1	10
2	15	1.1	10
3	5	1.5	10
4	15	1.5	10
5	5	1.1	30
6	15	1.1	30
7	5	1.5	30
8	15	1.5	30

Cuadro 7. Condiciones experimentales para evaluar la robustez del método analítico.

4.5 Cuantificación de curcuminas en diversas muestras de cúrcuma por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

10 mg de cada extracto fueron extraídos con 10 mL de metanol, durante 15 min, en un baño de ultrasonido. La solución resultante se filtró a través de una membrana de 0.45 μm y se aplicó el método analítico.

Los resultados se expresan como curcuminas totales a partir de la curva estándar preparada bajo las mismas condiciones de análisis.

4.6. Cuantificación de curcuminas en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad).

Además de la droga cruda (EC-2), las galletas utilizadas como antiparasitario tienen en su composición harina de trigo, agua, destilado de caña y saborizante artificial de piña. Una vez validado el método de cuantificación se puede garantizar que estos componentes no interfieren con la respuesta del analito.

Las muestras para evaluar la cantidad de curcuminas presentes en las galletas se prepararon de acuerdo con el numeral 4.5; la única diferencia reside en que para cada una de las dosis ensayadas se pesaron entre 240-1000 mg de galleta pulverizada. Esta proporción se determinó con base en el intervalo de la curva de calibración.



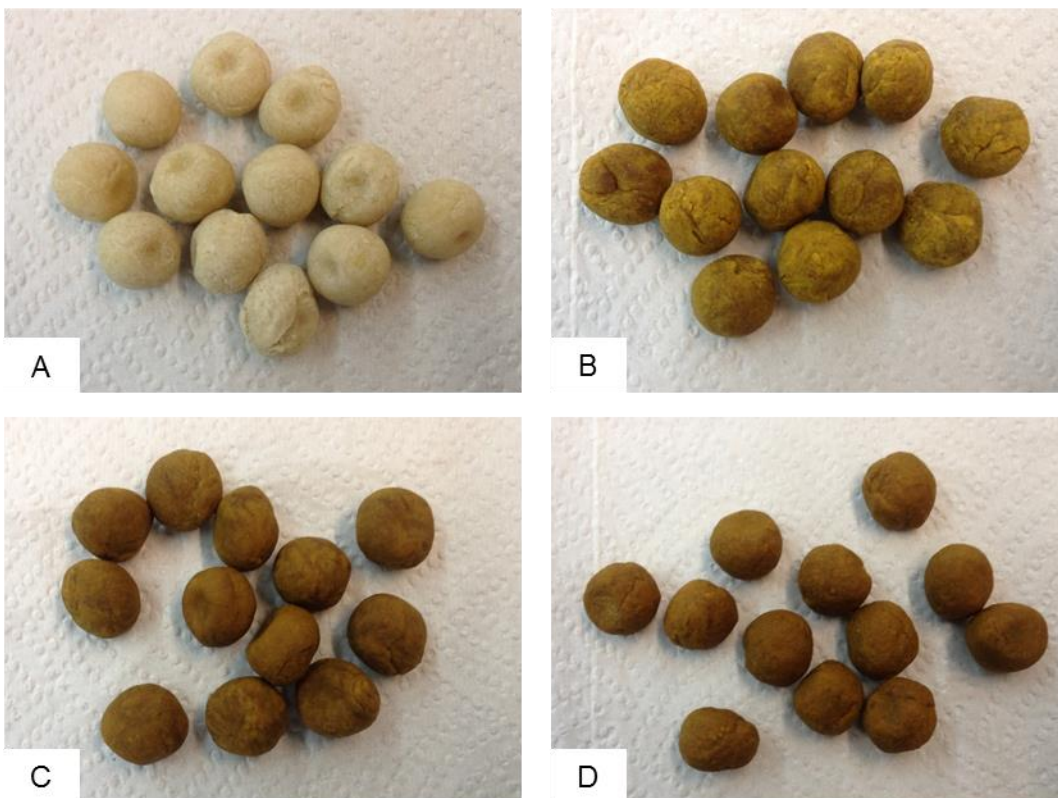


Figura 5. Galletas realizadas para su administración en ovinos: A. placebo, B. dosis de 50 mg de extracto, C. dosis de 100 mg de extracto, D. dosis de 200 mg de extracto.

4.7 Estabilidad de curcuminas dentro de una matriz farmacéutica de uso veterinario

La estabilidad de las galletas se evaluó mediante el análisis del efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento siguiendo el protocolo del inciso anterior. El análisis se realizó después de 1, 20, 40 y 90 días de almacenamiento en refrigeración a 2–4 °C y protegidos de la luz. En todos los casos se analizaron dos réplicas de cada dosis y los resultados se compararon con la respuesta generada por una solución de curcuminas preparada el día del análisis.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio espectrofotométrico UV

5.1.1 Determinación de puntos de máxima absorción

En el presente trabajo se estableció la identidad y la cuantificación de las curcuminas por un método primario: espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible. De manera general, los espectros en el UV de una sustancia, no tienen un alto grado de especificidad, sin embargo, son adecuados para las valoraciones cuantitativas y un medio útil de identificación. En la Figura 6 se ilustra el espectro de absorción en el UV-VIS del estándar de curcuminas, en metanol. En estas condiciones la longitud de onda de máxima absorción fue de 421 nm. La Cuadro 8 resume los valores de máxima absorción registrados a tres diferentes longitudes de onda.

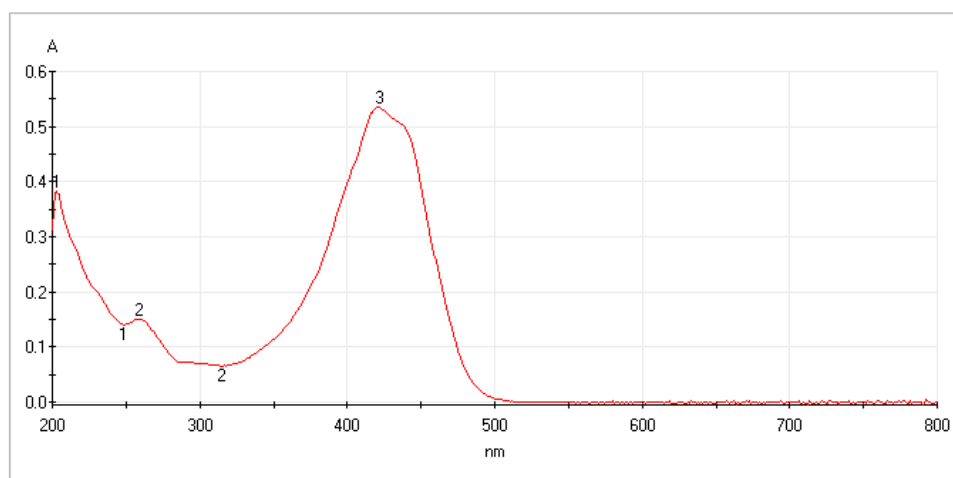


Figura 6. Espectro en el UV-VIS de la mezcla de curcuminas a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Picos de máximo de absorción	Longitud de onda
0.383	203 nm
0.151	259 nm
0.535	421 nm

Cuadro 8. Máximos de absorción observados en la mezcla de curcuminas.



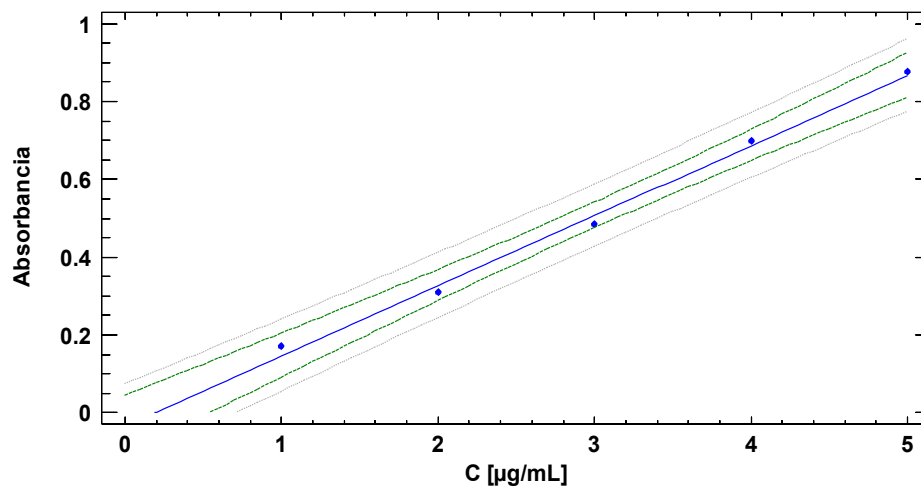
5.1.2 Parámetros de desempeño para la cuantificación de curcuminas por espectrofotometría UV

5.1.2.1 Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se prepararon tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Cuadro 9 y en la Gráfica 1.

C [$\mu\text{g/mL}$]	Absorbancia			\bar{X}	DE	CV (%)
	1	2	3			
1	0.168	0.17	0.169	0.169	0.001	0.6
2	0.309	0.313	0.306	0.309	0.004	1.1
3	0.498	0.491	0.489	0.482	0.009	1.8
4	0.695	0.694	0.702	0.697	0.004	0.6
5	0.857	0.883	0.885	0.875	0.016	1.8

Cuadro 9. Resumen de los datos experimentales para evaluar la linealidad del sistema.



Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar curcuminas por espectrofotometría UV.



El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal empleando el método de mínimos cuadrados. El cálculo de los coeficientes de regresión y el análisis de varianza del modelo se realizó empleando el programa de análisis estadístico STATGRAPHICS; los resultados se muestran en las Cuadros 10 y 11, respectivamente.

Linealidad del sistema	
Ecuación	Absorbancia = -0.0313 + 0.1799*Concentración
β_0	-0.0313
β_1	0.1799
r	0.9979
r²	0.9958

Cuadro 10. Linealidad del sistema para cuantificar curcuminas por espectrofotometría UV.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
β_0	-0.0377	0.0117	-3.2339	0.0072	-0.0632	0.0123
β_1	0.1816	0.0034	53.2468	1.267E-15	0.1741	0.1890

Cuadro 11. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema.

El análisis estadístico de los datos permite establecer que el modelo estimado cumple con los criterios de aceptación: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.99$; $IC(\beta_1) = [0.1741, 0.1890]$ no incluye al cero.

La prueba de falta de ajuste (Cuadro 12) está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados con un nivel de confianza del 95.0%.

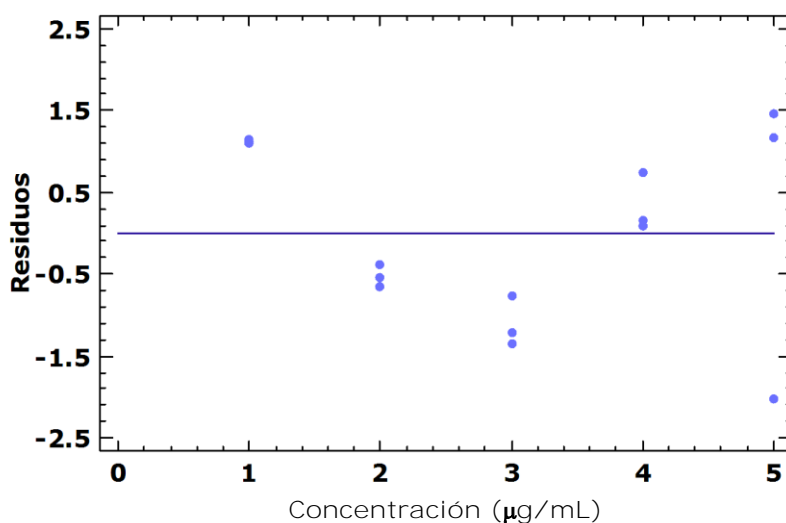


ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor P
Regresión	1.0998	1	1.0998	3616.2	<0.05
Residuos	0.0039	13	0.0003		
Carencia de Ajuste	0.0023	3	0.0008	4.87	0.0002
Error Puro	0.0016	10	0.0002		
Total	1.1037	14			

Cuadro 12. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema.

Por otra parte, la distribución de los datos en la gráfica de residuales (Gráfica 2) sugiere que la varianza de los errores es constante ya que no se observa tendencia en la dispersión de los puntos, por lo tanto, el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende.

Con base en lo antes expuesto se deduce que el modelo estimado describe adecuadamente la relación lineal entre las variables y puede emplearse convenientemente con fines de estimación y predicción en el intervalo de trabajo (1 – 5 $\mu\text{g/mL}$).



Gráfica 2. Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema.



5.1.2.2 Precisión del sistema

La precisión del sistema se evaluó aplicando repetidas veces el procedimiento analítico a una misma muestra. El valor del CV calculado (Cuadro 13) permite concluir que el sistema es preciso para cuantificar curcuminas totales (CV < 1.5 %).

Concentración de curcuminas: 2 µg/mL	
Réplica	Absorbancia
1	0.312
2	0.308
3	0.312
4	0.305
5	0.315
6	0.307
\bar{x}	0.310
DE	0.004
CV (%)	1.2

Cuadro 13. Datos obtenidos para evaluar la precisión del sistema.

5.1.3 Determinación de curcuminas en diferentes muestras comerciales

Una vez demostrada la linealidad y la precisión del sistema se cuantificó el contenido de curcuminas en diferentes muestras de prueba. En la Cuadro 14 se resume la información derivada de este análisis.

Como era de esperarse, el tenor en las concentraciones de curcuminas totales en las muestras analizadas varía desde 2.1 % (EC-8) hasta 4.8 % (EC-2) lo cual era congruente con la variedad en el origen de las muestras y las diversas condiciones en que son preparadas, almacenadas y acondicionadas. Cabe mencionar que el porcentaje de curcuminas calculado por el método empleado coincide con el certificado analítico proporcionado por el proveedor de la droga cruda EC-2. Con base en estos resultados las galletas para los tratamientos se prepararon empleando esta droga cruda.



Muestra	Absorbancia	C [µg/mL]	Masa muestra [mg]	% de curcuminas
EC-1	0.405	2.390	10.4	2.33
EC-2	0.601	3.487	7.4	4.75
EC-3	0.444	2.608	5.7	4.64
EC-4	0.473	2.770	10.3	2.72
EC-5	0.453	2.658	11.1	2.43
EC-6	0.536	3.123	11.9	2.65
EC-7	0.402	2.373	10.2	2.36
EC-8	0.351	2.087	10.2	2.08

Cuadro 14. Cuantificación de curcuminas presentes en diversos extractos comerciales.

