



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de curcumina como materia prima.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN FARMACIA**

PRESENTA:

CARLOS GERARDO SANDOVAL RIVAS

ASESOR: M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito

COASESOR: Dra. Raquel López Arellano

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2017



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de curcumina como materia prima.

Que presenta el pasante: **Carlos Gerardo Sandoval Rivas**
Con número de cuenta: **309321347** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Farmacia.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a de de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F.C. María Eugenia Posada Galarza	
VOCAL	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	M.C. Elvia Adriana Morales Hipólito	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas	
2do. SUPLENTE	L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo.

-Rita Mae Brown

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, enorme institución, mi segunda casa, que me abrió sus puertas a cambio de prácticamente nada, y que en cambio lleno mi vida en todo sentido.

A mis padres y hermanos los cuales son los pilares responsables de que este aquí, fuente constante de energía y aliento, apoyo incansable e incondicional. Espero ser capaz de pagarles todo lo que me dieron. Gracias.

A Aide Arenas porque estuviste durante esta trayectoria, en momentos que fueron difíciles para mí, estoy seguro que también para ti, sin embargo, ahí estabas para apoyarme.

A Dra. Raquel López Arellano por abrirme las puertas del LEDEFAR, igualmente al D.A.R.R Juan José Díaz Esquivel que me brindaron el enorme apoyo material y académico, que estoy seguro va más allá del alcance y responsabilidad que les compite, los admiro, respeto y ahora se volvieron grandes amigos.

A M. Elvia Adriana Morales Hipólito asesora de este trabajo, por tomarse ese tiempo dedicándolo a este trabajo, corrigiendo y apoyando la elaboración de este trabajo, tal vez suene poco, pero no es regla que un componente por ser pequeño sea de poco valor.

A el equipo de trabajo en el LEDEFAR: Mariana, Gaby, Claudia, Hugo, Adriana, Dr. Juan José, Dra. Raquel, Daniel, Bruno, los cuales crean un ambiente de trabajo muy agradable, y también son fuente de conocimiento y de apoyo sin condiciones, de todos aprendí poco o mucho, pero invaluable cada granito de arena que dio cada uno.

Al Laboratorio de Química Verde en FESC Campo 1, por permitirme usar sus instalaciones y su equipo para realizar parte del trabajo de esta tesis, así como a quienes me apoyaron en la obtención de curcumina estándar... al Dr. Rene Miranda Ruvalcaba y Q. Pablo Mendoza

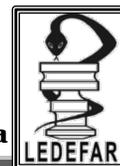
A Técnico de Microscopio por el apoyo en la obtención de las fotografías de productos de curcumina con microscopía electrónica

A las grandes personas que forman el jurado evaluador, mis sinodales:

M.F.C Ma. Eugenia R. Posada Galarza,
D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez,
M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito,
Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas,
L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez

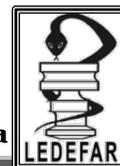
que también fueron personajes relevantes, importantes e influyentes durante mi formación, aportando su tiempo y conocimiento para llenar un porcentaje de aquel profesional que busco ser. Agradezco el tiempo que siguen brindándome ahora en la revisión y evaluación de este trabajo.

A Laboratorios Mixim por el apoyo con la materia prima cúrcuma

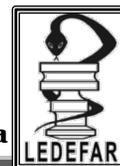


ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN	XV
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
3. MARCO TEORICO.....	3
3.1. CÚRCUMA	3
3.1.1. <i>Curcumina</i>	10
3.1.1.1. Descripción.....	12
3.1.1.2. Propiedades fisicoquímicas	12
3.1.1.3. Estabilidad	13
3.2. DISOLUCIÓN	14
3.2.1. <i>Importancia de la disolución</i>	14
3.2.2. <i>Teoría de la disolución</i>	15
3.2.3. <i>Velocidad de disolución intrínseca</i>	19
3.2.4. <i>Factores que influyen en la velocidad de disolución</i>	20
3.2.4.1. Factores fisicoquímicos de la sustancia.....	20
3.2.4.2. Parámetros de la prueba	21
3.2.5. <i>Desarrollo de un nuevo método de disolución</i>	25
3.2.6. <i>Equipos de disolución</i>	27
3.2.6.1. Métodos con vaso.....	27
3.2.6.2. Otros métodos	29
3.3. CROMATOGRAFÍA	31
3.3.1. <i>Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución</i>	32
3.3.1.1. Antecedentes.....	32
3.3.1.2. Campo de aplicación	32
3.3.1.3. Parámetros cromatográficos	33
3.3.1.4. Conformación del cromatógrafo de líquidos	35
4. HIPOTESIS.....	37
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38
5.1. MATERIALES	38
5.2. METODO.....	40
5.2.1. <i>Separación de curcumina</i>	41
5.2.1.1. Selección de condiciones para cromatografía preparativa en columna.....	41
5.2.1.2. Cromatografía preparativa en columna	41



5.2.2.	<i>Definición del sistema para cuantificar curcumina por CLAR con DAD</i>	45
5.2.2.1.	Selección de condiciones del método analítico en CLAR	45
5.2.2.2.	Método analítico en CLAR	46
5.2.3.	<i>Validación del proceso de disolución</i>	49
5.2.3.1.	Selección de condiciones para el perfil de disolución de curcumina.....	49
5.2.3.2.	Velocidad de disolución intrínseca	50
6.	RESULTADOS Y ANALISIS	52
6.1.	SEPARACIÓN DE LA CURCUMINA	52
6.1.1.	<i>Caracterización fisicoquímica</i>	53
6.2.	DEFINICIÓN DEL SISTEMA PARA CUANTIFICAR CURCUMINA POR CLAR	59
6.2.1.	<i>Desarrollo del método analítico por CLAR</i>	59
6.2.2.	<i>Validación del método analítico</i>	77
6.2.3.	<i>Solubilidad de productos con curcumina</i>	80
6.3.	VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN INTRÍNSECA	81
6.3.1.	<i>Desarrollo del método para perfiles de VDI de curcumina</i>	81
6.3.1.1.	Desarrollo en UV-Vis	81
6.3.1.2.	Desarrollo en CLAR	85
6.3.2.	<i>Perfiles de Disolución Intrínseca</i>	89
7.	CONCLUSIONES	91
8.	REFERENCIAS	92
9.	ANEXOS	96



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación de los métodos cromatográficos de columna -----	31
Tabla 2 Parámetros cromatográficos -----	34
Tabla 3 Relaciones cromatográficas importantes -----	34
Tabla 4 Características de los detectores para CLAR -----	36
Tabla 5 Niveles de concentración para evaluar linealidad del sistema de curcumina -----	47
Tabla 6 Niveles de concentración para evaluar precisión del sistema de curcumina -----	48
Tabla 7 Parámetros cromatográficos obtenidos en CLAR-DAD, de curcumina pura a 0.768 µg/mL -----	53
Tabla 8 Desplazamientos químicos de Hidrogeno (H) y Carbono (C) en los espectros RMN ¹³ C y ¹ H de curcumina -----	57
Tabla 9 Resultados de parámetros cromatográficos con diferentes columnas cromatográficas -----	59
Tabla 10 Resultados de parámetros cromatográficos con diferentes proporciones de fase móvil -----	60
Tabla 11 Resultados de parámetros cromatográficos con diferentes velocidades de flujo --	61
Tabla 12 Análisis de varianza para área -----	62
Tabla 13 Suma de cuadrados para área -----	62
Tabla 14 Coeficientes del modelo su valor absoluto y el error estándar determinado para el área del pico -----	63
Tabla 15 Análisis de varianza para tiempo de retención -----	65
Tabla 16 Suma de cuadrados para tiempo de retención -----	65
Tabla 17 Coeficientes del modelo, su valor absoluto y el error estándar determinado para el tiempo de retención de curcumina -----	66
Tabla 18 Análisis de varianza para resolución -----	68
Tabla 19 Suma de cuadrados para resolución -----	68
Tabla 20 Coeficientes del modelo, su valor absoluto y el error estándar determinado para la resolución de curcumina-demetoxicurcumina (C-DMC) -----	69
Tabla 21 Resultados de parámetros cromatográficos con diferente volumen de inyección a 1 mL/min -----	71
Tabla 22 Estadísticas de la regresión de la linealidad del volumen de inyección -----	71
Tabla 23 Resultados de parámetros cromatográficos de curcumina con diferentes tratamientos de filtrado a 1 mL/min -----	73
Tabla 24 Resumen estadístico del área para curcumina 0.832 µg/mL -----	74
Tabla 25 ANOVA del tratamiento de filtración de curcumina a 0.832 µg/mL -----	74