5.1.4 Determinación de curcuminas en galletas con dosis de 50, 100 y 200 mg de extracto de cúrcuma por unidad

Para este propósito se utilizaron galletas en tres dosis diferentes: 50, 100 y 200 mg de extracto de cúrcuma por unidad. En la Cuadro 15 se resumen los porcentajes de curcuminas totales (curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina calculados por unidad de dosificación. Como se observa en los porcentajes obtenidos el proceso de manufactura de las galletas es proporcional de acuerdo a la dosis empleada.

Muestra	Peso x̄ (mg)	mg de curcuminas / galleta	% de curcuminas
Galleta placebo	2128.6	-	-
Galleta con 50 mg de extracto (EC-2)	2135.1	1.52	0.07
Galleta con 100 mg de extracto (EC-2)	2163.6	2.70	0.13
Galleta con 200 mg extracto (EC-2)	2210.1	5.33	0.24

Cuadro 15. Resultados de la cuantificación de curcuminas en la matriz farmacéutica (galleta).



5.2 Identificación de curcuminas por espectrometría de masas

Se utilizó como estándar una mezcla comercial de desmetoxicurcumina y curcumina, purificada al 94%, para realizar las determinaciones. El análisis cromatográfico de esta mezcla se realizó empleando dos detectores: uno de UV y otro de masas en su modalidad ESI. En los cromatogramas registrados se observan dos señales con tiempos de retención de 2.24 y 2.48 min (Figura 7); dichas señales corresponden, en los cromatogramas iónicos totales, con los iones mayoritarios en una relación m/z de 339.09 y 369.18 (Figuras 8 y 9) correspondientes a la desmetoxicurcumina y a la curcumina, respectivamente (Verma, 2013).

Por otra parte, el cromatograma generado por la droga cruda utilizada para la manufactura de las galletas (EC-2) presenta tres señales con tiempos de retención de 2.03, 2.25 y 2.48 (Figura 11). La principal diferencia con la mezcla de curcuminas purificadas radica en la presencia de una señal en 2.03 min correspondiente a la bisdesmetoxicurcumina. Así, en el cromatograma iónico total se observa una señal en una relación m/z de 309.11 correspondiente a la bisdesmetoxicurcumina (Figura 11). En síntesis, este análisis permitió la identificación inequívoca de los tres curcuminas en la droga cruda, y de la curcumina y la desmetoxicurcumina en el estándar empleado de referencia.

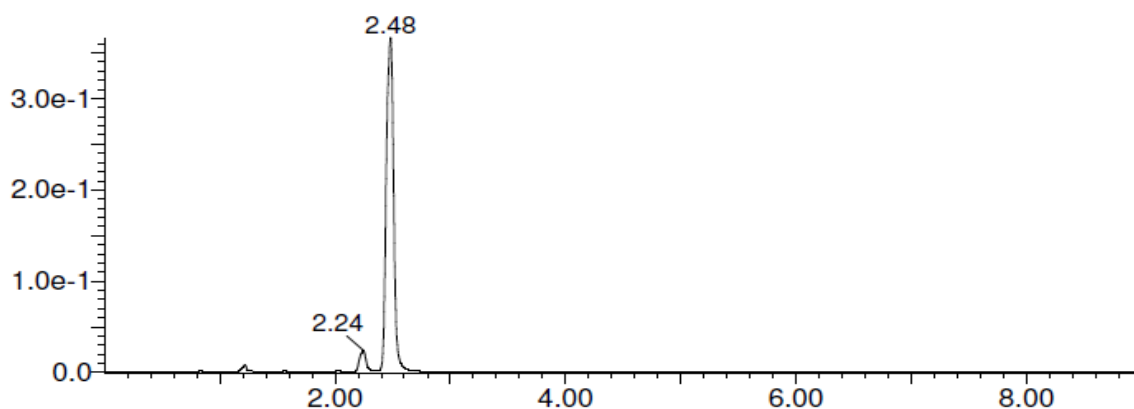


Figura 7. Cromatograma con detección UV generado por la mezcla de curcuminas empleadas como estándar.



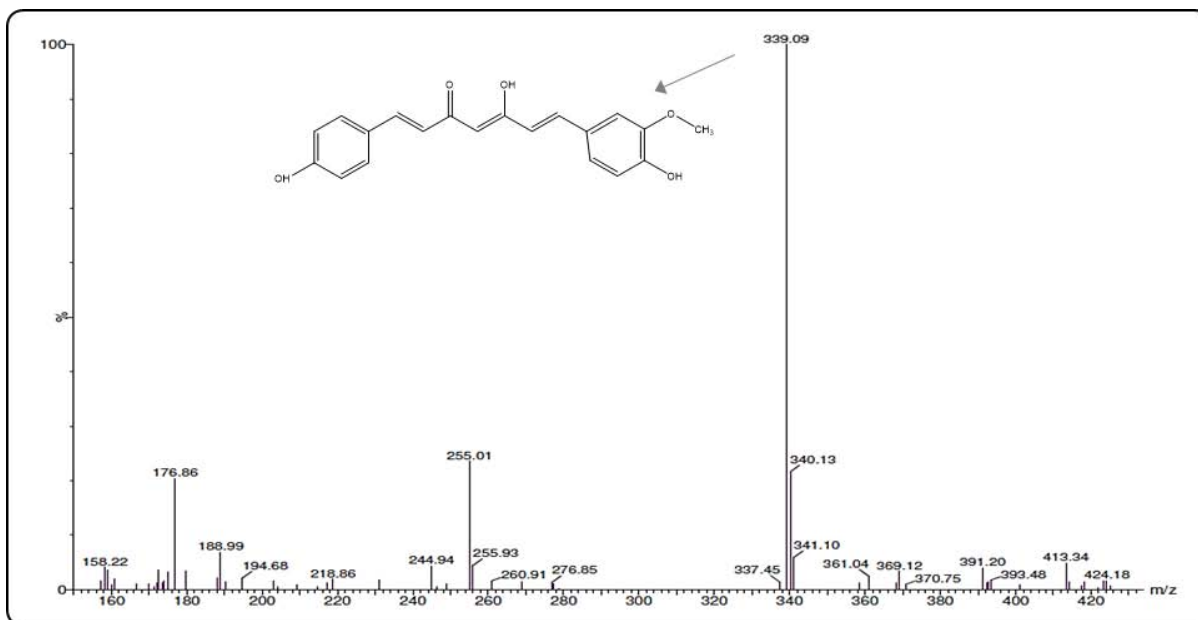


Figura 8. Cromatograma iónico total para la desmetoxicurcumina.

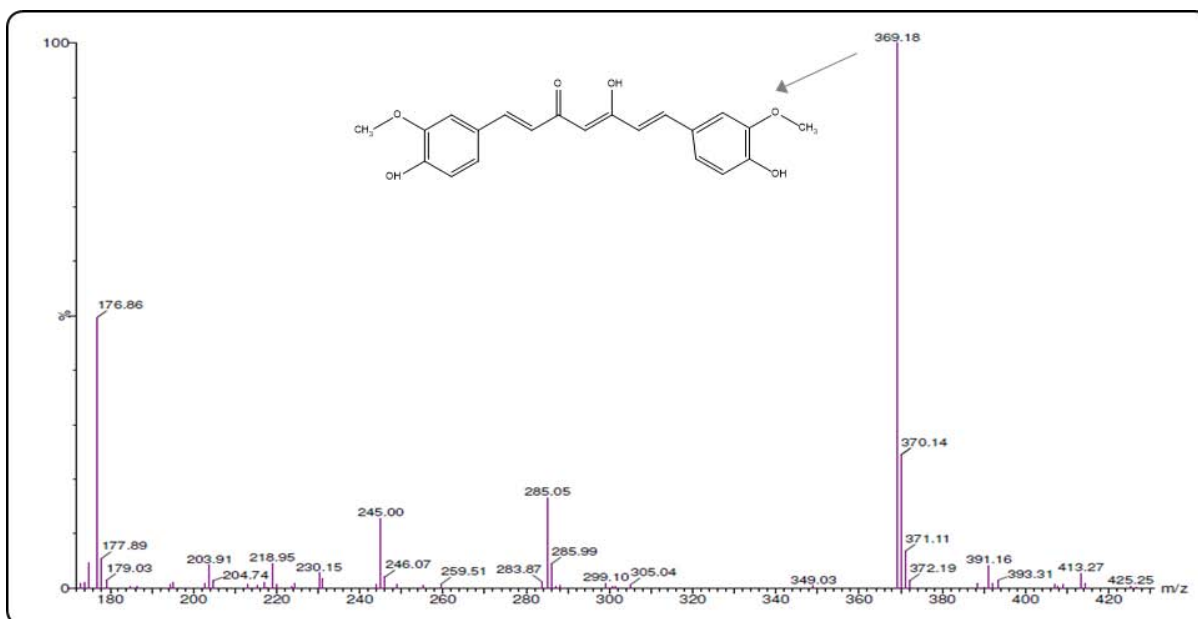


Figura 9. Cromatograma iónico total para la curcumina.



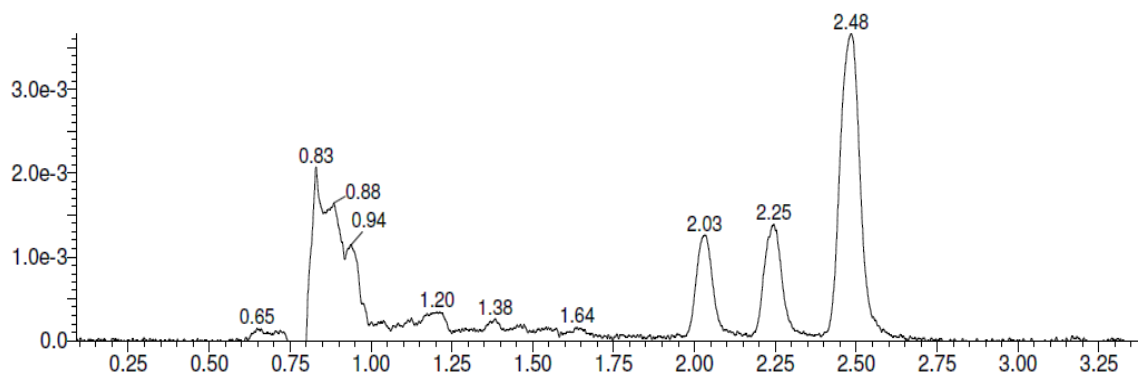


Figura 10. Cromatograma con detección UV generado para el polvo de cúrcuma EC-2.

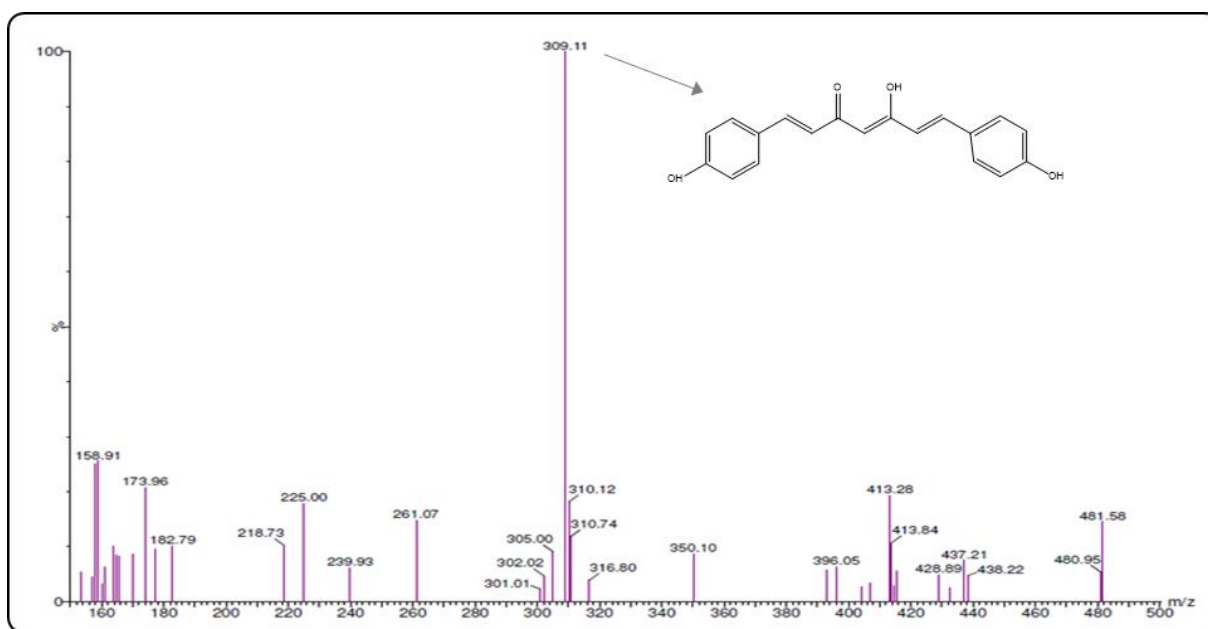


Figura 11. Cromatograma iónico total para la bisdesmetoxicurcumina.



5.3 Desarrollo del método analítico para cuantificar curcumina y bisdesmetoxicurcumina por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Para el desarrollo del método analítico se revisó, en primer lugar, los métodos publicados para determinar la presencia de curcuminas en diferentes extractos preparados con *C. longa*. Para poder encontrar las mejores condiciones de separación en extractos metanólicos de cúrcuma se comenzó utilizando la metodología descrita en la USP 37 para la cuantificación de curcuminas. Posteriormente, este método fue modificado con el fin de obtener una mejor resolución entre los picos de los curcuminas presentes en el extracto de interés.

Con base en estas consideraciones, se probaron diversas columnas, diferentes sistemas de elución y flujo hasta encontrar las siguientes condiciones cromatográficas: una columna C₈, un sistema ternario de disolventes compuesto por CH₃CN: MeOH: 0.1% H₃PO₄ (36:10:54); una longitud de onda de detección de 360 nm; flujo de 1.3 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL.

A continuación, se ilustran los perfiles cromatográficos generados con el estándar de trabajo utilizado (Figura 12) y el extracto metanólico preparado con la muestra EC-2 de cúrcuma (Figura 13).

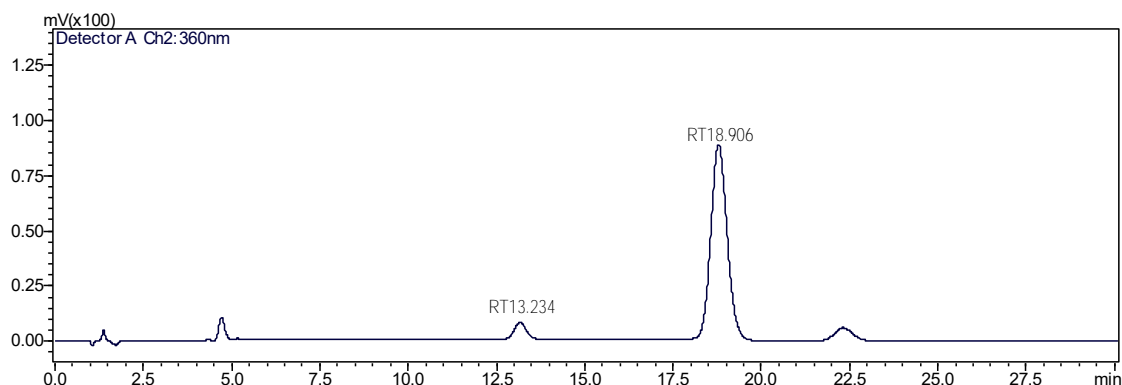


Figura 12. Cromatograma obtenido con el estándar de referencia a una concentración de 100 µg/mL.



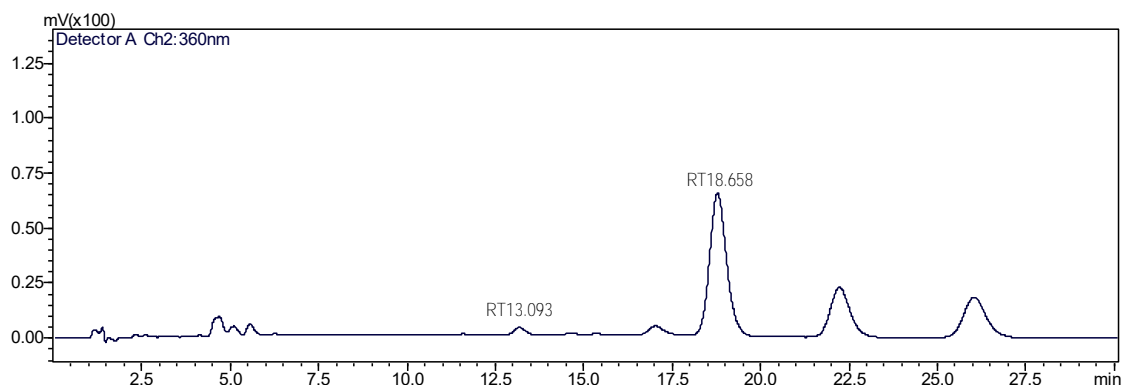


Figura 13. Cromatograma obtenido con el extracto metánolico de cúrcuma a una concentración de 100 µg/mL.

Una vez establecidas las condiciones analíticas del método, se registraron los parámetros cromatográficos que se resumen en la Cuadro 16.

De manera general, la resolución depende de la selectividad y la eficiencia cromatográfica. Para este método analítico, la resolución entre las señales es mayor a dos y el número de platos teóricos mayor a 2000 (eficiencia). Por lo anterior, el método cumple con los parámetros recomendados para cuantificar analitos en una mezcla multicomponente.

Factor de capacidad (K')	0.433
Factor de coeio (T)	1.137
Número de platos teóricos (NTP)	7818.3
Resolución (R) con respecto al pico anterior	7.79

Cuadro 16. Parámetros cromatográficos del método.

5.4 Validación del método analítico para cuantificar curcuminas por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Considerando que el método analítico está enfocado a la cuantificación de curcuminas en un producto terminado (Categoría I) los parámetros de desempeño que se evaluarán



para validar la metodología son los siguientes: linealidad y precisión del sistema; linealidad y precisión del método; especificidad, selectividad y exactitud. La tolerancia y la robustez pueden ser evaluadas opcionalmente dependiendo de la naturaleza del método.

5.4.1 Evaluación del sistema

5.4.1.1 Adecuabilidad del sistema

Para asegurar la confianza del sistema cromatográfico es necesario evaluar su desempeño antes de emplearse con fines de cuantificación. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra constituyen un sistema analítico completo que puede someterse a una prueba de funcionamiento. Para evaluar este parámetro de desempeño se obtuvieron datos específicos de 6 inyecciones repetidas de la solución estándar de trabajo. Los resultados se resumen en la Cuadro 17 y en la Figura 15. Como se deduce del análisis estadístico la reproducibilidad en las inyecciones repetidas cumple con los criterios establecidos $CV < 2.0\%$ (USP 37, 2014).

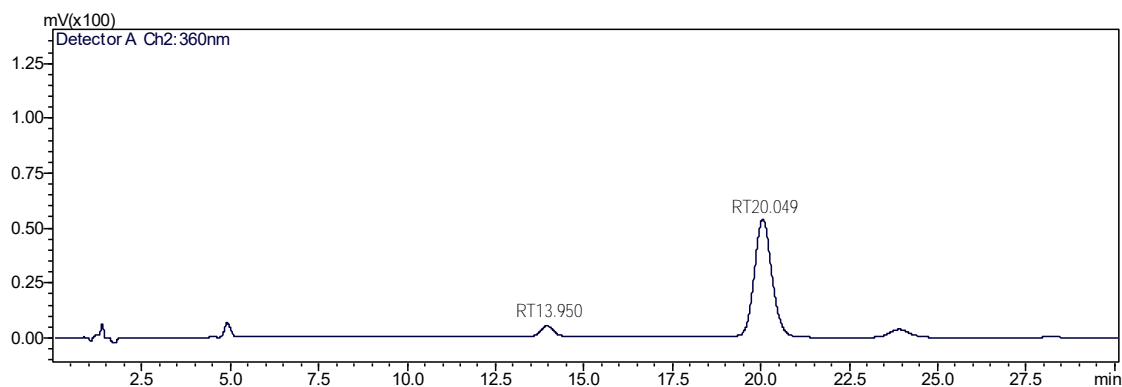


Figura 14. Cromatograma de una solución estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL.



Réplica	t _R	T	R	NPT	Área
1	19.185	1.136	7.602	7093.9	1749623
2	19.454	1.135	7.614	7455.5	1753199
3	19.251	1.136	7.554	7485.8	1756913
4	18.872	1.132	7.575	7654.1	1753441
5	18.946	1.141	7.575	7717.5	1754243
6	18.661	1.129	7.458	7609.2	1753807
				\bar{x}	1753537.7
				DE	2341.4
				CV (%)	0.1

Cuadro 17. Adecuabilidad del sistema.

5.4.1.1 Precisión del sistema

Esta característica de desempeño analítico se determinó preparando, por dilución, seis soluciones independientes a una concentración exacta de 48 µg/mL de curcuminas (concentración establecida como 100% de curcuminas en la muestra). El coeficiente de variación calculado para la respuesta analítica es menor a 2.0% (Cuadro 18); por lo tanto, cumple con el criterio correspondiente a la categoría I del método.

Concentración de curcuminas					48 µg/mL
Réplica	t _R	T	R	NPT	Área
1	20.106	1.110	8.022	8008.219	1945441
2	20.049	1.119	7.982	7956.382	1946343
3	19.754	1.120	7.889	7873.492	1946955
4	19.617	1.122	7.894	7936.012	1953700
5	19.953	1.122	7.845	7892.779	1944162
6	19.884	1.130	7.601	7812.334	1950740
				\bar{x}	1947890.2
				DE	3606.7
				CV (%)	0.2

Cuadro 18. Precisión del sistema.



5.4.1.2 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se investigó construyendo, por triplicado, una curva de calibración con cinco niveles de concentración. Los resultados obtenidos se ajustaron a un modelo estadístico de mínimos cuadrados (Cuadro 19).

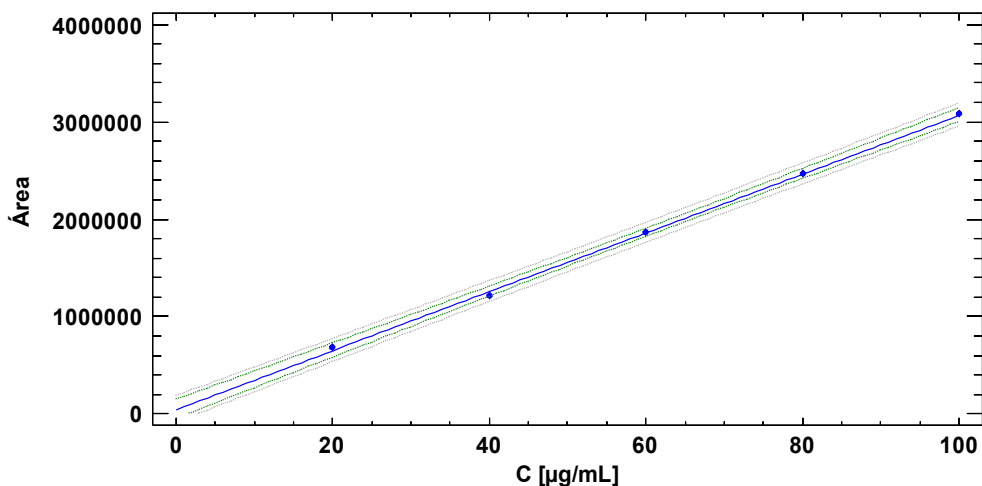
C [$\mu\text{g/mL}$]	Área			\bar{X}	DE	CV (%)
	1	2	3			
16	680272	679621	675677	678523.3	2486.4	0.4
32	1211453	1216674	1209159	1212428.7	3851.3	0.3
48	1845221	1852732	1883245	1860399.3	20138.2	1.1
64	2439963	2445474	2506237	2463891.3	36775.8	1.5
80	3051034	3094290	3078883	3074735.7	21924.2	0.7

Cuadro 19. Resumen de los datos experimentales para evaluar la linealidad del sistema.

Para evaluar la variación de la respuesta analítica se calculó en todos los casos el valor del CV. Como se deduce de los resultados presentados en la Cuadro 19 el coeficiente de variación, en todos los niveles de concentración, es menor de 2.0% cumpliendo satisfactoriamente con el criterio de aceptación establecido en la USP 37, 2014.

Por otra parte, los parámetros calculados para el modelo (Cuadro 20) indican una relación fuerte entre las variables ($r = 0.9996$, Gráfica 3). Con el análisis de varianza del modelo es posible establecer, que existe una relación lineal, estadísticamente significativa entre la respuesta analítica y la concentración de curcuminas. También, se observa que con base en el valor del coeficiente de determinación (r^2) el modelo explica más del 99.92% de la variabilidad en la respuesta analítica.





Gráfica 3. Linealidad del sistema para cuantificar curcuminas por HPLC.

Con base en estas consideraciones se concluye que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones establecido (16-80 µg/mL).

Este análisis permitió establecer además, que con un 95% de confiabilidad el intervalo de confianza para la pendiente, $IC(\beta_1)$, no incluye al cero, mientras que el $IC(\beta_0)$ sí lo hace (Cuadro 21).

Linealidad del sistema	
Ecuación	Área = 44829.5 + 37774.3*Concentración
β_0	44829.5
β_1	37774.3
r	0.9996
r²	0.9992

Cuadro 20. Parámetros de linealidad del sistema.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
β_0	34478.2	20612.3	1.6727	0.1202	-10432.18	79388.6
β_1	30348.8	301.1	100.7867	6.1E-19	29692.7	31004.9

Cuadro 21. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema.

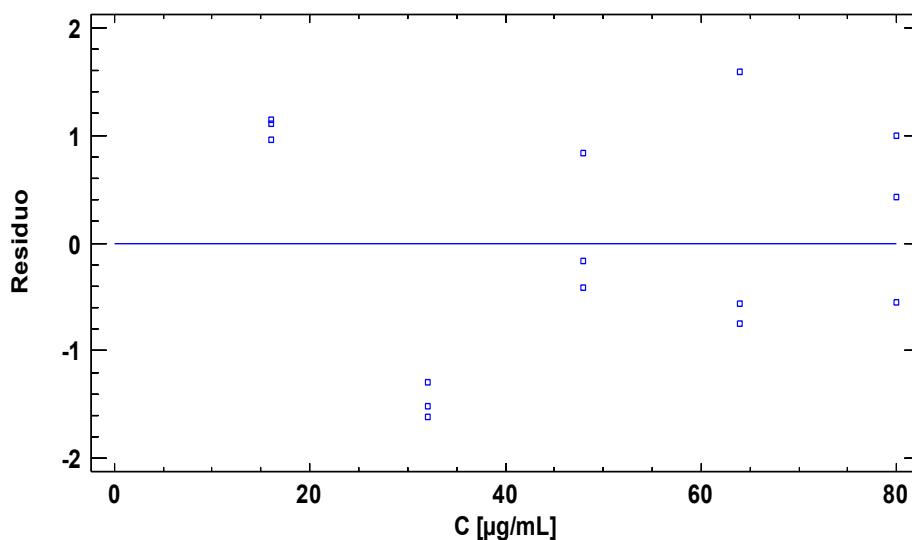


ANÁLISIS DE VARIANZA

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor P
Regresión	1.096 E13	1	1.096 E13	11491.55	0.0000
Residuos	1.240 E10	13	9.536 E8		
Carencia de Ajuste	7.878 E9	3	2.626 E9	5.81	0.0145
Error Puro	4.519 E9	10	4.519 E8		
Total	1.097 E13	14			

Cuadro 22. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema.

Finalmente, se realizó una prueba de falta de ajuste para establecer si el modelo es adecuado para describir los datos observados. Considerando que el valor-P observado en la Cuadro 22 es menor que 0.05 se concluye, con el 95% de confianza, que el modelo es adecuado para describir los datos. Aún más, en la Gráfica 4, se observa que la varianza de los errores es constante y no presentan tendencias específicas (Gráfica 4). Con base en estas evidencias se concluye que el modelo estimado es adecuado para la aplicación que se pretende.



Gráfica 4. Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema.



5.4.2 Evaluación del Método

5.4.2.1 Precisión del método

a. Repetibilidad

Las observaciones para evaluar la repetibilidad del método se muestran en la Cuadro 23. De acuerdo con el criterio de aceptación establecido para este parámetro de calidad ($CV < 2\%$) se concluye que el método es preciso para la cuantificación de curcuminas en extractos metanólicos.

Réplica	t_R	Área bajo la curva (ABC)
1	19.227	1750114
2	19.210	1757114
3	18.846	1733085
4	18.836	1750428
5	18.977	1753463
6	18.805	1747083
\bar{x}		1748547.8
DE		8303.9
CV (%)		0.5

Cuadro 23. Repetibilidad del método.

b. Reproducibilidad

Es una expresión de la variabilidad en los resultados cuando el método se aplica en diferentes días y con diferentes analistas dentro del mismo laboratorio. Los resultados estadísticos obtenidos indican que el CV cumple con los criterios de aceptación establecidos ($CV < 2.0$ entre los análisis).