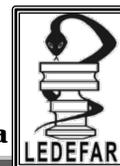


Tabla 26 Comparación múltiple para determinar las medias significativamente diferentes de otras. Método: diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey 95 % -----	75
Tabla 27 ANOVA del tratamiento de filtración de curcumina a 0.832 µg/mL • Acrodisc GHP 0.45 µm - N.A -----	76
Tabla 28 Resumen estadístico del área para curcumina 0.104 µg/mL-----	76
Tabla 29 ANOVA del tratamiento de filtración de curcumina a 0.104µg/mL -----	76
Tabla 30 Resultados de adecuabilidad para cuantificar curcumina-----	77
Tabla 31 Concentración de curcumina (µg/mL) y su respuesta analítica (área) obtenidas para evaluar la linealidad del sistema -----	77
Tabla 32 Resultados del análisis de regresión e intervalo de confianza (95%) de la ordenada al origen -----	78
Tabla 33 Análisis de varianza realizado para determinar la relación lineal entre la concentración de curcumina y la respuesta analítica (área)-----	79
Tabla 34 Concentración de curcumina (µg/mL) y su respuesta analítica (área) obtenidas para evaluar la precisión del sistema -----	79
Tabla 35 Resultados de la solubilidad de curcumina y de la concentración en los medios de disolución -----	80
Tabla 36 Absorbancias en diferentes medio de disolución y diferentes concentraciones de curcumina tomadas a 425 nm -----	81
Tabla 37 Factores a evaluar en VDI de curcumina con cuantificación en espectrofotometría UV-Vis -----	82
Tabla 38 Resultados Abs vs tiempo de curcumina sigma Aldrich condición 1 -----	83
Tabla 39 Resultados Abs vs Tiempo de curcumina sigma Aldrich condición 2 -----	84
Tabla 40 Factores a evaluar en VDI de curcumina con cuantificación en CLAR con DAD85	
Tabla 41 Velocidad de disolución intrínseca, obtenida por regresión lineal-----	85
Tabla 42 Velocidad de disolución intrínseca, obtenida por regresión lineal-----	86
Tabla 43 Análisis de varianza para constante k de VDI -----	87
Tabla 44 Suma de cuadrados para constante k de VDI -----	87
Tabla 45 Coeficientes del modelo su valor absoluto y el error estándar determinado constante k de VDI-----	87
Tabla 46 Valores de K para curcumina obtenidos en medios diferentes y otros parámetros estadísticos -----	89
Tabla 47 Resultados cromatográficos para la adecuabilidad del sistema en la cuantificación de curcumina-----	98
Tabla 48 Resultados cromatográficos para la linealidad del sistema en la cuantificación de curcumina -----	98
Tabla 49 Resultados cromatográficos para la precisión del sistema en la cuantificación de curcumina -----	99
Tabla 50 Factores controlados durante el desarrollo del método analítico y sus respuestas -----	100

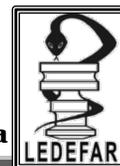
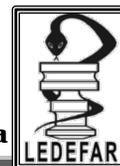


Tabla 51 Factores controlados durante el desarrollo del método analítico y su codificación	101
Tabla 52 Resultados de absorbancia de la disolución de curcumina Sigma Aldrich de la Condición 1	102
Tabla 53 Resultados de absorbancia de la disolución de curcumina Sigma Aldrich. Condición 2	102
Tabla 54 Factores controlados durante el desarrollo del método de disolución, su codificación y la respuesta correspondiente	102
Tabla 55 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca en condiciones: 50 rpm, 1 Ton, Tween 80 al 0.5%	103
Tabla 56 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca en condiciones: 75 rpm, 0.7 Ton, Tween 80 al 1.5%	103
Tabla 57 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca caracterización Buffer Fosfatos	104
Tabla 58 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca caracterización Buffer HCl	104



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Planta y flor de Cúrcuma (Cúrcuma Longa L.)-----	3
Figura 2 Recolección de Cúrcuma en India -----	4
Figura 3 Cúrcuma rizoma fresco y droga seca (rizoma) -----	5
Figura 4 Constituyentes seleccionados de cúrcuma. -----	6
Figura 5 Resultados estadísticos de los trabajos sobre curcumina publicados por año (1950-2016)-----	10
Figura 6 Resultados estadísticos de los trabajos sobre curcumina publicados por país (1950-2016)-----	11
Figura 7 Resultados estadísticos de los trabajos sobre curcumina publicados área de estudio (1950-2016) -----	11
Figura 8 Tautomería ceto-enol de la curcumina -----	12
Figura 9 Formas ionizadas de curcumina a cada rango de pH, según sus pKa's -----	13
Figura 10 Modelo de capa de difusión (teoría de la película). -----	16
Figura 11 Esquema condiciones sink y no sink -----	18
Figura 12 Aparato de Wood-----	19
Figura 13 El efecto del tamaño de las partículas sobre la velocidad de disolución de preparados sólidos. -----	21
Figura 14 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de disolución. -----	22
Figura 15 Efectos de sustancia tensoactivas sobre la velocidad de disolución. -----	24
Figura 16 Efecto de la viscosidad sobre la velocidad de disolución-----	25
Figura 17 Aparato de disolución I (Aparato de canastilla) -----	28
Figura 18 Elemento de agitación de canastilla -----	28
Figura 19 Aparato de disolución II (Aparato de paletas) -----	28
Figura 20 Elemento de agitación de paletas -----	28
Figura 21 Aparato de disolución III (Cilindro oscilante) -----	29
Figura 22 Aparato IV (celda de flujo continuo)-----	30
Figura 23 Celda (arriba) y portatabletas (abajo) para tabletas y capsulas, -----	30
Figura 24 Cromatogramas donde se muestran los parámetros de la cromatografía-----	33
Figura 25 Definición de altura de platos teóricos-----	33
Figura 26 Determinación de la cantidad de platos teóricos-----	33
Figura 27 Diagramas de bloques que muestra los componentes de un aparato característico de CLAR -----	36
Figura 28 Diagrama de flujo del desarrollo experimental -----	40
Figura 29 Esquema para montar el sistema de cromatografía preparativa-----	43
Figura 30 Metodología para construir una curva de calibración de curcumina y evaluar linealidad del sistema -----	47

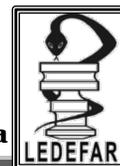


Figura 31 Metodología para evaluar precisión del sistema de curcumina -----	48
Figura 32 Metodología para evaluar solubilidad de curcumina -----	50
Figura 33 Formación del compacto de curcumina y montaje del aparato de Wood para VDI -----	51
Figura 34 Cromatografía preparativa de curcuminoides y las fracciones recolectadas (izq.) y cromatoplasmas de cada fracción para evaluar la separación (der.) -----	52
Figura 35 Cromatografía preparativa de curcuminoides eficiente (izq.) y seguimiento de la elución mediante cromatoplasmas con detección UV a 365nm (centro) y a simple vista (der.) -----	53
Figura 36 Curcumina pura, obtenida en la cromatografía preparativa -----	53
Figura 37 Curcumina pura a 0.768 µg/mL : A)Espectro de curcumina Abs vs Long. de onda (nm), B) Long. de onda vs. tiempo (min), C) Cromatograma Abs vs. Tiempo (min), D) Salida 3D del detector DAD Abs vs. Long. de onda (nm) vs. Tiempo (min) y E) Salida 3D del detector DAD para el blanco Abs vs. Long. de onda (nm) vs. Tiempo (min)-----	54
Figura 38 Espectros de curcumina concentración de 8.32 µg/mL en agua -----	55
Figura 39 Espectro de infrarrojo cercano de curcumina pura -----	55
Figura 40 Espectro 1H-RMN en DMSO de curcumina purificada -----	56
Figura 41 Espectro 1H-RMN en DMSO de curcumina purificada (acercamiento)-----	56
Figura 42 Espectro 13C-RMN en DMSO de curcumina purificada -----	57
Figura 43 Microscopias de curcumina purificada:-----	58
Figura 44 Cromatogramas de diferentes columnas, curcumina sigma Aldrich 3.072 µg/mL -----	59
Figura 45 Cromatogramas de diferentes proporciones de fase móvil -----	60
Figura 46 Cromatogramas de diferentes velocidades de flujo-----	61
Figura 47 Coeficientes del modelo determinado para el área del pico -----	63
Figura 48 Comportamiento del área del pico en función de la columna: Medias y 95.0% intervalos LSD -----	63
Figura 49 Superficie de respuesta estimada para Área-----	64
Figura 50 Coeficientes del modelo determinado para el tiempo de retención de curcumina -----	66
Figura 51 Comportamiento del tiempo de retención en función de la columna: Medias y 95.0% intervalos LSD -----	66
Figura 52 Superficie de respuesta estimada para Tiempo de retención -----	67
Figura 53 Comportamiento de la Resolución en función de la columna: Medias y 95.0% intervalos LSD -----	69
Figura 54 Coeficientes del modelo determinado para la resolución Curcumina-Demetoxicurcumina (C-DMC) -----	69
Figura 55 Superficie de respuesta estimada para resolución -----	70
Figura 56 Grafica de ajuste de regresión del volumen de inyección de curcumina 0.832 µg/mL y 0.104 µg/mL -----	71

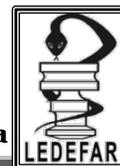
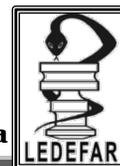
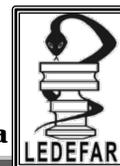


Figura 57 Cromatogramas de diferentes volúmenes de inyección a 1 mL/min -----	72
Figura 58 Cromatogramas de diferentes tratamientos de filtrado -----	73
Figura 59 Comparación de medias e intervalos de confianza HSD en los tratamientos de filtración para curcumina a 0.832 µg/mL -----	74
Figura 60 Comparación de medias e intervalos de confianza LSD en los tratamientos de filtración para curcumina a 0.832 µg/mL -----	75
Figura 61 Comparación de medias e intervalos de confianza LSD en los tratamientos de filtración para curcumina a 0.104 µg/mL -----	76
Figura 62 Área en función de la concentración de curcumina para evaluar la linealidad del sistema. Modelo: Área = 286283(Concentración) - 391.069 -----	78
Figura 63 A) Solución Tw y DSS al 1%, B) Solución Tw y DSS al 1% en HCl 0.1 N, C) Solución Tw y DSS al 1% en Buffer de acetatos, D) Solución Tw y DSS al 1% en Buffer de fosfatos -----	81
Figura 64 Espectro de curcumina sigma Aldrich 20 µg/mL en 3 medios de disolución con Tween 80 al 1% -----	82
Figura 65 Regresión de las lecturas de abs vs tiempo de la curcumina sigma Aldrich en diferentes medios -----	83
Figura 66 Regresión de las lecturas de abs vs tiempo de la curcumina sigma Aldrich en diferentes medios -----	84
Figura 67 Regresiones lineales de curcumina en los diferentes medios para evaluar VDI $k = \text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ -----	85
Figura 68 Regresiones lineales de curcumina en los diferentes medios para evaluar VDI $k = \text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ -----	86
Figura 69 La respuesta k ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$) en función de la fuerza de compresión (factor con efecto significativamente estadístico) -----	88
Figura 70 Velocidad de disolución intrínseca de curcumina en solución buffer de fosfatos y solución de HCl 0.1 N -----	90
Figura 71 Efecto del pH en la velocidad de disolución intrínseca -----	90
Figura 72 Solvente cloroformo; espectro 1H-RMN en CDCl ₃ (Cloroformo deuterado) y TMS (Tetrametilsilano) como fuente de H ¹ y referencia respectivamente -----	96
Figura 73 Solvente metanol; espectro 1H-RMN en CDCl ₃ (Cloroformo deuterado) y TMS (Tetrametilsilano) como fuente de H ¹ y referencia respectivamente -----	97
Figura 74 Formula para codificar factores -----	99

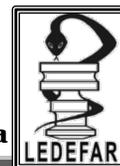


LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Definición
µg	microgramo
µL	microlitros
µm	micrómetro
ACN	Acetonitrilo
Alem.	Alemania
ATC	Ácido Tricloroacético
Ayur.	Ayurveda
BDMC	Bis-Demetoxicurcumina
C	Curcumina
C.V. %	Coficiente de variación expresado en porcentaje
CAS	Chemical Abstracts Service
CCF/TLC	Cromatografía de Capa Fina (Thin Layer Chromatography)
CCFAR (HPTLC)	Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución(High Performance Thin Layer Chromatography)
Chin.	China
CL (LC)	Cromatografía de líquidos (Liquid Chromatography)
CLAR (HPLC)	Cromatografía Líquida de Alta Resolución(High Performance Liquid Chromatography)
cm	centímetro
Der.	Derecha
DMC	Demetoxicurcumina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DSS	Dodecilsulfato de sodio
EINECS(CE)	European List of Notified Chemical Substances
Esp.	España
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
Fr.	Francia
g	gramo
HSD	Diferencia Honestamente Significativa (HSD) de Tukey
Ing.	Inglaterra
IR cercano (NIR)	Infrarrojo cercano (Near Infrared)
Izq.	Izquierda



Jap.	Japón
k'	Factor de retención (Parámetro cromatográfico)
L	Litro
LSD	Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher
MEB(SEM)	Microscopio Electrónico de Barrido (Scanning Electronic Microscope)
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
N	Numero de platos teóricos (Parámetro cromatográfico)
nm	nanómetro
pH	El logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno (en mol/L)
ppm	Partes por millón
RMN (NMR)	Resonancia Magnética Nuclear(Nuclear Magnetic Resonance)
rpm	Revoluciones por minuto
Rs	Resolución (Parámetro cromatográfico)
s	segundo
t	Tonelada métricas
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tiempo de retención (Parámetro cromatográfico)
TW	Tween 80
USP	United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
VDI	Velocidad de disolución intrínseca
λ	Longitud de onda
BPL	Buenas Practicas de Laboratorio



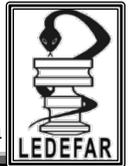
RESUMEN

Los curcuminoides son sustancias de gran interés debido a sus importantes actividades farmacológicas, particularmente antiinflamatorias, anticancerígenas y su actividad contra Alzheimer. En este trabajo se desarrolló un método de disolución, así como un método analítico para caracterizar la velocidad de disolución intrínseca de la curcumina.

Se purificó la curcumina a partir de una mezcla de curcuminoides mediante cromatografía preparativa en columna usando una fase móvil cloroformo: metanol=19:1 (v/v), silica con tamaño de partícula 9.5-11.5 μm una columna de 4.5 x 46cm. Esta sustancia purificada se caracterizó mediante Infrarrojo cercano, UV-Vis, CLAR, MEB y RMN, para usarse como estándar analítico de curcumina, analizado por CLAR con las siguientes condiciones: temperatura 26 °C, columna XBridge C₁₈ 4.6 x 250 mm, 5 μm , fase móvil Acido Tricloroacético 0.1%: Acetonitrilo (52:48), velocidad de flujo de 1.1 mL/min, detección en 425nm, 50 μL volumen de inyección, mismas condiciones a las que se analizaron las muestras del perfil de disolución de curcumina que se realizó a 37 ° C, en un volumen de disolución de 900 mL, 75 rpm, Tween 1.5 %, HCl 0.1N pH 1.5 y buffer de fosfatos pH 6.8, muestreos de 5 mL sin reposición del medio y el compacto formado en el aparato de Wood fue de \approx 200mg, con fuerza de compresión de 0.9 toneladas.

Para la cuantificación de curcumina se validó una curva de calibración de curcumina cuyo modelo de regresión lineal es: Área = 286283(Concentración) - 391.069, $R^2 = 0.9998$, así se determinó la constante de VDI de curcumina en HCl 0.1N pH 1.5 es $k=0.00279$ (mg/min/cm²) y en buffer de fosfatos pH 6.8, $k=0.0033$ (mg/min/cm²) En ambos casos la constante de velocidad de disolución intrínseca, $k < 1$, los fármacos que presentan valores inferiores a uno, tienen una velocidad de disolución lenta, que es limitante para su absorción y presentan problemas con la biodisponibilidad y con la disolución.

Se desarrolló un método analítico validado, para análisis de curcumina mediante HPLC para la caracterización de la VDI al igual que se establecieron las condiciones de operación para lograr caracterizar los perfiles de disolución.

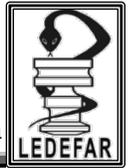


1. INTRODUCCION

Las acciones farmacológicas reportadas de la cúrcuma se atribuyen generalmente a la curcumina, uno de sus principales constituyentes. La cúrcuma se ha utilizado por vía oral en medicina tradicional para el tratamiento sintomático de la dispepsia y otros trastornos digestivos y biliares menores. También se ha utilizado para el alivio del dolor artrítico y para trastornos menstruales. Se ha informado que la cúrcuma posee muchas propiedades incluyendo efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, coleréticos, hepatoprotectores e hipolipidémicos. La mayoría de los estudios se han realizado utilizando curcumina, uno de los principales componentes de la cúrcuma y respaldan fuertemente el uso de la misma con sus acciones farmacológicas, sin embargo, el principal reto que encontramos es la baja biodisponibilidad de la curcumina.

El presente trabajo no tiene punto de comparación, la velocidad de disolución intrínseca (VDI) de la curcumina es una propiedad no reportada con anterioridad al presente trabajo y que será de gran utilidad en el desarrollo de nuevas estrategias para aumentar la biodisponibilidad de la curcumina. ¿De qué forma aporta algo? Siendo la VDI una propiedad *per se* del fármaco, se vuelve el punto de partida, así como punto de referencia para comparar las nuevas soluciones propuestas para el aumento de la biodisponibilidad de curcumina y así determinar el avance que logran las mismas, así como una propiedad fisicoquímica relevante en la fase de preformulación durante el desarrollo farmacéutico de productos con curcumina.

Así, este trabajo de tesis tiene como objetivo principal el desarrollo de un procedimiento detallado para lograr caracterizar paso por paso la VDI de curcumina tanto del método analítico como del método de disolución, secundario al objetivo principal de este trabajo se desarrolla y describe un método de separación de curcumina a partir de curcuminoides.



2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar un método de análisis mediante HPLC para caracterizar la velocidad de disolución de curcumina como materia prima

2.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Purificar y caracterizar (RMN, NIR, espectrofotometría UV/Vis y HPLC) la curcumina a partir de una mezcla de curcuminoides mediante cromatografía preparativa para usarla como estándar de curcumina.
- Desarrollar el método analítico mediante una curva de calibración a través de HPLC para cuantificar curcumina.
- Establecer las condiciones de operación de disolución mediante pruebas para lograr caracterizar los perfiles de disolución.

3. MARCO TEORICO

3.1. Cúrcuma

Es una planta perene con un corto y delgado rizoma (amarillo opaco, cubierto por una película marrón), con peciolos largos y hojas ovalo-lanceoladas y flores amarillo pálido. (Mammen, 2006)

Las acciones farmacológicas reportadas de la cúrcuma se atribuyen generalmente a la curcumina, uno de sus principales constituyentes. La cúrcuma es ampliamente utilizada como especia para dar sabor a los alimentos, también se utiliza como un colorante alimenticio. Existe una carencia de la investigación clínica con la cúrcuma, y ensayos clínicos controlados y aleatorizados son requeridos para apoyar los usos tradicionales.

Especie (Familia)

Curcuma longa L. (Zingiberaceae)



Figura 1 Planta y flor de Cúrcuma (*Curcuma Longa* L.)
Tomada de (Stuart et al., 2013)

Sinónimo (s)

Curcum, Cúrcuma, Haldi, Haridra (Ayur.), azafrán indio, *Jiang huang* (Chin.), Yellow ginger (Ing.), Rhizome de cúrcuma (Fr.), Curcumawurzelstock, Gelbwurzel, Gelbwurzelstock (Alem.), *Ukon* (Jap.), Azafrán de India (Esp.)

Curcuma domestica Valetton se acepta generalmente como la misma especie que *Curcuma longa*.

La especie relacionada *Curcuma aromatica* Salisb., se conoce como la cúrcuma salvaje o aromática y *Curcuma x anthorrhiza* D. Dietr., se conoce como la cúrcuma de Java. No debe confundirse con *Curcuma zedoaria* (Christmann) Roscoe, la cual es zedoaria.

Origen

Es cultivada en Asia y África tropical. Comercialmente es importada de China, India e Indonesia.

El material usado en la medicina Ayurvedica es cultivado en la mayoría de los estados de India. El material usado en la medicina China y Japonesa es cultivada en el sur de China, Taiwán y Japón.(Wichtl, 2004)



Figura 2 Recolección de Cúrcuma en India
(Patricia269, 2006)

Farmacopea y otras monografías

- **BP 2016** (Cúrcuma de Java, Rizoma de Cúrcuma).
- **PhEur 8.8**
 - Cúrcuma javanesa: El rizoma seco, cortado en rodajas, de *Curcuma zanthorrhiza* Roxb. (*C. zanthorrhiza* D. Dietrich).
 - Rizoma cúrcuma: Entero, curado (por ebullición o vapor), rizoma seco de *Curcuma longa* L. (sin *C. domestica* Valetton) con raíces y superficie externa eliminada.
- **USP39-NF34**
 - Cúrcuma: El rizoma seco de *Curcuma longa* L., también conocido como *C. domestica* Val., (Fam Zingiberaceae). Cúrcuma en polvo y extracto de cúrcuma en polvo también se enumeran.