	DIA	AREA	\bar{x}	DE	CV (%)
ANALISTA A	1	1836548	1814455.33	22256.48	1.2
		1831261			
		1834528			
	2	1790838			
		1789013			
		1804544			
ANALISTA B	1	1848372	1831005	17431.27	1.0
		1854710			
		1828295			
	2	1819922			
		1808606			
		1826125			
Media total				1822730.17	
Desviación estándar total				20927.74	
Coefficiente de variación total (%)				1.2	

Cuadro 24. Reproducibilidad del método.

5.4.2.2 Linealidad del método

Previo cálculo de la concentración recuperada (Cuadro 25) se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados empleando como variables la concentración adicionada y la concentración recuperada (Cuadro 26).

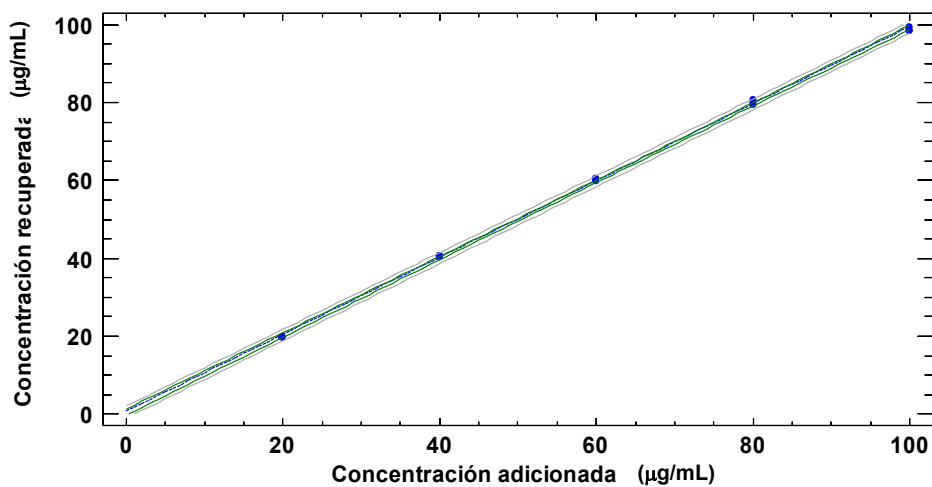
Como se observa en el Gráfico 5 los resultados siguen una tendencia lineal para el intervalo de concentración 20-100 $\mu\text{g/mL}$ con un nivel de confianza del 95%. Además, los parámetros estadísticos del modelo cumplen con el criterio de aceptación con valores mayores de 0.999 y 0.98 para r y r^2 , respectivamente. Aunado a que el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$, no incluye al cero, mientras que el $IC(\beta_0)$ si lo hace (Cuadro 27).



Concentración de curcuminas	Área	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)
20	643384	20.0	19.6553
20	643994	20.0	19.6757
20	643737	20.0	19.6671
40	1267744	40.0	40.5455
40	1263514	40.0	40.4039
40	1267553	40.0	40.5391
60	1854703	60.0	60.1842
60	1847518	60.0	59.9438
60	1861436	60.0	60.4095
80	2434150	80.0	79.5716
80	2432056	80.0	79.5016
80	2464135	80.0	80.5749
100	2998016	100.0	98.4377
100	2995288	100.0	98.3464
100	3023124	100.0	99.2778

Cuadro 25. Linealidad del método y exactitud.

Gráfico del Modelo Ajustado
 Concentración recuperada (?g/mL) = 0.553553 + 0.987145*Concentración adicionada (?g/mL)



Linealidad del sistema	
Ecuación	$C_{\text{RECUPERADA}} = 0.5536 + 0.9871 * C_{\text{ADICIONADA}}$
β_0	0.5536
β_1	0.9871
r	0.9998
r²	0.9996

Cuadro 26. Parámetros de linealidad del método.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
β_0	0.7673	0.4153	1.8477	0.0894	-0.1375	1.6720
β_1	0.9845	0.0061	162.2840	2.014 E-21	0.9713	0.9977

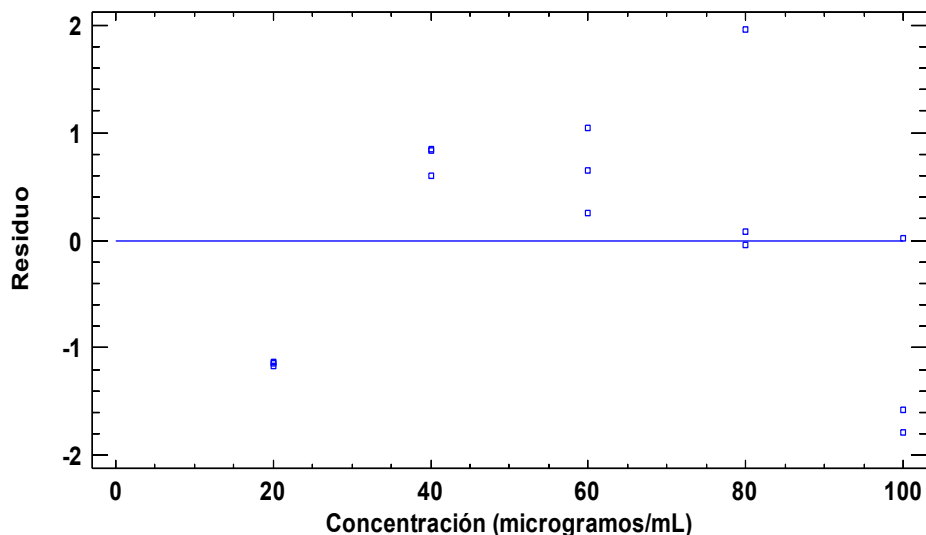
Cuadro 27. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor P
Regresión	11693.5	1	11693.5	30065.53	< 0.05
Residuos	5.056	13	0.3889		
Carencia de Ajuste	3.686	3	1.2288	8.97	0.0035
Error Puro	1.370	10	0.1370		
Total	11698.5	14			

Cuadro 28. Análisis de varianza de la regresión lineal del método.



El análisis de varianza de la regresión de nueva cuenta reveló que el modelo es adecuado para el fin que se pretende (Valor $P < 0.05$, Cuadro 28). Finalmente, el estudio de los residuales (Gráfica 6) indicó que la varianza de los datos es constante.



Gráfica 6. Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del método.

5.4.2.3 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido, empleando el método en cuestión y el valor de referencia (CNQFB, 2000). Para evaluar esta característica de calidad se preparó una matriz placebo con cantidades conocidas del estándar de curcumina y con los resultados obtenidos se estimó el porcentaje de recobro para cada nivel ensayado. Como se observa en la Cuadro 29, los porcentajes de recobro se encuentran en el intervalo de 98.0 - 102.0 %. Además, el CV entre los datos se encuentra por debajo del 2.0%. Con base en lo antes expuesto el método analítico desarrollado es exacto.



Concen tración	Área	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	% Recobro	\bar{x} % Recobro	DE	CV (%)
20.0	643384	20.0	19.6553	98.3			
20.0	643994	20.0	19.6757	98.4	98.3	0.0512	0.1
20.0	643737	20.0	19.6671	98.3			
40.0	1267744	40.0	40.5455	101.4			
40.0	1263514	40.0	40.4039	101.0	101.2	0.1998	0.2
40.0	1267553	40.0	40.5391	101.3			
60.0	1854703	60.0	60.1842	100.3			
60.0	1837518	60.0	59.6092	99.3	100.1	0.6878	0.7
60.0	1861436	60.0	60.4095	100.7			
80.0	2434150	80.0	79.5716	99.5			
80.0	2432056	80.0	79.5016	99.4	99.9	0.7506	0.8
80.0	2464135	80.0	80.5749	100.7			
100.0	2998016	100.0	98.4377	98.4			
100.0	2995288	100.0	98.3464	98.3	98.7	0.5134	0.5
100.0	3023124	100.0	99.2778	99.3			

Cuadro 29. Linealidad del método para determinar la exactitud.

5.4.2.4 Especificidad

La especificidad del método se evaluó preparando un placebo que incluye todos los aditivos de la formulación (Figura 15). También, se preparó una muestra de dicho placebo con una cantidad conocida (100 µg/mL) y una muestra más con placebo y extracto de curcuminas. Los cromatogramas derivados de cada análisis se ilustran en las Figuras 16 y 17, respectivamente. La resolución del método permite distinguir a la curcumina de productos estructuralmente relacionados, tanto en soluciones provenientes del estándar como en soluciones provenientes del extracto de cúrcuma.



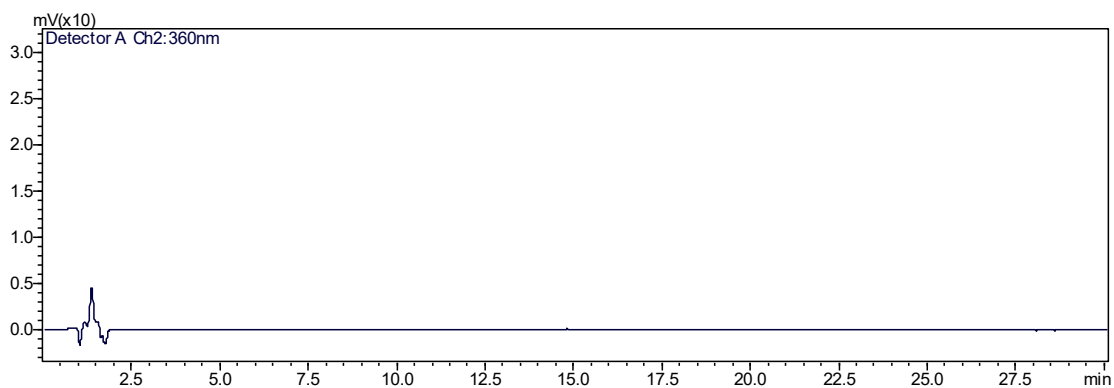


Figura 15. Cromatograma obtenido con los aditivos de la formulación (placebo).

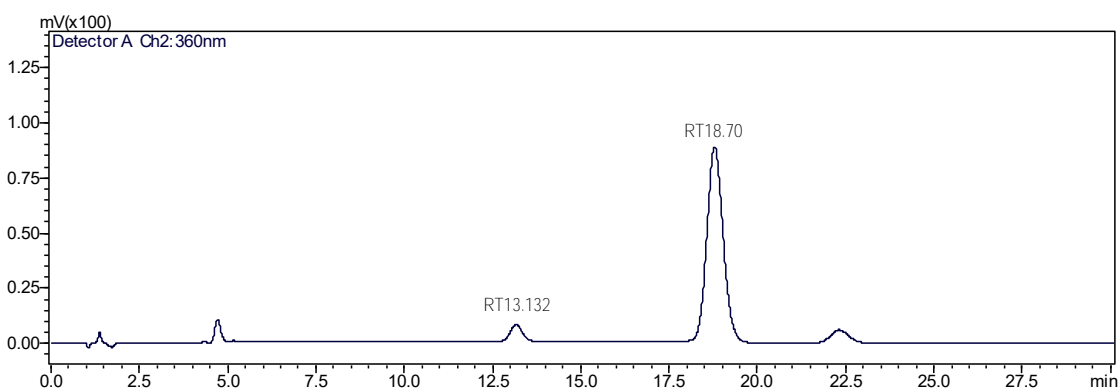


Figura 16. Cromatograma obtenido con los aditivos de la formulación (placebo) y curcumina (100 $\mu\text{g/mL}$).

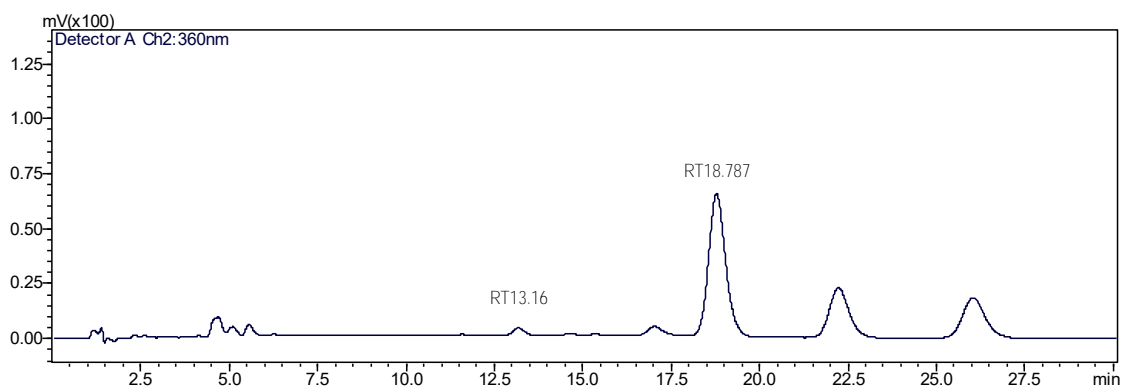


Figura 17. Cromatograma obtenido con los aditivos de la formulación (placebo) y extracto de curcumina (100 $\mu\text{g/mL}$).



5.4.2.5 Selectividad

La selectividad del método se determinó evaluando la respuesta de la curcuminas a la degradación forzada por condiciones extremas (oxidación e hidrólisis). Los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones se ilustran en las Figuras 18 – 25.

Factor a evaluar	Replica	t_R	t_R	Área bajo la curva (DMC)	Área bajo la curva (Curcumina)
		(DMC)	(C)		
Sin Tratamiento	1	12.974	18.446	97877	1656366
	2	12.762	18.098	97877	1656366
Degradación ácida	1	13.717	19.745	46021	770089
	2	13.592	19.521	41270	701944
Degradación Básica	1	-	17.625	-	443677
	2	-	17.597	-	446937
Oxidación	1	13.348	19.077	18521	244187
	2	13.346	19.052	18839	243681

Cuadro 30. Resultados obtenidos durante la degradación forzada del estándar de curcuminas.

Factor a evaluar	Replica	t_R	t_R	Área bajo la curva (DMC)	Área bajo la curva (Curcumina)
		(DMC)	(C)		
Sin Tratamiento	1	12.862	18.235	45687	1452765
	2	12.703	18.098	45709	1450061
Degradación ácida	1	12.875	18.19	19896	717365
	2	12.715	17.908	16901	620936
Degradación Básica	1	-	16.878	-	319419
	2	-	16.805	-	305159
Oxidación	1	12.678	17.826	13180	318389
	2	12.767	17.944	12292	326356

Cuadro 31. Resultados obtenidos durante la degradación forzada del extracto de cúrcuma.