La cúrcuma también se incluye en las monografías de HMPC y las monografías de la OMS volumen 1 1999.

Parte (s) utilizada (s)

Rizoma.



Figura 3 *Cúrcuma rizoma fresco y droga seca (rizoma)*
Tomado de (Stuart et al., 2013)

Constituyentes

- **Curcuminoides**

Pigmentos de color amarillo a naranja (3-5%), principalmente diarilheptanoides, con curcumina, demetoxicurcumina y bis-demetoxicurcumina como los principales constituyentes (European Scientific Co-operative on Phytotherapy, 2003; Wichtl, 2004).

Hay al menos 17 ejemplos adicionales aislados como constituyentes menores, incluyendo dihidrocurcumina, dihidrobis-demetoxicurcumina, ciclocurcumina, y bisdemetoxiciclocurcumina. (Li, 2009; Park & Kim, 2002; L. Wang, 2008). También se han encontrado aductos sesquiterpeno-curcuminoides de tipo bisabolano. (Xiao, 2011, 2012)

Se han propuesto estructuras para 11 curcuminoides menores adicionales a partir de análisis de LC-MS/MS de extractos frescos de rizomas (Jiang, 2006). Dos ejemplos de diarilpentanoides han sido reportados. La curcumina y la demetoxicurcumina existen como tautómeros ceto-enol en solución. (Payton, 2007)

- **Mono- y sesquiterpenos**

Presentes en el aceite esencial obtenido ya sea por hidrodestilación de rizomas frescos (0.7-1.1%) o de droga seca (2-7%) (Wichtl, 2004). El rendimiento y composición del aceite varían con la ubicación geográfica, cultivo, madurez del rizoma y otros factores.

Los monoterpenos encontrados son el cineol y los derivados del 2,6-dimetiloctano, así como los tipos mentano y pinano, incluidos el 1,8-cineol, el α -felandreno, el α -pineno y el terpinoleno.

Los sesquiterpenos (principales constituyentes del aceite): β -sesquifelandreno, ar-turmerona, α - y β -turmerona y zingibereno (bisabolanos) están típicamente entre los componentes principales; se han detectado numerosos componentes menores de diversos grupos sesquiterpénicos, incluyendo germacranos y guayanos. (Chane-Ming, 2002; Naz, 2010; Raina, 2005)

- **Polisacáridos**

Almidón (~40%). Los polisacáridos se han aislado a partir de extractos de agua caliente de rizomas incluyendo ukonanos A-C (árabinogalactanos ácidos con estructuras de glicanos multi-ramificados complejos y una parte peptídica), y ukonano D (polisacárido neutro con mayor contenido de glucosa que ukonanos A-C, también contiene una parte peptídica). (Braga, 2006; Gonda, 1990, 1992)

- **Otros constituyentes**

Hidroxicinamoil ésteres de fenilbutanoides, incluyendo calebina A (Zeng, 2007)

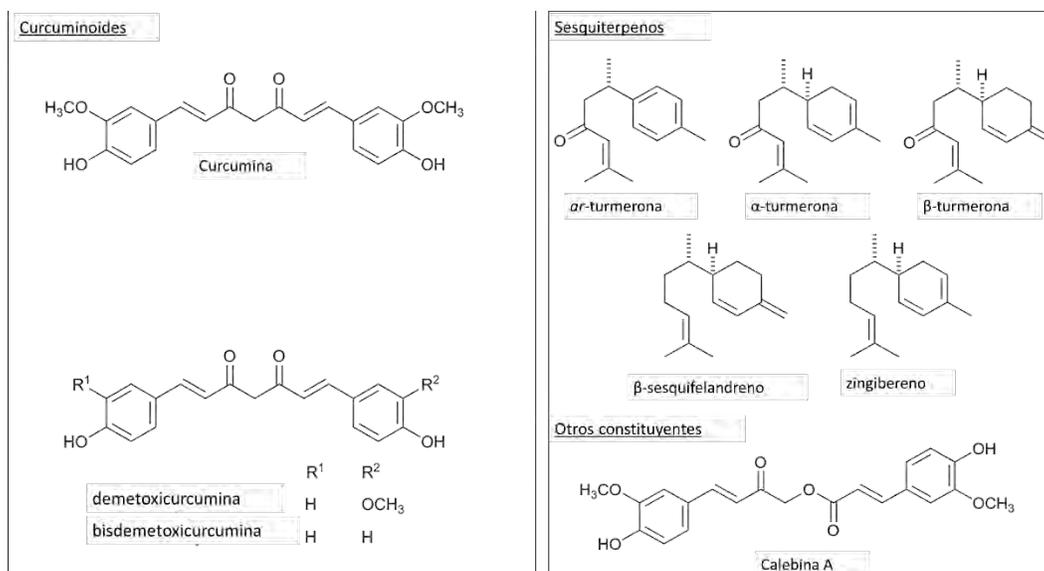
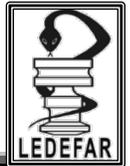


Figura 4 Constituyentes seleccionados de cúrcuma.
Modificado de (Stuart et al., 2013)



Uso alimenticio

La cúrcuma es ampliamente utilizada como especia para condimentar los alimentos, especialmente en la cocina india. Ingrediente principal del curry. También se utiliza como un colorante amarillo en los alimentos, ya sea como el polvo seco o como el extracto de aceite esencial.

El rizoma de cúrcuma y aceite esencial se encuentran enlistados por el Consejo Europeo (Council of Europe) como fuente natural de aromatizantes alimentarios (categoría 3 con límites para el eucalipto). La cúrcuma, el extracto de cúrcuma y el aceite esencial de cúrcuma también están enlistados en Estados Unidos como GRAS (generalmente considerado como seguro).

Uso herbolario

La cúrcuma se ha utilizado por vía oral en medicina tradicional para el tratamiento sintomático de la dispepsia y otros trastornos digestivos y biliares menores. También se ha utilizado para el alivio del dolor artrítico y para trastornos menstruales. La cúrcuma se ha aplicado tópicamente para la sarna, úlceras, eczema y cicatrización de heridas. (Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2010a; World Health Organization, 1999)

El Comité sobre Productos de Medicina Herbolaria (HMPC) de la Agencia de Medicina Europea (EMA) ha adoptado una monografía de hierbas comunitarias para la cúrcuma. Bajo uso tradicional, la monografía especifica la indicación de uso oral para "aumentar el flujo biliar para aliviar síntomas de indigestión (tales como sensación de saciedad, flatulencia y digestión lenta". La Comisión Alemana E también ha aprobado la cúrcuma para condiciones dispépticas (Blumenthal, 1998; Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2010b).

La cúrcuma se utiliza comúnmente en la medicina tradicional ayurvédica¹ y de china.

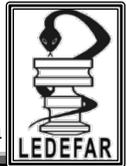
Dosificación

Las dosis para administración oral (adultos) recomendadas por usos tradicionales en los textos de referencia estándar a base de hierbas se dan a continuación.

- **Rizoma seco**
 - Sustancia herbácea en polvo: 1.5-3.0 g diarios.
 - Sustancia herbácea triturada: 0.5-1.0 g hasta tres veces al día como infusión.

- **Extracto seco**
 - 80-160 mg diarios en 2-5 dosis divididas.
 - 100-200 mg dos veces al día.

1.-El ayurveda es un sistema de medicina tradicional originario de la India



- **Tintura**
 - 0.5-1.0 ml (1: 10), tres veces al día.
 - 10 ml (1: 5), una vez al día.
 - 5 ml (1: 5) en 60 ml de agua, tres veces al día.

(Blumenthal, 1998; Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)., 2010b)

Acciones Farmacológicas

Se ha informado que la cúrcuma posee muchas propiedades incluyendo efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, coleréticos, hepatoprotectores e hipolipidémicos. La mayoría de los estudios se han realizado utilizando curcumina, uno de los principales componentes de la cúrcuma. Por lo tanto, los datos de los estudios que investigan el uso de extractos de cúrcuma son limitados (Amon & MA, 1991; European Scientific Co-operative on Phytotherapy, 2003; Wichtl, 2004).

Efectos secundarios, Toxicidad

Hay datos limitados de seguridad y toxicidad disponibles para la cúrcuma y se requiere más investigación. La monografía de HMPC para *Curcuma longa* L. menciona que se pueden presentar síntomas leves de boca seca, flatulencia e irritación gástrica, aunque la frecuencia es desconocida. También se ha reportado dermatitis alérgica.

Contraindicaciones, Advertencias

El uso de cúrcuma ha sido contraindicado en pacientes con hipersensibilidad a la sustancia activa. La monografía de HMPC para *Curcuma longa* L. contraindica su uso en pacientes con obstrucción de la vía biliar, colangitis, enfermedad hepática, cálculos biliares y cualquier otra enfermedad biliar. Existe una carencia de datos para el uso de la cúrcuma en niños y adolescentes, por lo que no se recomienda en este grupo de edad.

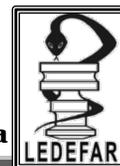
Interacciones con fármacos

La cúrcuma o su componente curcumina afecta la absorción de algunos betabloqueadores, aumenta la absorción de midazolam, pero no afecta la absorción de hierro. La piperina, un componente de la pimienta, aumenta la biodisponibilidad de la curcumina. También debe considerarse la posibilidad de que los preparados de cúrcuma interactúen con otros medicamentos administrados simultáneamente, en particular aquellos con efectos similares u opuestos.

Embarazo y lactancia

No se ha establecido la seguridad de la cúrcuma durante el embarazo y la lactancia. En vista de la falta de datos de toxicidad, se debe evitar el uso de la cúrcuma durante el embarazo y la lactancia

(Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)., 2010b; World Health Organization, 1999).