- **Condiciones Iniciales**

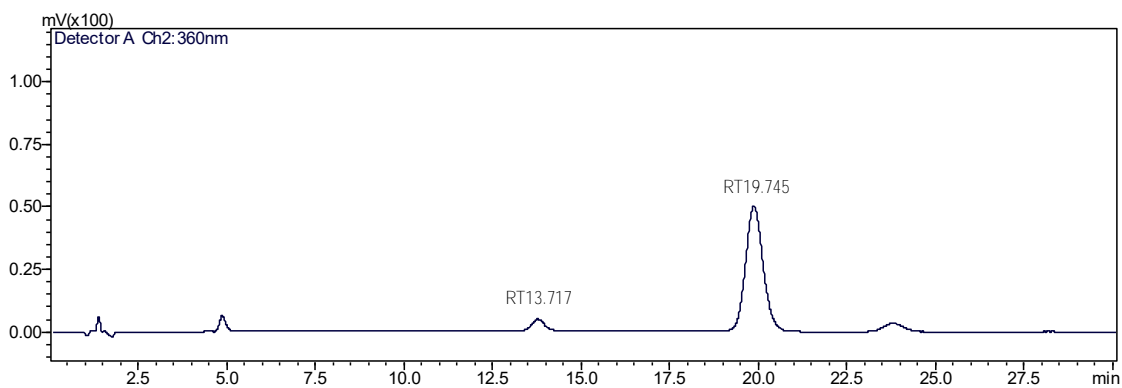


Figura 18. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL.

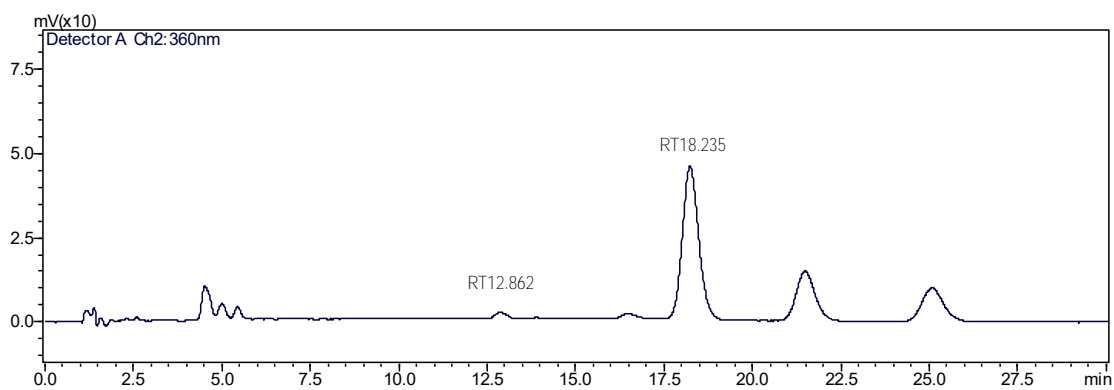


Figura 19. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL.

- **Hidrólisis ácida**

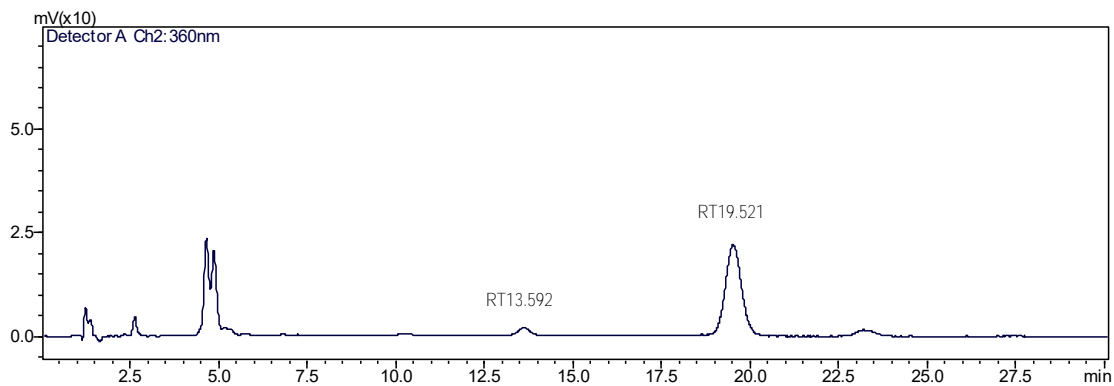


Figura 20. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis ácida.



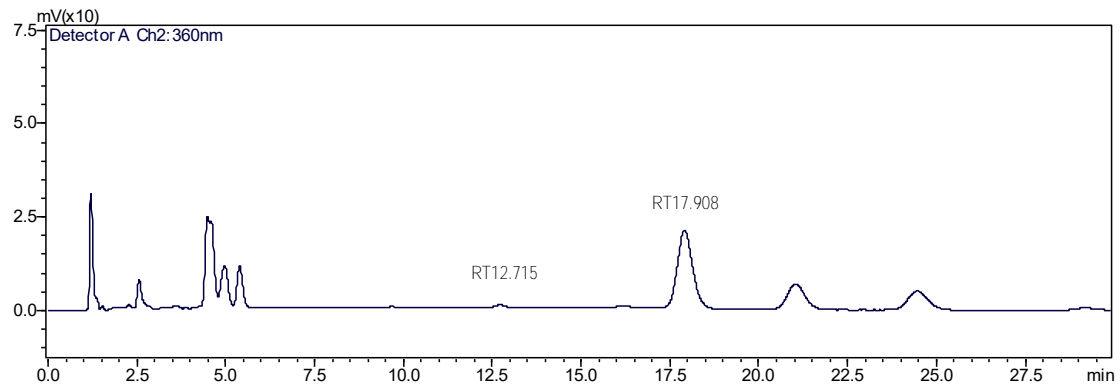


Figura 21. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis ácida.

- Hidrólisis básica

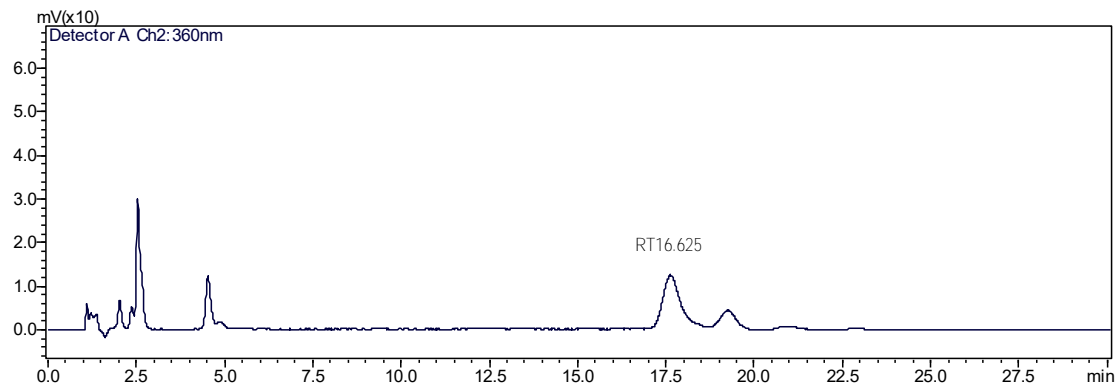


Figura 22. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis básica.

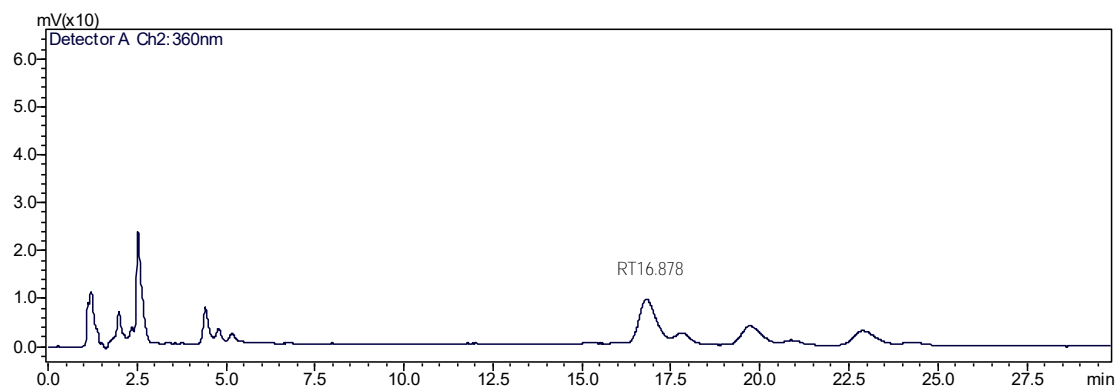


Figura 23. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis básica.



- Oxidación

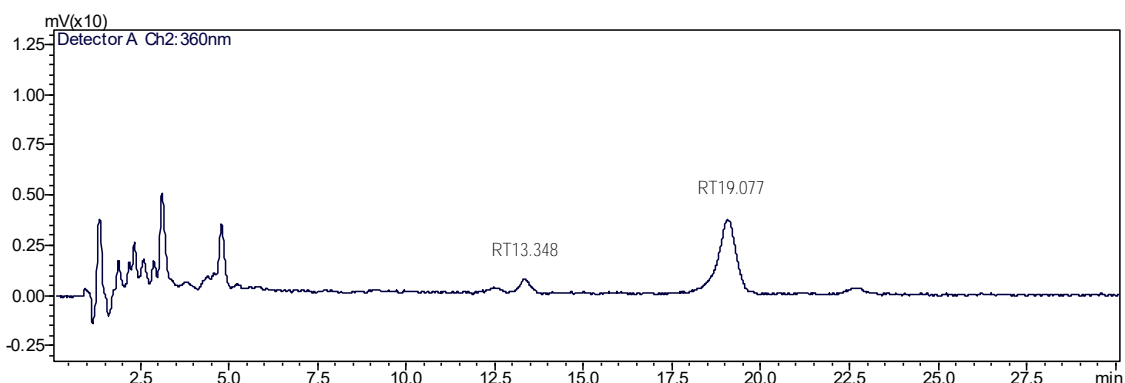


Figura 24. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL después de una oxidación con peróxido de hidrógeno.

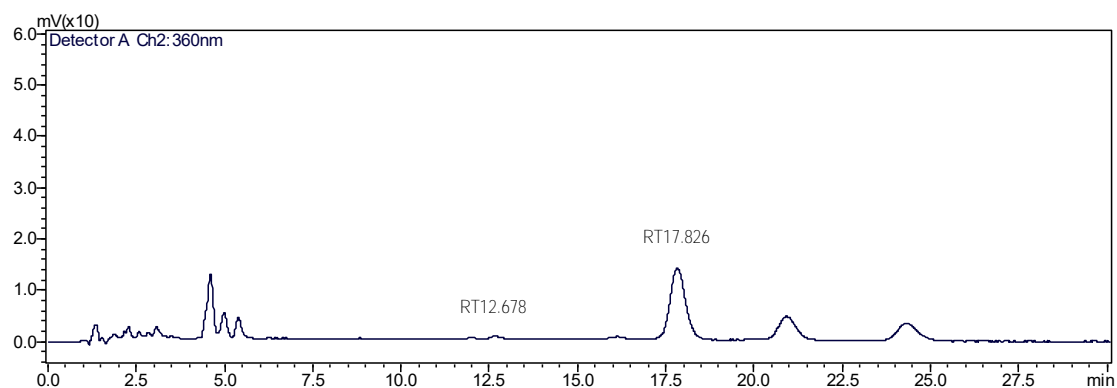


Figura 25. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL después de una oxidación con peróxido de hidrógeno.

Como se observa en las Cuadros 32 y 33 la curcumina y la desmetoxicurcumina se degradan significativamente bajo las condiciones de ensayo (más del 50%). En todos los casos se observa que la respuesta generada por los productos de degradación y los aditivos no interfieren con la respuesta atribuida a la curcumina y la desmetoxicurcumina, excepto en la degradación por hidrólisis básica del extracto de cúrcuma cuyo producto de degradación se encuentra cercano a la curcumina (Figura 23). Esto es consistente con lo reportado en la literatura ya que la degradación de las curcuminas ocurre a valores de pH superiores a 8 (Tomren, 2007).



Factor a evaluar	ÁREA PROMEDIO		% CURCUMINAS		% DEGRADACIÓN	
	DMC	C	DMC	C	DMC	C
Sin Tratamiento	97877	1656366	100	100	-	-
Degradación ácida	43645.5	736016.5	44.6	44.4	55.4	55.6
Degradación Básica	-	445307	-	26.9	100	73.1
Oxidación	18680	243934	19.1	14.7	80.9	85.3

Cuadro 32. Porcentaje de degradación de la curcumina y la desmetoxicurcumina en el estándar de curcumina.

Factor a evaluar	ÁREA PROMEDIO		% CURCUMINAS		% DEGRADACIÓN	
	DMC	C	DMC	C	DMC	C
Sin Tratamiento	45698	1451413	100	100	-	-
Degradación ácida	18398.5	669150.5	40.3	46.1	59.7	53.9
Degradación Básica	-	312289	-	21.5	100	78.5
Oxidación	12736	322372.5	27.9	22.2	72.1	77.8

Cuadro 33. Porcentaje de degradación de la curcumina y la desmetoxicurcumina en el extracto metanólico de cúrcuma.

Con base en estos hallazgos se deduce que el método es selectivo y específico para cuantificar curcuminas en las galletas de uso veterinario y que sólo bajo condiciones de hidrólisis básica los productos de degradación dificultarían el análisis.



5.4.2.6 Robustez

Los resultados de los métodos analíticos durante una corrida analítica pueden ser afectados por una serie de factores relacionados con las condiciones instrumentales o inherentes al propio método. Para investigar sus efectos bajo pequeños cambios deliberados se realiza un estudio de robustez que permite demostrar que el método analítico es capaz de mantener su desempeño, asegurando la confiabilidad de sus resultados.

Con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XV se evaluó un diseño de experimentos factorial 2^3 evaluando factores como el flujo, el volumen de inyección y la proporción de metanol en la fase móvil; la respuesta medida fue la resolución entre la curcumina y la desmetoxicurcumina (Cuadro 34).

Bloque	Flujo	MeOH	Vol. De inyección	R
1	1.5	5	10	8.060
1	1.5	15	10	6.321
1	1.1	5	10	8.755
1	1.1	15	30	5.810
1	1.1	5	30	8.561
1	1.5	5	30	7.566
1	1.5	15	30	5.270
1	1.1	15	10	6.984
2	1.1	5	10	8.522
2	1.5	5	30	7.697
2	1.1	15	10	7.139
2	1.5	15	30	5.382
2	1.1	5	30	8.331
2	1.1	15	30	5.891
2	1.5	15	10	6.429
2	1.5	5	10	8.123

Cuadro 34. Resultados experimentales para evaluar la robustez del método analítico.



$$\text{Resolución} = 11.314 - 1.664 \cdot \text{Flujo} - 0.149 \cdot \% \text{ MeOH} + 0.012 \cdot \text{Vol Inyección} + 0.019 \cdot \text{Flujo} \cdot \% \text{ MeOH} - 0.007 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Vol Inyección} - 0.004 \cdot \% \text{ MeOH} \cdot \text{Vol Inyección}$$

Cuadro 35. Ecuación que describe el modelo estadístico.

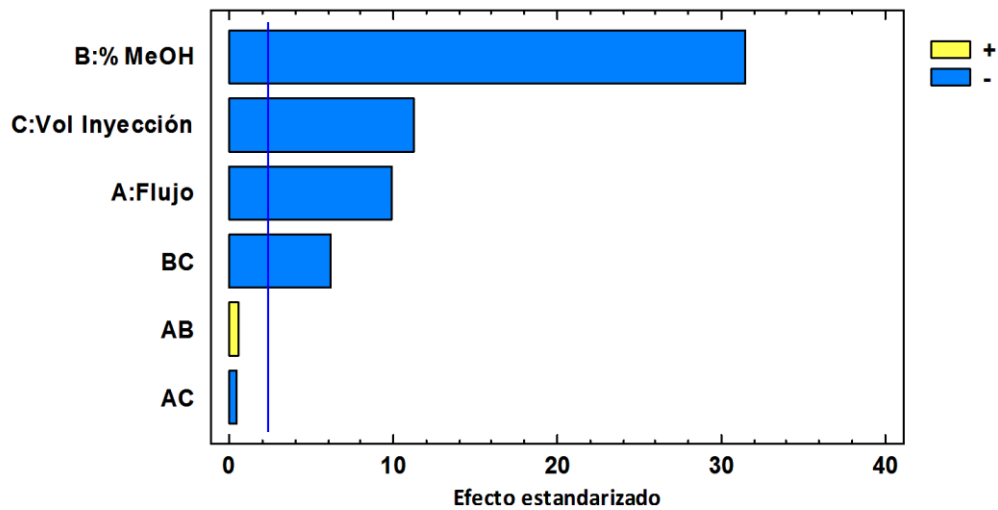
La ecuación que describe el modelo estadístico se muestra en la Cuadro 35. Con ayuda del análisis de varianza (Cuadro 36) se prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, cuatro efectos tienen un valor-P menor que 0.05 indicando que con un nivel de confianza del 95.0% son altamente significativos: efecto del cambio en el flujo (A), en la proporción de MeOH en la fase móvil (B), en el volumen de inyección (C) y en la combinación de estos últimos dos (BC),

El estadístico r^2 indica que el modelo ajustado explica 99.37% de la variabilidad en la resolución. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es de 98.81%. Puesto que el valor-P es mayor que 0.05 en los casos AB y AC, se dice que no presentan un efecto significativo en la resolución de las señales.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Flujo	1.6544	1	1.6544	97.69	0.0000
B:% MeOH	16.7875	1	16.7875	991.23	0.0000
C:Vol Inyección	2.1207	1	2.1207	125.22	0.0000
AB	0.0057	1	0.0057	0.33	0.5790
AC	0.0029	1	0.0028	0.16	0.6959
BC	0.6460	1	0.6460	38.14	0.0003
Bloques	0.0022	1	0.0022	0.13	0.7287
Error Total	0.1355	8	0.0169		
Total (corr.)	21.3547	15			
$r^2 = 99.37 \%$		r^2 (ajustada por g.l.) = 98.81 %			

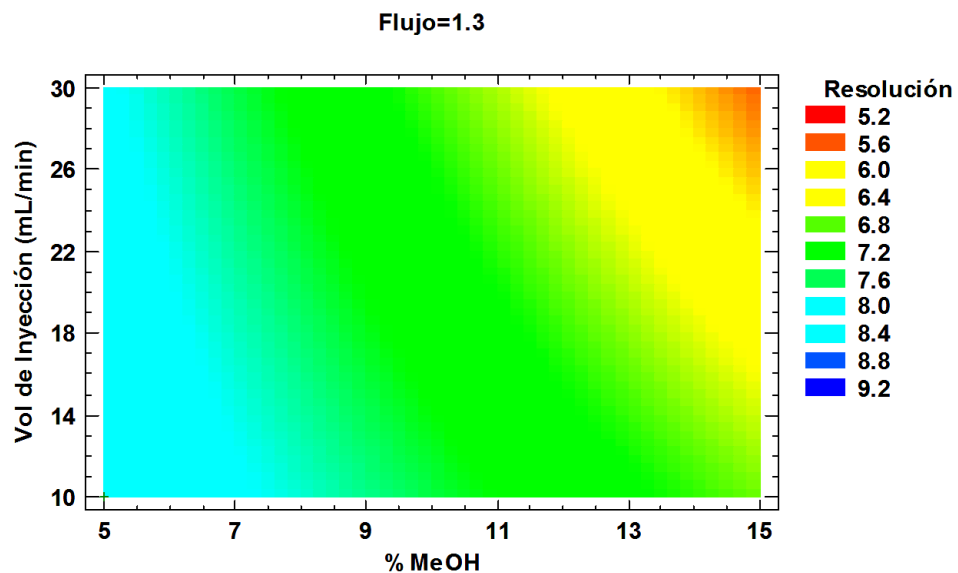
Cuadro 36. Análisis de Varianza para Resolución.





Gráfica 7. Diagrama de Pareto estandarizada para evaluar la robustez del método.

Por otro lado, de acuerdo con el diagrama de Pareto que se muestra en la Gráfica 7, de los tres factores analizados, el que ejerce menos influencia sobre la respuesta analítica es el flujo, de modo que para realizar la gráfica de contorno de superficie de respuesta (Gráfica 8) se mantiene el valor del flujo constante (1.3 mL/min).



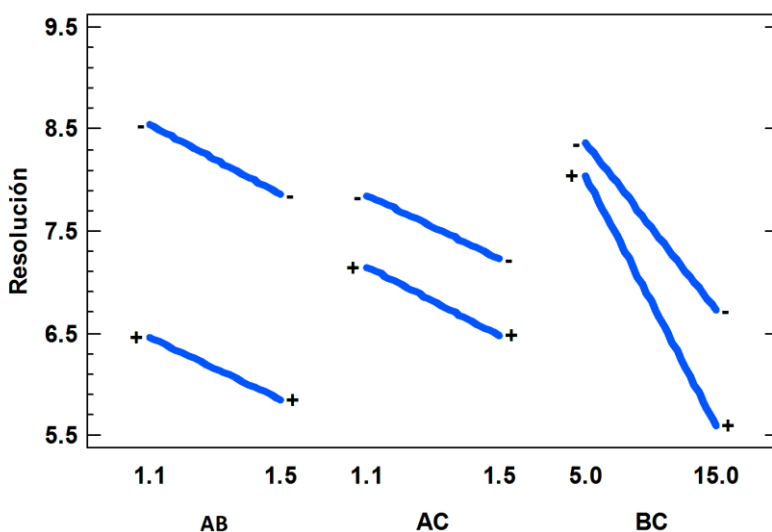
Gráfica 8. Contornos de superficie de respuesta estimada (resolución).



De la Gráfica 8 de contornos de superficie de respuesta se infiere que se obtiene una mejor resolución en tanto más cerca de la zona azul se trabaje (menor volumen de inyección y menor % de metanol), obteniendo el efecto inverso si se trabaja en las condiciones cercanas a la zona roja.

Con base en el modelo establecido la mayor resolución entre los picos se realizaría a un flujo de 1.3 mL/min, un volumen de inyección de 10 μ L y un 5% de MeOH en la fase móvil. Por el contrario, si utilizamos un 15% de MeOH y un volumen de inyección de 30 μ L se obtiene la resolución más baja.

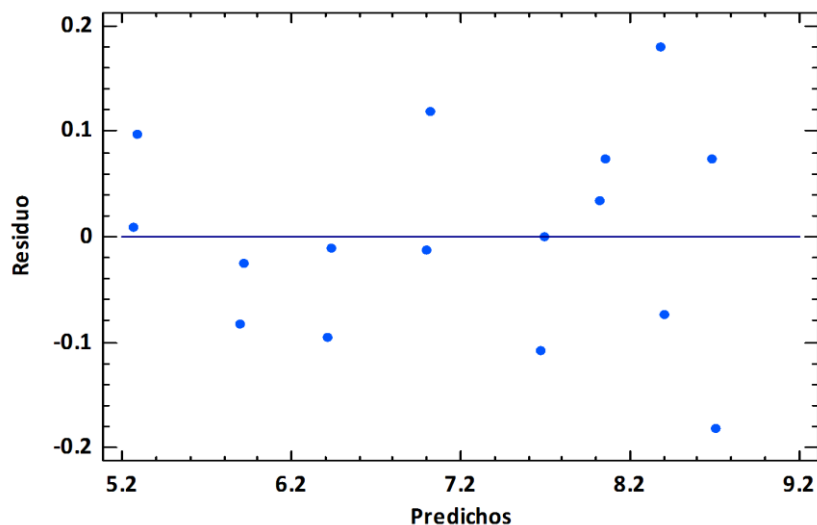
Finalmente, es importante mencionar que la Gráfica 9 ilustra que no existe interacción significativa entre los parámetros evaluados para la robustez del método al no observarse cruce de líneas.



Gráfica 9. Gráfica de interacciones para evaluar la robustez del método.

En la Gráfica 10 se ilustran los residuos contra los valores predichos de resolución. Cualquier patrón no aleatorio podría indicar que el modelo seleccionado no describe adecuadamente los datos observados, de modo que al observar una varianza homogénea nos aseguramos que el modelo es adecuado para ser empleado con fines de predicción de la respuesta analítica.





Gráfica 10. Gráfica de residuos para la respuesta analítica (resolución).

5.5 Cuantificación de curcuminas en diversos extractos de cúrcuma por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Las razones por las que las cantidades de curcumina varían entre una muestra y otra (Cuadro 37) son diversas, puede atribuirse a razones exclusivamente del origen, tales como la temperatura de cosecha, la zona, el tipo de riego e incluso la concentración de sales del agua de riego. También, pueden deberse a las condiciones de almacenamiento ya que, factores como la luz, la humedad o la carga microbiológica disminuyen su estabilidad y propician su degradación.

Como se observa en el Cuadro 37 únicamente la muestra EC-2 contiene 3.0 % de curcuminas (curcumina y desmetoxicurcumina). Este resultado se encuentra en armonía con la especificación establecida en la USP 37 para polvo de cúrcuma. Cabe destacar que no se cuantificó el contenido de bisdesmetoxicurcumina en la muestra. Por otra parte, los extractos 1, 3 y 4 presentan un porcentaje de curcuminas menor al 20.0%. De acuerdo con las especificaciones del mismo compendio farmacopeico dichos extractos no cumplen con los criterios de calidad para emplearse en la fabricación de insumos para la salud.



MUESTRA	AREA TOTAL	C [µg/mL]	Masa muestra [mg]	% Curcuminas
EC-1	1569759	50.296	44.9	1.07
EC-2	2251370	73.456	23.8	2.92
EC-3	1939698	63.028	24.5	2.43
EC-4	2089315	68.034	41.5	1.55
EC-5	1847936	59.958	42.6	1.33
EC-6	1893242	61.474	40.3	1.44
EC-7	1679037	54.307	41.5	1.24
EC-8	1383024	44.403	40.7	1.03

Cuadro 37. Resultados de la cuantificación de curcuminas en diferentes extractos por HPLC.

MUESTRA	AREA	t_R	% Curcuminas	
EC-1	DMC	76089	13.191	0.056
	C	1493670	18.804	1.013
EC-2	DMC	82274	13.132	0.111
	C	2169096	18.719	2.807
EC-3	DMC	64833	13.209	0.089
	C	1874865	18.844	2.345
EC-4	DMC	94892	13.245	0.077
	C	1994423	18.891	1.473
EC-5	DMC	78658	13.392	0.062
	C	1769278	19.141	1.270
EC-6	DMC	87154	13.283	0.072
	C	1806088	18.985	1.372
EC-7	BDMC	75826	13.636	0.061
	C	1603211	19.474	1.178
EC-8	BDMC	67879	13.658	0.056
	C	1315145	19.532	0.979

Cuadro 38. Resultados de la cuantificación por HPLC de curcumina y desmetoxicurcumina en la matriz farmacéutica.



Debido a que la curcumina y la desmetoxicurcumina se encuentran presentes de manera simultánea en la muestra para calcular su contenido se sumaron sus áreas y los resultados se expresan en términos de curcumina.

5.6 Cuantificación de curcuminas en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad).

La cuantificación de curcuminoides nos permite conocer con exactitud la dosis real administrada a los borregos para realizar el ensayo clínico.

Para determinar la cantidad exacta de curcumina y desmetoxicurcumina se empleó el método descrito en el numeral 5.5. Los resultados se resumen en la Cuadro 40.

Muestra	Peso \bar{x} (mg)	mg de curcuminas / galleta	% de curcuminas
Galleta placebo	2128.6	-	-
Galleta con 50 mg de extracto	2135.1	1.425	0.067
Galleta con 100 mg de extracto	2163.6	2.558	0.118
Galleta con 200 mg extracto	2210.1	5.825	0.264

Cuadro 39. Resultados de la cuantificación por HPLC de curcuminas en la matriz farmacéutica.

MUESTRA	AREA	t _R	curcuminas (mg/galleta)	% de curcuminas	
Galleta c/50 mg de extracto	Desmetoxicurcumina	444102	12.877	0.2643	0.003
	Curcumina	1994737	18.301	1.1606	0.074
Galleta c/100 mg de extracto	Desmetoxicurcumina	156801	12.871	0.2157	0.007
	Curcumina	1747548	18.289	2.3423	0.110
Galleta c/200 mg de extracto	Desmetoxicurcumina	69850	12.867	0.1984	0.011
	Curcumina	2026363	18.307	5.627	0.264

Cuadro 40. Resultados de la cuantificación por HPLC de curcumina y desmetoxicurcumina en la matriz farmacéutica.