Preparados

- **Preparaciones de un solo ingrediente**
 - **Chile:** Turmerik.
 - **India:** Crack Free.
 - **Tailandia:** Auzing.

- **Preparaciones con varios ingredientes**
 - **Australia:** Boswellia Complex; Pulmaco; Vitanox.
 - **Canada:** Curzone; Dtx Complex; Dysmen Menstrual Pain Relief; Estro; Gout Relief Formula; Gout; Hepa Plus; Hurtex; Joint +; Joint-Pro; Kidney Care; Liv-A; Milk Thistle Complex; Nutrilite Liver Health; Optomega; Painease; Rheumatic & Joint Pain Relief.
 - **Republica Checa:** Cholagol.
 - **Francia:** Cledist; Expuryl; Hepatoum; Silibiol.
 - **Alemania:** Chol-Arbuz NF.
 - **Hungría:** Antifront; Antifront; Cholagol; Munipyrin.
 - **India:** Aglotus; Healing Dust.
 - **Indonesia:** Aptivium Liver Support; Diapet; Elkana; Fitodiar; Heparsan; Hepasil; Lanagogum; Lecur; Livapro SS; Nutrijoint; Nuwasir; Osimax; Ositin; Procur Plus; Proliva; Rejuvit; Sanbe Kids' Emulsion; Sanmino; Takana; Tripid; Venaroid; Vidoran Emulsion Rasa; Vidoran Plus.
 - **Italia:** Cinarepa; Cistefi; Reumafort.
 - **Japón:** Cabe 2 New; Eki Cabe U.
 - **México:** Ifuchol; LVR Plus; Procosa II; Rodan.
 - **Filipinas:** Cogent Db+.
 - **Polonia:** Cholitol.
 - **Federación Rusa:** Cholagol (Холагол); Doktor Mom (Доктор Мом); Suprima-Broncho (Суприма-Бронхо); Travisil (Трависил).
 - **Sudáfrica:** Lewenssensens.
 - **Singapur:** Artrex.
 - **Reino Unido:** Arheumacare; Backosamine.
 - **Ucrania:** Antifront (Антифронт); Antifront (Антифронт); Artritosamin (Артритозамин); Cholagol (Холагол); Doctor Cough (Доктор Кашель); Doktor Mom (Доктор Мом Сироп).

(Stuart et al., 2013)

3.1.1. Curcumina

La *Cúrcuma* spp. contiene turmerina (un péptido hidrosoluble), aceites esenciales (tales como turmeronas, atlantonas y zingiberenos) y curcuminoides incluyendo la curcumina.

Los curcuminoides pueden ser definidos como compuestos fenólicos que se derivan del rizoma de la cúrcuma. La curcumina (diferuloilmetano) es un polifenol de bajo peso molecular, caracterizado químicamente por primera vez en 1910, este es generalmente considerado como el más activo de los constituyentes y comprende del 2 al 8 % de la mayoría de las preparaciones de cúrcuma (Sharma, Gescher, & Steward, 2005).

La cúrcuma y sus propiedades farmacológicas ha tenido una creciente importancia, lo que ha llevado a que la investigación dentro de la ciencia, de su metabolito de mayor importancia terapéutica, la *curcumina*, se halla visto incrementada alrededor del mundo en años recientes.

A partir del año 2002 comenzó a incrementar el número de publicaciones relacionados con la curcumina, siendo en 2015 el año más productivo con 1939 trabajos publicados que se enfocaban en la curcumina como objeto de estudio.

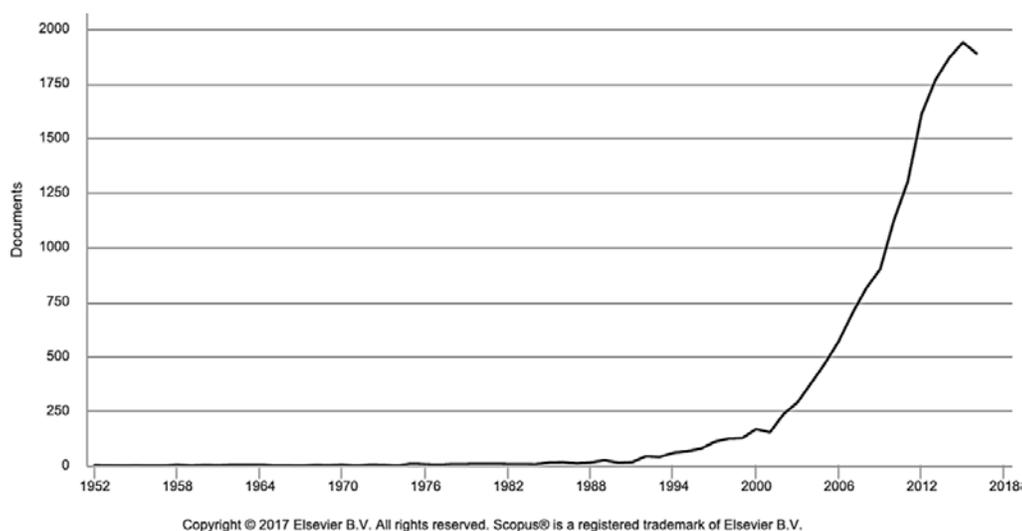


Figura 5 Resultados estadísticos de los trabajos sobre curcumina publicados por año (1950-2016)
Consultado: Base de datos Scopus, Enero 2017

Así también se muestran estadísticas en la siguiente figura sobre los trabajos publicados por país durante el mismo periodo de tiempo, siendo Estados Unidos el país que mayores documentos sobre curcumina ha generado a lo largo de este periodo de tiempo, en México se muestra que la investigación es relativamente baja comparada con países como India China y Estados Unidos.

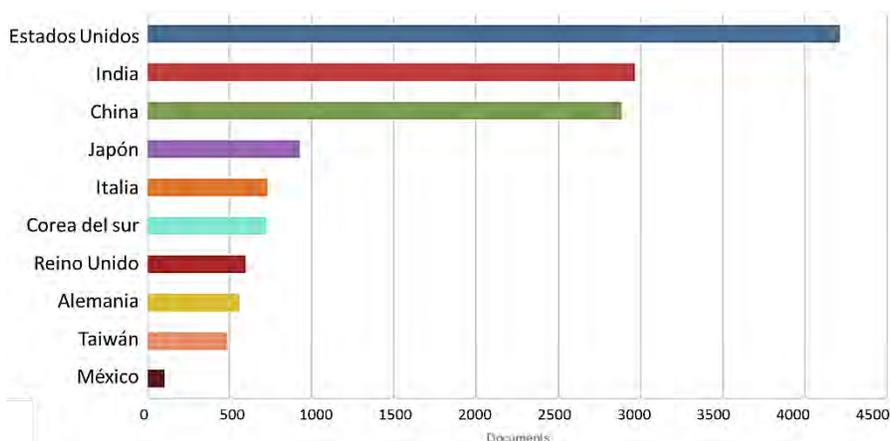


Figura 6 Resultados estadísticos de los trabajos sobre curcumina publicados por país (1950-2016)
Consultado: Base de datos Scopus, enero 2017

Como se mencionó anteriormente, aunque la cúrcuma y curcumina generalmente son de uso alimenticio, de agricultura y medicina tradicional de oriente he incluso como colorante en industria alimenticia y cosmética, como se muestra en la siguiente figura, la principal área de investigación que trabaja con la curcumina es la de las ciencias de la salud, debido a su potencial como agente terapéutico en padecimiento hepáticos, gastrointestinales, reumáticos, etc (Elsevier, 2017).

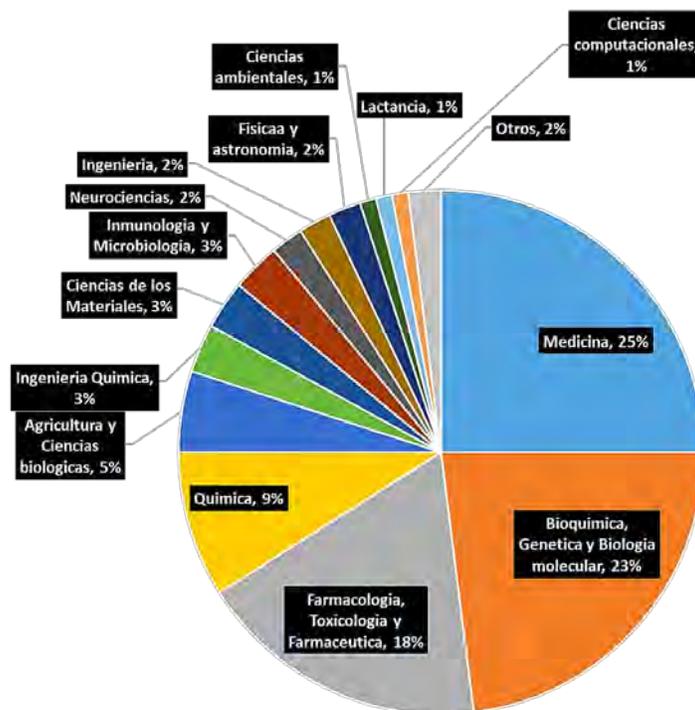


Figura 7 Resultados estadísticos de los trabajos sobre curcumina publicados área de estudio (1950-2016)
Consultado: Base de datos Scopus, enero 2017

3.1.1.1. Descripción

Es metabolito responsable del color de la cúrcuma (amarillo). Comercialmente la curcumina está disponible como una mezcla de curcuminoides: curcumina ($\approx 77\%$), demetoxicurcumina ($\approx 18\%$) y bis-demetoxicurcumina ($\approx 5\%$) (Jadhav, Mahadik, & Paradkar, 2007).

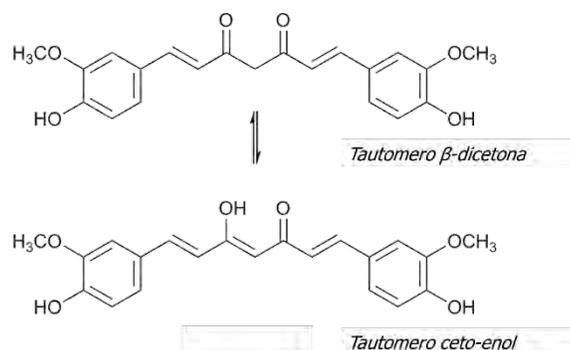


Figura 8 Tautomería ceto-enol de la curcumina
Modificado de (Stuart et al., 2013)

Nombre	Curcumina
Sinónimo	Diferuloilmetano
Nombre químico	1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione
No. CAS	458-37-7
No. EINECS(EC#)	207-280-5
Formula	$C_{21}H_{20}O_6$
Peso molecular	368.38 g/mol

3.1.1.2. Propiedades fisicoquímicas

Apariencia	Polvo fino anaranjado
Punto de fusión	183 °C
Densidad	0.93
Densidad de vapor	13 (vs aire)
Índice de refracción	1.4155-1.4175
Solubilidad	Agua: Prácticamente insoluble a pH ácido y neutro Solventes: Soluble en solvente polares y no polares (Etanol 10 mg/mL), Ácido y bases extremadamente fuertes: Ácido acético y álcali.
pKa	pKa ₁ 7.8 pKa ₂ 8.5 pKa ₃ 9.5
Log P	3.29

(ChemicalBook, 2016; Jadhav et al., 2007; Lestari & Indrayanto, 2014)

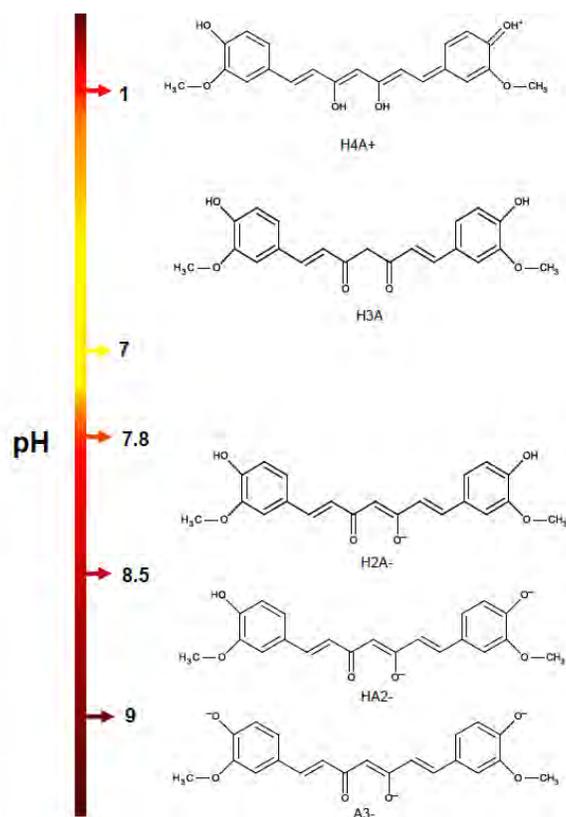


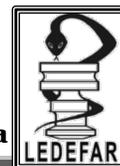
Figura 9 Formas ionizadas de curcumina a cada rango de pH, según sus pKa's (Cano Vega, 2013)

3.1.1.3. Estabilidad

Los principales componentes de la cúrcuma son relativamente estables a pH ácido, pero rápidamente se descomponen a pHs alcalinos. Los productos de degradación iniciales se forman después de 5 minutos y el patrón cromatográfico obtenido después de 28 h a pH 8.5 es representativo para la degradación alcalina. El ácido ferúlico y feruloilmetano se forman inicialmente. (Y. J. Wang et al., 1997)

La curcumina es inestable a pH básico, pero en presencia de suero de ternera o sangre humana menos del 20% de la curcumina se descompone en 1 hora. La adición de antioxidantes (ácido ascórbico, la N-acetilcisteína o glutatión) a los medios de cultivo también inhibe la degradación de la curcumina. (Shenghani & Duvvuri, 2013)

La curcumina no es estable en pHs alcalinos, oxígeno e irradiación de luz ultravioleta y visible. La curcumina es estable a $\text{pH} < 7.5$. (Tonnesen & Karlsen, 1985)



3.2. Disolución

Una solución puede definirse como una mezcla de dos o más componentes que forman una sola fase que es homogénea hasta el nivel molecular. El componente que determina la fase de la solución se denomina disolvente y por lo general constituye la mayor proporción del sistema. Los otros componentes se denominan solutos, y están dispersos como moléculas o iones en todo el disolvente, es decir, se dice que se disuelven en el disolvente.

La transferencia de moléculas o iones de un estado sólido a una solución se conoce como *disolución*.

(Aulton, 2001)

Es probable que en la referencia preliminar de la disolución consista en un artículo de Noyes y Whitney de 1897 acerca de "The rate of solution of solid substance in their own solution" (Noyes & Whitney, 1897). Los autores sugerían que la velocidad de disolución de las sustancias sólidas está determinada por la velocidad de difusión de una capa muy delgada de la solución saturada que se forma instantáneamente alrededor de la partícula sólida. Desarrollaron la relación matemática que correlaciona la velocidad de disolución con el gradiente de solubilidad del sólido. Su ecuación es todavía la fórmula básica que fundamenta la mayoría de los tratamientos matemáticos modernos del fenómeno de la disolución.

Sin embargo, el trabajo de Noyes y Whitney, así como la mayor parte del trabajo que se llevó a cabo durante la primera parte de este siglo, se concentró en el estudio de los aspectos fisicoquímicos de la disolución como se aplica a las sustancias químicas. Los más importantes de estos estudios fueron la aplicación de la ley de difusión de Fick a la ecuación de Noyes y Whitney por parte de Nernst y Brunner en 1904 y el desarrollo de la famosa *ley de la raíz cúbica* de disolución por parte de Hixson & Crowell en 1931.

(Gennaro, 2003)

3.2.1. Importancia de la disolución

A mediados del siglo XX, el énfasis comenzó a desplazarse hacia el examen de los efectos que el comportamiento de la disolución de fármacos tiene sobre la actividad de los preparados farmacéuticos. Uno de los estudios preliminares con este propósito fue llevado a cabo por J. Edwards en 1951 en comprimidos de aspirina. Sobre la base de sus hallazgos informó que "debido a su escasa solubilidad, la acción analgésica de los comprimidos de aspirina estaría controlada por su velocidad de disolución en el estómago y en el intestino" (Edwards, 1951). Sin embargo, Edwards no llevó a cabo ningún estudio in vivo para avalar su postulado.

Aproximadamente 8 años más tarde, Shenoy, Chapman y Campbell demostraron la validez de la sugerencia de Edwards de la correlación *in vitro/in vivo* por medio de la demostración de una relación directa entre la biodisponibilidad de anfetamina en comprimidos de liberación sostenida y su velocidad de disolución *in vitro* (Shenoy, Chapman, & Campbell, 1959).

Otros estudios, en especial Levy en 1961 y Nelson & Miller en 1979 confirmaron más allá de toda duda el efecto significativo de la conducta de disolución de los fármacos sobre sus actividades farmacológicas. (Levy, 1961; Nelson & Miller, 1979).

Debido a la importancia de sus hallazgos, las pruebas de disolución comenzaron a surgir como un tema dominante tanto en el campo académico farmacéutico como en la industria farmacéutica.

A fines de la década de 1960 las pruebas de disolución se convirtieron en un requerimiento obligatorio para diversos preparados. A pesar del éxito informado de diversos estudios de correlación *in vitro/in vivo*, la disolución no es un predictor de la eficacia terapéutica. Más bien es una herramienta cualitativa que puede proporcionar información valiosa acerca de la disponibilidad biológica de un fármaco, así como de la uniformidad entre un lote y otro. Otra área de dificultad es el hecho de que la exactitud y la precisión del procedimiento de prueba dependen en gran medida del estricto cumplimiento de demasiados parámetros sutiles y de detallados controles operativos.

A pesar de estas desventajas, la disolución se considera hoy en día una de las pruebas de control de calidad más importantes realizadas a los preparados farmacéuticos.

(Gennaro, 2003)

3.2.2. Teoría de la disolución

Modelo de capa de difusión (teoría de la película)

En 1897 Noyes y Whitney estudiaron la velocidad de disolución del ácido benzoico y del cloruro de plomo, dos sustancias prácticamente insolubles, por medio de la rotación de un cilindro de cada compuesto en agua a una velocidad constante y tomando muestras de la solución para su análisis con intervalos específicos. Para poder examinar sus datos cuantitativamente, Noyes y Whitney desarrollaron una ecuación sobre la base de la segunda ley Fick para describir el fenómeno de la disolución

$$(1) \quad \frac{dc}{dt} = K(C_s - C_t)$$

Donde dc/dt es la velocidad de disolución del fármaco, K es la constante de proporcionalidad, C_s es la concentración de saturación (solubilidad máxima), C_t es la concentración en el tiempo t y $C_s - C_t$ es el gradiente de concentración. La constante de proporcionalidad, K , también se denomina constante de disolución, y se ha demostrado que la ecuación sigue una cinética de primer orden.