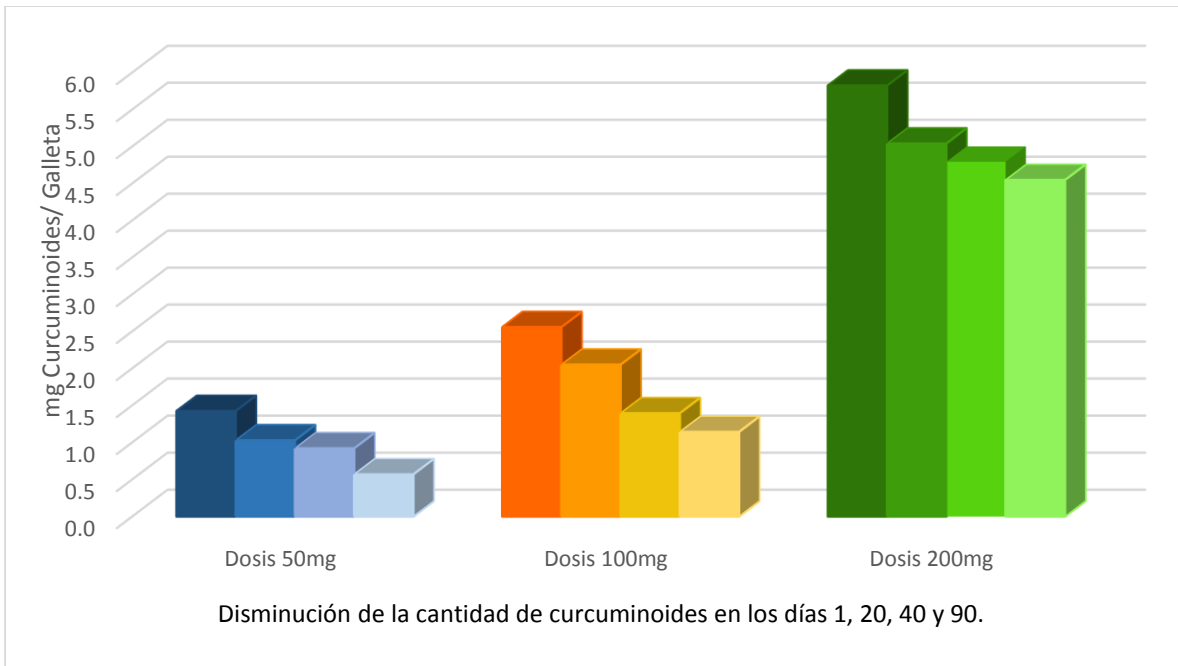
5.7 Estabilidad de curcuminas dentro de una matriz farmacéutica de uso veterinario

El estudio de la estabilidad de las galletas y su composición es de utilidad para garantizar que en el transcurso del tiempo la curcumina se mantiene estable en las condiciones de almacenamiento. Como se observa en la Cuadro 41 y la Gráfica 11, la estabilidad es afectada a lo largo de los noventa días de estudio, es decir, la cantidad de curcuminas disminuye en un 59.7%, 55.1% y 22.0% para las dosis de 50, 100 y 200 mg respectivamente. Por ende, las galletas deben administrarse antes del día 20 y deben ser almacenadas en condiciones de refrigeración a 2-4°C y resguardadas de la luz para garantizar la dosis ingerida.

Día de muestreo	Muestra	Área total	mg Curcuminas/ Galleta	% de curcuminas
1	Dosis 50mg	2438838.5	1.425	0.055
	Dosis 100mg	1904349.0	2.558	0.110
	Dosis 200mg	2096212.5	5.825	0.258
20	Dosis 50mg	1677321.5	1.029	0.039
	Dosis 100mg	2024150.5	2.051	0.092
	Dosis 200mg	2104898.5	5.041	0.223
40	Dosis 50mg	1794396.0	0.921	0.035
	Dosis 100mg	1269291.5	1.395	0.062
	Dosis 200mg	2358920.0	4.794	0.213
90	Dosis 50mg	1017220.5	0.570	0.025
	Dosis 100mg	1005043	1.143	0.052
	Dosis 200mg	2175551.5	4.548	0.205

Cuadro 41. Resultados de la cuantificación de curcuminas para determinar su estabilidad en la matriz farmacéutica.





Gráfica 11. Relación de estabilidad de las curcuminas dentro de la matriz farmacéutica.



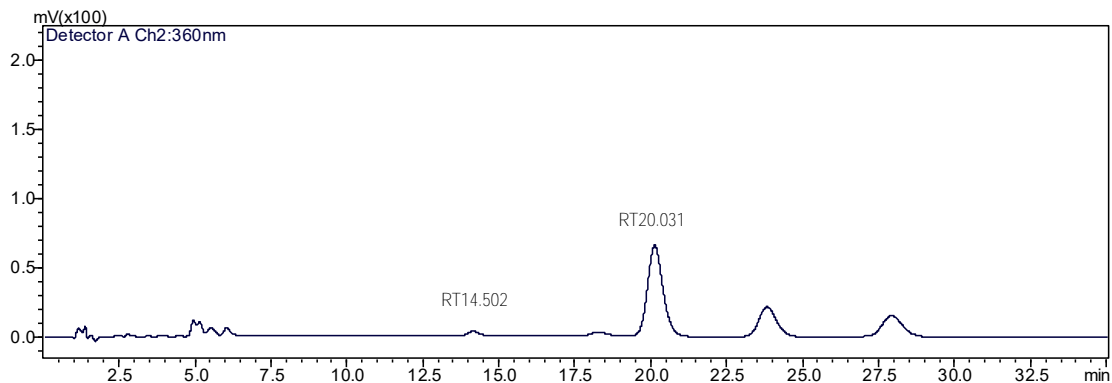
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Se desarrolló un método analítico primario utilizando espectrofotometría UV para cuantificar e identificar curcuminas totales.
- Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar curcumina y desmetoxicurcumina en cúrcuma en polvo, extractos de cúrcuma y en una matriz farmacéutica destinada a la administración en ovinos. Éste método fue validado de acuerdo con los estándares que establecen las guías nacionales e internacionales asegurando que es adecuado para los fines que se pretenden.
- Se cuantificó la curcumina y la desmetoxicurcumina en los diversos polvos y extractos de cúrcuma encontrándose que la muestra con la mayor cantidad de curcuminoides es el polvo EC-2 que se distribuye en el Estado de México.
- El polvo de cúrcuma utilizado para la fabricación de las galletas tiene en su composición 2.8% y 0.1% de curcumina y desmetoxicurcumina, respectivamente (3.0% en total). Estos resultados se encuentran en armonía con las especificaciones de calidad descritas en la USP 37.

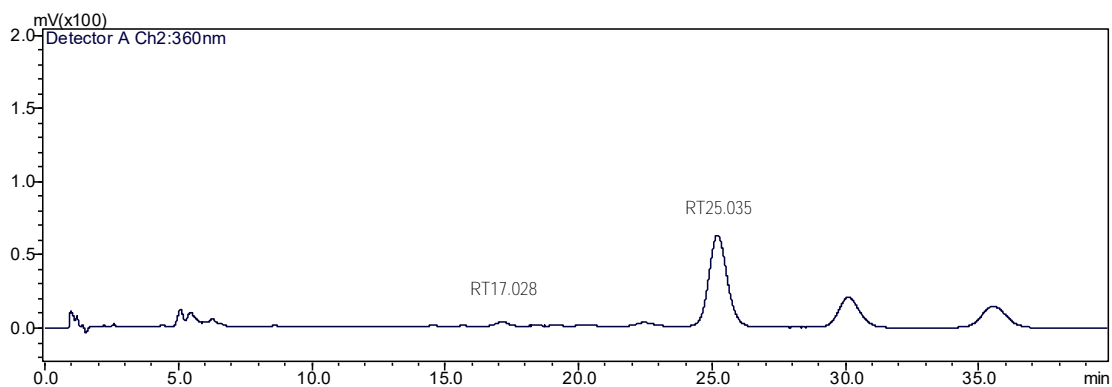
Como perspectiva se plantea estandarizar y/o validar el método de fabricación de las galletas para asegurar la uniformidad en las unidades de dosificación. También, se pretende realizar estudios de formulación para aumentar la estabilidad de las curcuminas en las galletas de uso veterinario.



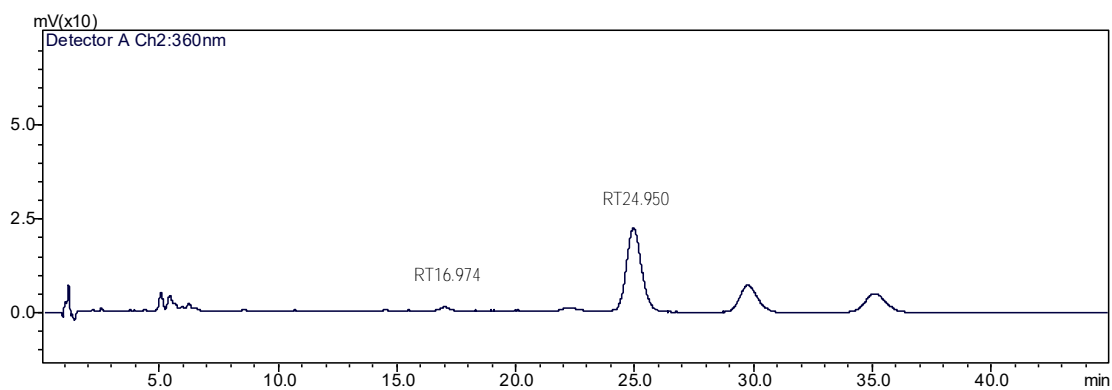
ANEXO I. Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método para la cuantificación de curcuminas por HPLC



Cromatograma generado bajo condiciones normales de operación. (Porcentaje de MeOH: 10%), flujo: 1.3 mL/min y volumen de inyección 20 μ L)

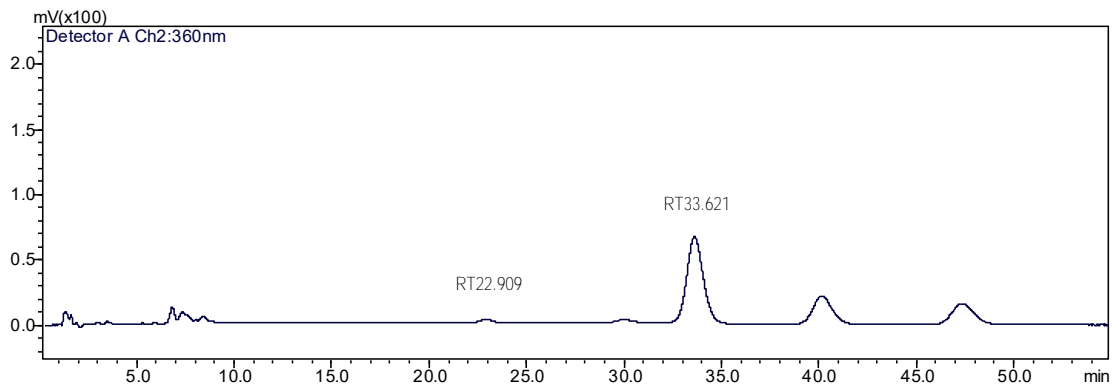


Cromatograma generado con 5% de MeOH, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 30 μ L.

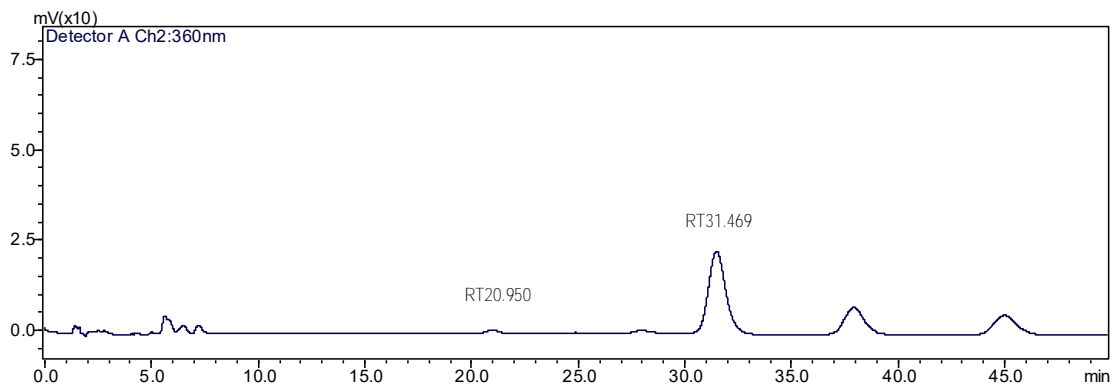


Cromatograma generado con 5% de MeOH, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 10 μ L.

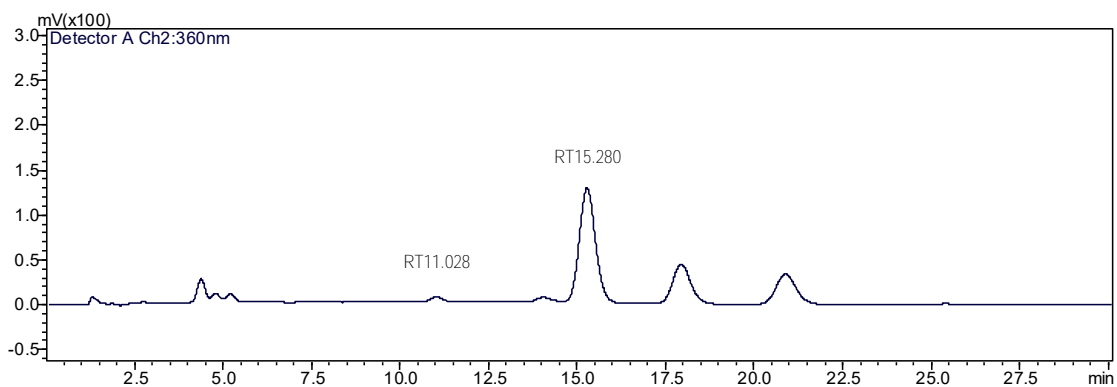




Cromatograma generado con 5% de MeOH, flujo de 1.1 mL/min y volumen de inyección 30 μ L.

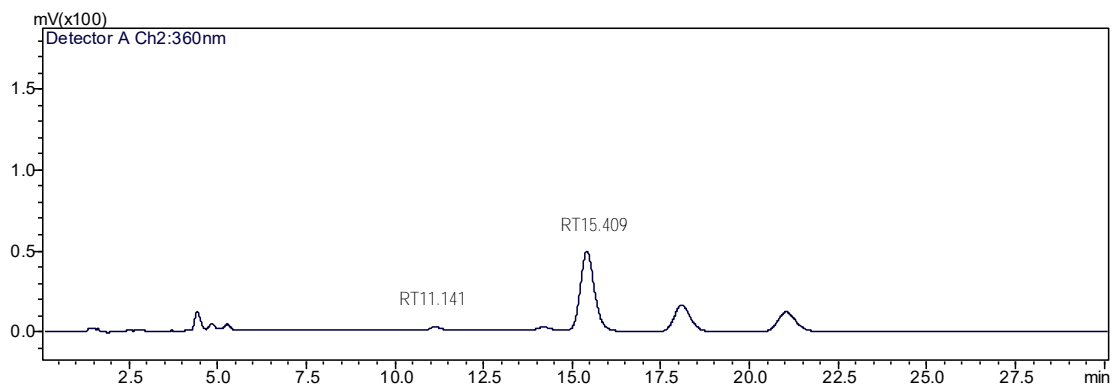


Cromatograma generado con 5% de MeOH, flujo de 1.1 mL/min y volumen de inyección 10 μ L.