En sus experimentos Noyes y Whitney mantuvieron un área de superficie constante por medio del uso de varillas de la sustancia insoluble. Sin embargo, dado que esta condición no siempre es aplicable, Bruner y Tolloczko modificaron la ecuación 1 para incorporar el área de superficie, S , como una variable separada.

$$(2) \quad \frac{dc}{dt} = k_1 S (C_s - C_t)$$

(Bruner & Tolloczko, 1900)

Para poder explicar el mecanismo de la disolución, en 1904 Nernst propuso la teoría del modelo de película. Bajo la influencia de fuerzas no reactivas o químicas, una partícula sólida sumergida en un líquido es sometida a dos pasos consecutivos:

1. La solución del sólido en la interfase, con la formación de una delgada capa estática o película h alrededor de la partícula.
2. La difusión desde esa capa en el límite con la masa de líquido

El primer paso, la solución, es casi instantáneo; el segundo, la difusión, es mucho más lento por lo tanto es el paso limitante de la velocidad (Nernst, 1904)

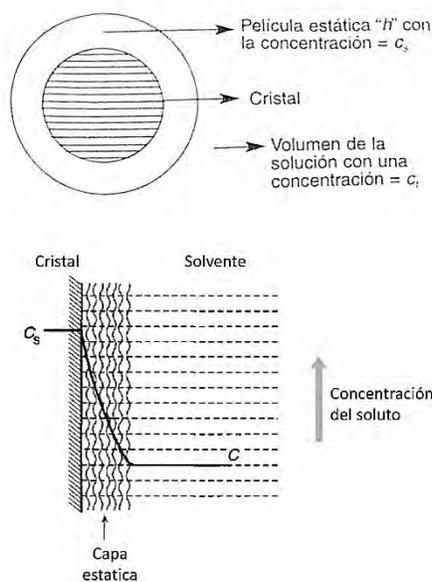
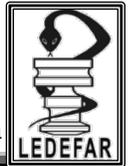


Figura 10 Modelo de capa de difusión (teoría de la película).
Modificado de (Gennaro, 2003) y (Aulton, 2001)



Durante el mismo año Brunner estaba investigando otros factores, además del área de superficie, que afectan el proceso de disolución para poder determinar los componentes fundamentales de la constante de proporcionalidad en la ecuación 1. Por medio de la primera ley de difusión de Fick y la recientemente propuesta teoría de la película de Nernst, Brunner amplió la ecuación 2 para incluir el coeficiente de difusión, D , el espesor de la capa de difusión estática, h , y el volumen del medio de disolución, v , llegando a

$$(3) \quad \frac{dc}{dt} = k_2 \frac{DS}{vh} (C_s - C_t)$$

La constante de proporcionalidad k_2 Se conoce como la constante de la velocidad de disolución intrínseca y es característica de cada compuesto químico. (Brunner, 1904)

Condición de sumidero (sink)

El término condición de sumidero se originó en un hecho largamente conocido por los farmacólogos en cuanto a que la concentración de un fármaco a ambos lados de la capa epitelial de la pared intestinal se aproxima al equilibrio en un breve lapso y que el tracto gastrointestinal actúa como un sumidero natural; es decir, el fármaco es absorbido en forma instantánea en el momento en que se disuelve. Por lo tanto, en condiciones *in vivo* no hay desarrollo de una concentración sobre la disolución como predice la ecuación 1.

Para simular la condición de sumidero *in vivo*, las pruebas de disolución *in vitro* en general se llevan a cabo por medio del empleo de un gran volumen del medio de disolución o un mecanismo por el cual el medio de disolución es repuesto en forma constante como solvente fresco a una velocidad especificada, de modo que la concentración del soluto nunca llega a más del 10 al 15% de su solubilidad máxima. Sí se mantiene este parámetro, se dice que la prueba de disolución está siendo realizada en condiciones de sumidero, es decir sin influencia del gradiente de concentración. Esto puede verse en el siguiente tratamiento matemático.

Suponiendo que $C_s \gg C_t$ La ecuación 3 se convierte en

$$(4) \quad \frac{dc}{dt} = k_2 \frac{DS}{vh} C_s$$

Dado que C_s y D son constantes para cada sustancia química específica, podrían ser incorporadas en k_2 y aparecer en la ecuación 5, como k_3

$$(5) \quad \frac{dc}{dt} = k_3 \frac{S}{vh}$$

Si el volumen del medio de disolución y el área de superficie se mantienen constantes durante toda la prueba de disolución, entonces:

$$(6) \quad \frac{dc}{dt} = K$$

La ecuación 6 predice una velocidad de disolución constante en condición sink y representa un proceso cinético de orden cero, es decir, la concentración del fármaco aumenta linealmente con el tiempo. También se cree que la ecuación 6 se aproxima a la condición *in-vivo* en cuyo caso la velocidad de disolución de fármacos escasamente solubles desempeña un papel fundamental en la determinación de su biodisponibilidad.

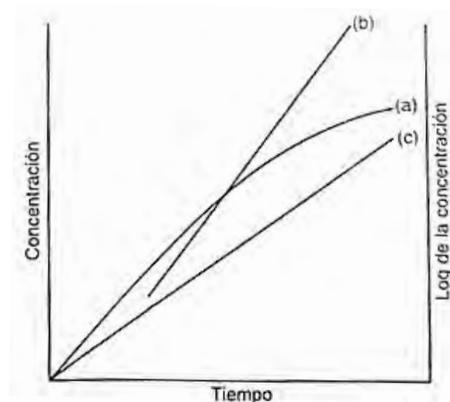


Figura 11 Esquema condiciones sink y no sink

(a) lineal (velocidad de disolución en condiciones de no sink), (b) gráfico semilogarítmico de cinética de primer orden (velocidad de disolución en condición de no sink). (c) gráfico de cinética lineal de orden cero (velocidad de disolución en condiciones sink). Tomado de (Gennaro, 2003)

$k > 1 \text{ mg/min/cm}^2$ en general los fármacos con este valor no presentarán una velocidad de disolución limitante para su absorción, no deberían presentar problemas con la biodisponibilidad o la disolución.

$k < 1 \text{ mg/min/cm}^2$ los fármacos que presentan valores inferiores a uno, tienen una velocidad de disolución lenta, que es limitante para su absorción. Es decir, presentan problemas con la biodisponibilidad y con la disolución.

Para los fármacos con valores dentro de los límites, deberán considerarse otros factores, para establecer si potencialmente presentarán problemas de disolución.

3.2.3. Velocidad de disolución intrínseca

La velocidad de disolución intrínseca (VDI) se define como la velocidad de disolución de sustancias puras en condiciones tales que el área expuesta permanece constante.

La velocidad de disolución y la biodisponibilidad de un fármaco se ven afectadas por sus propiedades en estado sólido: cristalinidad, amorfismo, polimorfismo, hidratación, solvatación, tamaño de partícula y superficie de partícula. La velocidad de disolución intrínseca medida depende de estas propiedades del estado sólido. La velocidad de disolución también se ve influenciada por factores extrínsecos, por ejemplo, fuerza de compresión, la hidrodinámica (por ejemplo, aparato de prueba y velocidad de rotación del disco o flujo del líquido) y condiciones de la prueba (por ejemplo, temperatura, viscosidad del líquido, pH y capacidad reguladora en el caso de compuestos ionizables).

Al exponer la superficie de un material a un medio de disolución apropiado manteniendo constante la temperatura, la velocidad de agitación y el pH, se puede determinar la velocidad de disolución intrínseca. Típicamente la disolución intrínseca se expresa en función de mg por minuto por cm^2 ($\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$) (The United States Pharmacopeial, 2007)

El Sistema de disco giratorio de Wood o Aparato de Wood es un aparato estándar usado para medir la VDI, donde aproximadamente 150-500 mg de un fármaco se comprimen dentro de una matriz con un punzón para producir un disco del fármaco con un área de superficie expuesta de 0.5 cm^2 . Durante la disolución, el área expuesta del disco de fármaco se mantiene constante y la temperatura de disolución del baño se mantiene a 37°C , volumen conveniente de 900 mL en cada vaso de disolución (Tseng, Patel, & Zhao, 2014).

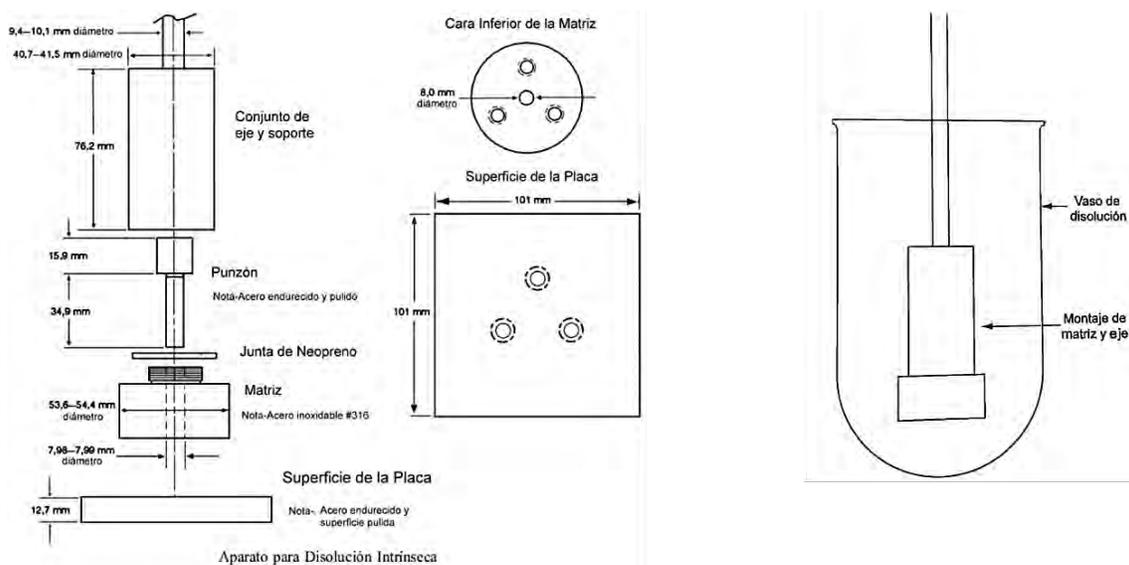
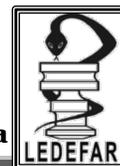


Figura 12 Aparato de Wood



3.2.4. Factores que influyen en la velocidad de disolución

3.2.4.1. Factores fisicoquímicos de la sustancia

Solubilidad

Las propiedades fisicoquímicas del fármaco desempeñan un papel primario en el control de su disolución a partir de preparado. La ecuación de Noyes y Whitney modificada, como se expresa en la ecuación 3, muestra que la solubilidad acuosa del fármaco es el principal factor que determina su velocidad de disolución.