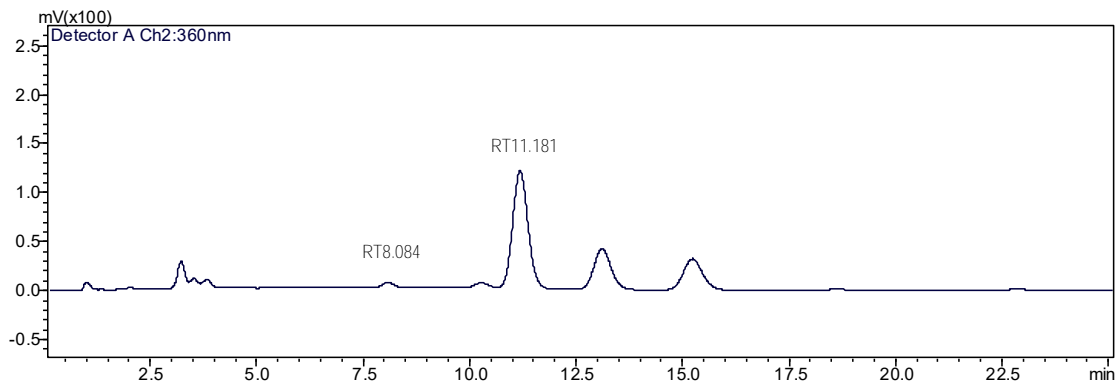


Cromatograma generado con 15% de MeOH, flujo de 1.1 mL/min y volumen de inyección 30 μ L.

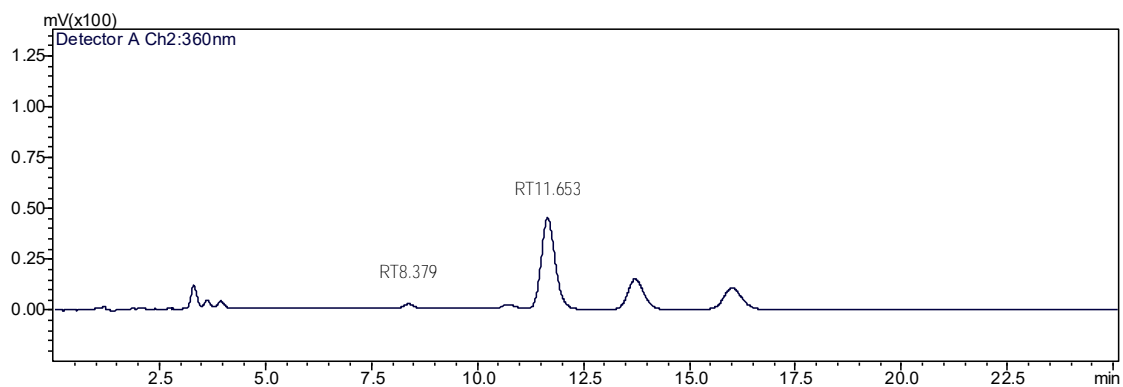




Cromatograma generado con 15% de MeOH, flujo de 1.1 mL/min y volumen de inyección 10µL.



Cromatograma generado con 15% de MeOH, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 30µL.



Cromatograma generado con 15% de MeOH, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 10µL.



LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Colorimetría de los indicadores de pH de la curcuminas.	7
Cuadro 2. Principales usos de la cúrcuma en la medicina tradicional	9
Cuadro 3. Procedencia de las muestras de <i>C. longa</i>	12
Cuadro 4. Niveles de concentración de la curva de calibración.	13
Cuadro 5. Preparación de curvas para evaluar la linealidad del sistema.	17
Cuadro 6. Condiciones de degradación de la curcumina.	20
Cuadro 7. Condiciones experimentales para evaluar la robustez del método analítico.	21
Cuadro 8. Máximos de absorción observados en la mezcla de curcuminas.	23
Cuadro 9. Resumen de los datos experimentales para evaluar la linealidad del sistema.	24
Cuadro 10. Linealidad del sistema para cuantificar curcuminas por espectrofotometría UV.	25
Cuadro 11. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema.	25
Cuadro 12. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema.	26
Cuadro 13. Datos obtenidos para evaluar la precisión del sistema.	27
Cuadro 14. Cuantificación de curcuminas presentes en diversos extractos comerciales.	28
Cuadro 15. Resultados de la cuantificación de curcuminas en la matriz farmacéutica (galleta).	28
Cuadro 16. Parámetros cromatográficos del método.	33
Cuadro 17. Adecuabilidad del sistema.	35
Cuadro 18. Precisión del sistema.	35
Cuadro 19. Resumen de los datos experimentales para evaluar la linealidad del sistema.	36
Cuadro 20. Parámetros de linealidad del sistema.	37
Cuadro 21. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema.	37



Cuadro 22. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema.	38
Cuadro 23. Repetibilidad del método.	39
Cuadro 24. Reproducibilidad del método.	40
Cuadro 25. Linealidad del método y exactitud.	41
Cuadro 26. Parámetros de linealidad del método.	42
Cuadro 27. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método.	42
Cuadro 28. Análisis de varianza de la regresión lineal del método.	42
Cuadro 29. Linealidad del método para determinar la exactitud.	44
Cuadro 30. Resultados obtenidos durante la degradación forzada del estándar de curcuminas.	46
Cuadro 31. Resultados obtenidos durante la degradación forzada del extracto de cúrcuma.	46
Cuadro 32. Porcentaje de degradación de la curcumina y la desmetoxicurcumina en el estándar de curcumina.	50
Cuadro 33. Porcentaje de degradación de la curcumina y la desmetoxicurcumina en el extracto metanólico de cúrcuma.	50
Cuadro 34. Resultados experimentales para evaluar la robustez del método analítico.	51
Cuadro 35. Ecuación que describe el modelo estadístico.	52
Cuadro 36. Análisis de Varianza para Resolución.	52
Cuadro 37. Resultados de la cuantificación de curcuminas en diferentes extractos por HPLC.	56
Cuadro 38. Resultados de la cuantificación por HPLC de curcumina y desmetoxicurcumina en la matriz farmacéutica.	56
Cuadro 40. Resultados de la cuantificación por HPLC de curcuminas en la matriz farmacéutica.	57
Cuadro 40. Resultados de la cuantificación por HPLC de curcumina y desmetoxicurcumina en la matriz farmacéutica.	57
Cuadro 41. Resultados de la cuantificación de curcuminas para determinar su estabilidad en la matriz farmacéutica.	58



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panta y rizoma de <i>Curcuma longa</i>	4
Figura 2. Estructura química de los curcuminas principales.....	5
Figura 3. Productos de degradación de la curcumina en condiciones fisiológicas.	8
Figura 4. Vista en microscopio del parásito <i>Eimeria</i> (x400).....	10
Figura 5. Galletas realizadas para su administración en ovinos: A. placebo, B. dosis de 50 mg de extracto,	22
Figura 6. Espectro en el UV-VIS de la mezcla de curcuminas a una concentración de 100 µg/mL.	23
Figura 7. Cromatograma con detección UV generado por la mezcla de curcuminas empleadas como estándar.	29
Figura 8. Cromatograma iónico total para la desmetoxicurcumina.....	30
Figura 9. Cromatograma iónico total para la curcumina.	30
Figura 10. Cromatograma con detección UV generado para el polvo de cúrcuma EC-2.	31
Figura 11. Cromatograma iónico total para la bisdesmetoxicurcumina.	31
Figura 12. Cromatograma obtenido con el estándar de referencia a una concentración de 100 µg/mL.	32
Figura 13. Cromatograma obtenido con el extracto metánolico de cúrcuma a una concentración de 100 µg/mL.	33
Figura 14. Cromatograma de una solución estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL.	34
Figura 15. Cromatograma obtenido con los aditivos de la formulación (placebo).	45
Figura 16. Cromatograma obtenido con los aditivos de la formulación (placebo) y curcumina (100 µg/mL).....	45
Figura 17. Cromatograma obtenido con los aditivos de la formulación (placebo) y extracto de curcumina (100 µg/mL).	45
Figura 18. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL.	47



Figura 19. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL.	47
Figura 20. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis ácida.	47
Figura 21. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis ácida.....	48
Figura 22. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis básica.....	48
Figura 23. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL después de una hidrólisis básica.....	48
Figura 24. Cromatograma obtenido con el estándar de curcuminas a una concentración de 60 µg/mL después de una oxidación con peróxido de hidrógeno. ...	49
Figura 25. Cromatograma obtenido con el extracto de cúrcuma a una concentración de 60 µg/mL después de una oxidación con peróxido de hidrógeno.....	49



LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar curcuminas por espectrofotometría UV.	24
Gráfica 2. Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema.	26
Gráfica 3. Linealidad del sistema para cuantificar curcuminas por HPLC.	37
Gráfica 4. Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema.	38
Gráfica 5. Linealidad del método para cuantificar curcuminas por HPLC.....	41
Gráfica 6. Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del método.	43
Gráfica 7. Diagrama de Pareto estandarizada para evaluar la robustez del método. .	53
Gráfica 8. Contornos de superficie de respuesta estimada (resolución).	53
Gráfica 9. Gráfica de interacciones para evaluar la robustez del método.	54
Gráfica 10. Gráfica de residuos para la respuesta analítica (resolución).	55
Gráfica 11. Relación de estabilidad de las curcuminas dentro de la matriz farmacéutica.	59



REFERENCIAS

1. Aggarwal, B., Sundaram, C., Ichikawa, H., y Malani, N. (2007) Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Texas, Estados Unidos de América. p. 2 - 3.
2. Ali, Imran, Haque, Ashul, y Saleem, Kishwar. (2014). Separation and identification of curcuminoids in tumeric powder by HPLC using phenyl column. *The Royal Society of Chemistry*. India. p. 2526 - 2534.
3. Basnet, Purusotam y Skalko-Basnet, Natasa (2011) Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules*. Noruega. p. 4568 - 4577.
4. Bernabé Pineda, Margarita., Ramírez Silva, Ma. Teresa., Romero Romo, Mario., González Vergara, Enrique., y Rojas Hernández, Alberto. (2004) Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. UAM. México, D. F.
5. Esatbeyoglu, Tuba., Huebbe, Patricia., Ernst, Insa., Chin, Dawn., Wagner, Anika. y Rimbach, Gerald. (2012) Curcumin – From Molecule to Biological Function. *Angew Chem*. Alemania. p. 5313 - 5315.
6. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2014) Comisión Permanente de la Farmacopea. Tomo II. 11ª Edición. Secretaría de Salud. México.
7. Farmacopea de los Estados Unidos de América (2014) Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales. USP 37. Estados Unidos de América. 387, 5938 - 5939.
8. Gary D, Christian. (2009) Química Analítica. Mc Graw Hill. Sexta Edición. México, D. F. p. 126 - 132.
9. González Elizondo, Martha., López Enríquez, Lorena., González Elizondo, Socorro. y Tena Flores, Jorge. (2004) Plantas Medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. México, D. F. p. 11.
10. Guía de Validación de Métodos Analíticos (2000). Emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. México. p. 17 - 39.



-
-
11. Hernández Magaña, R, y Gally, Mireya. (1989). Plantas Medicinales. México, D.F. p. 7 - 8. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=PwvTU-CE6mIC&lpg=PP1&dq=Hern%C3%A1ndez%20Maga%C3%B1a%2C%20Plantas%20Medicinales.&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q&f=false>
 12. Houghton, Peter y Mukherjee, Pulok K. (2009). Evaluation of Herbal Medicinal Products. Perspectives on quality, safety and efficacy. Capítulo 23. Londres, Reino Unido. p. 322 - 325, 330 - 333.
 13. Jayaprakasha, G., Jagan-Mohan, R., y Sakariah, K. (2005) Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Rev. Food Science & Technology*. Mysore, India. p. 536 - 537.
 14. Kiran Sharma, S., y Agrawal, Monica G. (2012) Development and Validation of UV spectrophotometric method for the estimation of Curcumin in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Forms. *Rev. International Journal of Drug Development & Research*. India. p. 376.
 15. Ley General de Salud (2015) Capítulo IV, Art. 224. México. p. 77 - 79.
 16. NOM-012-ZOO-1993. (Última publicación en el DOF 2004) Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Diario Oficial de la Federación. México. p. 8.
 17. Organización Mundial de la Salud. (2013) Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. Ginebra, Suiza. p. 7.
 18. Pérez Fonseca, Agustín. (2010) Evaluación de la eficacia anticoccidiana de los extractos de curcumina y naringenina administrados a borregos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria* spp. UNAM. México, D. F. p. 6 - 10, 28, 33.
 19. Ravindran, P. N., Nirmal Babu, K., y Sivaraman, K. (2007) Tumeric-The Genus *Curcuma*. Medicinal and Aromatics Plants – Industrial Profiles. CRC Press. Florida, Estados Unidos de América. p. 2.
 20. Reglamento de Insumos para la Salud (2016) Título Tercero, Art. 88. México. p. 14.
 21. Rojas Alba, Mario. (2009) Tratado de Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I. México. p. 395 - 397.
 22. Saiz de Cos, Paula. (2014) *Curcuma longa* L. *Reduca*. Serie Botánica. Madrid, España. p. 84 - 85, 89.



-
-
23. Scartezzini, P. y Sperroni, E. (2000) Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*. Bologna, Italia. p. 27.
24. Skoog, D., James, F., y Nieman, T. (2001) Principios de Análisis Instrumental. 5ª Edición. Mc Graw Hill. España. p. 985 - 992.
25. Taylor, M. A., Coop, R. L., y Wall, R. L. (2007) Veterinary Parasitology. 3ª Edición. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido. p. 203 - 213.
26. Tomren, M. A., Másson, T., Loftsson, T., y Hjorth Tonnesen, H. (2007) Studies on curcumin and curcuminoids: XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. Oslo, Noruega. p. 27, 30 - 32.
27. Verma, Mahendra., Najjar, Ishtiyah., Tikoo, Manoj., Singh, Gurdarshan., Gupta, Devinder., Anand, Rajneesh., Khajuria, Ravi. y Johri, Rakesh. (2013) Development of a validated UPLC-qTOF-MS Method for the determination of curcuminoids and their pharmacokinetic study in mice. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. Jammu, India. p. 7.
28. Vignau, M. Laura., Venturini, Lucila., Romero, Jorge., Eiras, Diego. y Basso, Ubaldo. (2005) Parasitología práctica y modelos de enfermedades para sitarias en los animales domésticos. Buenos Aires, Argentina. p. 18 - 21.
29. Ying Jan, Wang., Min Hsiung, Pan., Ann Lii, Cheng., Liang In, Lin., Yuan Soon, Ho., Chang Yao, Hsieh. y Jen Kun, Lin. (1997) Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Taipei, Taiwan. p. 1869 - 1873.