Otros factores que afectan la velocidad de disolución incluyen el tamaño de las partículas; el estado cristalino como el polimorfismo y el estado de hidratación, la solvatación, la formación de complejos, así como la sustancia tensoactivas y otros aditivos reactivos (ácidos, bases, buffers, etc.). Otras propiedades físicas como la densidad, la viscosidad y la capacidad de humidificación contribuyen a los problemas generales de disolución. También se han hallado que las características de adsorción de los fármacos tienen un efecto significativo sobre la disolución de ciertos fármacos.

Tamaño de partícula

La ecuación 3 muestra una relación directa entre el área de superficie del fármaco y su velocidad de disolución. Dado que el área de superficie aumenta con la disminución del tamaño de las partículas, pueden lograrse velocidades de disolución mayores por medio de la reducción del tamaño de las partículas. Este efecto ha sido puesto de relieve por la velocidad de disolución superior observada después de la micronización de ciertos fármacos escasamente solubles en oposición a la forma regularmente molida. La micronización aumenta el área de superficie expuesta al medio de disolución y por ende mejora la velocidad de disolución.

No obstante, debe reconocerse que el simple aumento del área de superficie del fármaco no siempre garantiza un aumento equivalente de la velocidad de disolución. Más bien, es el aumento del área de superficie efectiva o el área expuesta al medio de disolución y no el área de superficie absoluta lo que es directamente proporcional a la velocidad de disolución.

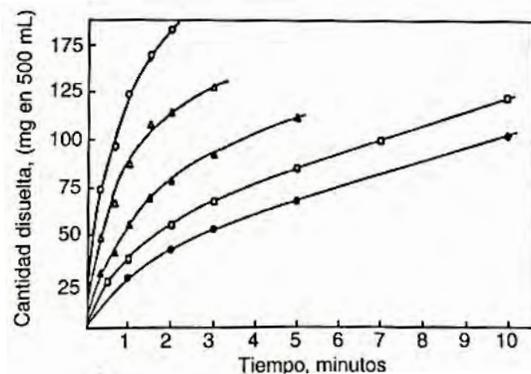


Figura 13 El efecto del tamaño de las partículas sobre la velocidad de disolución de preparados sólidos. Tamaño de partículas de Fenacetina: ○ 0.11-0.15 mm; △ 0.15-0.21 mm; ◒ 0.21-0.30 mm; ◻ 0.30-0.50 mm; ● 0.50-0.71 mm. Modificado de (Gennaro, 2003)

Estado cristalino

Las características de fase sólida de los fármacos, como la amorficidad, la cristalinidad, el estado de hidratación y la estructura polimorfismo, han demostrado tener una influencia significativa sobre la velocidad de disolución. Por ejemplo, se ha demostrado que la forma amorfa de la novobiocina tiene una mayor solubilidad y mayor velocidad de disolución que la forma cristalina los estudios a nivel sanguíneo confirmaron estos datos, la administración de la forma amorfa dio como resultado una concentración de 3 a 4 veces mayor que la obtenida con la administración de la forma cristalina. (Haleblian, 1975; Mullins & Macek, 1960)

3.2.4.2. Parámetros de la prueba

Agitación

La relación entre la intensidad de la agitación y la velocidad de disolución varía en forma considerable con el tipo de agitación usado, el grado de flujo laminar y turbulento en el sistema, la forma y el diseño del agitador y las propiedades fisicoquímicas del sólido. Cuando se usa un dispositivo agitador, como la cesta, una paleta, un filtro giratorio, etcétera, la velocidad de la agitación genera un flujo que continuamente modifica la interfase líquido-sólido entre el solvente y el fármaco en una forma similar a la velocidad de flujo en el aparato de disolución del flujo a través.

Los estudios del efecto de la agitación sobre la velocidad de reacciones heterogéneas llevaron a la relación empírica entre la velocidad de disolución y la intensidad de agitación

$$(7) \quad K = a(N)^b$$

Donde N es la velocidad de agitación, K es la velocidad de disolución y a y b son constantes. Si el proceso de disolución es controlado por difusión el valor de b debe ser de 1 o cercano al 1 de acuerdo con la teoría de la película de Nernst- Brunner, que dicen que el espesor de la película es inversamente proporcional a la velocidad de agitación. Sin embargo, si el proceso de disolución es controlado puramente por una reacción interfase, la velocidad de agitación no tendría ninguna influencia sobre la disolución y b debe aproximarse a cero.

Sí están involucrados ambos procesos (como la disolución de ácidos débiles en una solución buffer) el valor de b debe caer entre 0 y 1. Además, a medida que la naturaleza del flujo cambia de laminar a turbulento y de la distancia desde la interfase aumenta, también variará el valor de b con el tipo de agitación utilizado.

Temperatura

Dado que la solubilidad de los fármacos depende de la temperatura, su control cuidadoso durante el proceso de disolución es muy importante y debe mantenerse dentro de un espectro de 0.5 grados. En general siempre se mantiene una temperatura de 37° durante las determinaciones de disolución. El efecto de la temperatura del medio de disolución depende principalmente de las curvas de temperatura/solubilidad del fármaco y los excipientes. Para una molécula disuelta el coeficiente de difusión, D , depende de la temperatura T de acuerdo con la ecuación de Stokes

$$(8) \quad D = kT / (6\pi\eta r)$$

donde k es la constante de Boltzmann y $6\pi\eta r$ es la fuerza de Stokes para una molécula esférica (η es la viscosidad en unidades poise o cgs y r es el radio de la molécula).

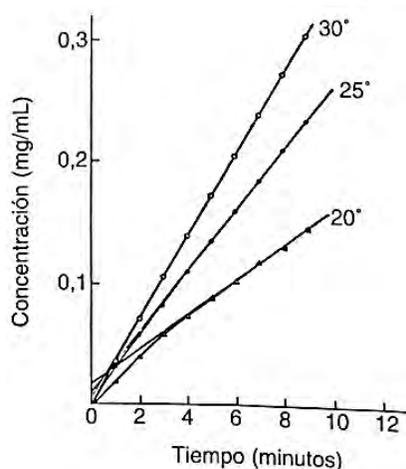
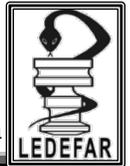


Figura 14 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de disolución. Disolución de anhidrato de fenobarbital a diversas temperaturas (a 300 rpm). Modificado de (Gennaro, 2003)



Medios de disolución

La elección de medio apropiado para las pruebas de disolución depende ampliamente de la solubilidad del fármaco, así como de simples motivos económicos y prácticos.

pH del medio de disolución

En un principio se puso el énfasis y esfuerzo en simular condiciones in vivo, en especial en pH, la tensión superficial, la viscosidad y la condición de sumidero. La mayoría de los estudios preliminares fueron llevados a cabo en soluciones HCl 0.1N o soluciones buffer con un pH aproximado a aquel del jugo gástrico (pH~1.2). Sin embargo, debido a la acción corrosiva de las emanaciones ácidas sobre el equipo de disolución, en la actualidad es de práctica general utilizar agua destilada a menos que estudios de investigación indiquen la necesidad específica de la solución ácida para obtener datos de disolución significativos. Otro enfoque para evitar los efectos deletéreos del HCl consiste en reemplazarlo con buffers ácidos como el fosfato ácido de sodio para mantener el bajo pH requerido.

Tensión superficial del medio de disolución

Se ha demostrado que la tensión superficial tiene un efecto significativo sobre la velocidad de disolución de los fármacos y su velocidad de liberación de preparados sólidos. Las sustancias tensoactivas y los agentes humidificantes reducen el ángulo de contacto y por lo tanto mejoran el proceso de penetración de la matriz por el medio de disolución. Singh y col. informaron un incremento medible de la velocidad de disolución del ácido salicílico de una matriz inerte cuando el ángulo de contacto, θ , se redujo de 92° (agua) a 31° (por medio del empleo de dioctil sulfosuccinato de sodio al 0.01%).

La tensión superficial también disminuyó en forma correspondiente de 60 a 31 dinas/cm. Se obtuvieron los mismos hallazgos en estudios de la Benzocaína cuando se empleó polisorbato 80 como el agente activo de superficie.

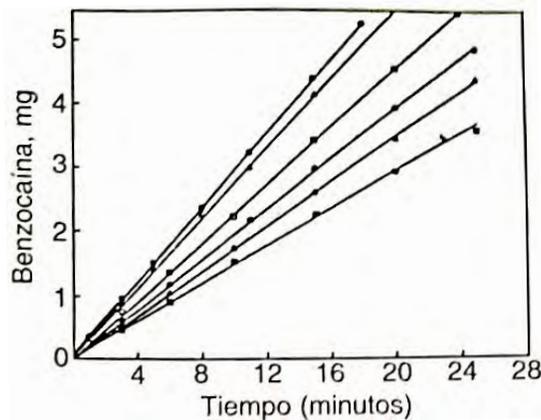


Figura 15 Efectos de sustancia tensoactivas sobre la velocidad de disolución.

A. Datos de disolución para la benzocaina en diferentes concentraciones de polisorbato 80 usando el aparato agitador impulsado por una hélice con una velocidad de agitación de 150 rpm. concentraciones de polisorbato: \circ 6%; Δ 4%; \square 2%; \bullet 1%; \triangle 0.5%; \blacksquare 0%. B. Datos de solubilización para la benzocaina con diferentes concentraciones de polisorbato 80. Modificado de (Gennaro, 2003)

En otros estudios realizados con comprimidos y cápsulas convencionales también se observó un incremento significativo de la velocidad de disolución de fármacos escasamente solubles cuando se agregaron sustancias tensoactivas al medio de disolución, incluso con un nivel por debajo de la concentración micelar crítica, probablemente por reducción de la tensión interfacial. Se ha aconsejado la inclusión de bajos niveles de sustancias tensoactivas en el medio de disolución ya que estos parecen dar una mejor correlación entre los datos *in vitro* y las condiciones *in vivo*.

Viscosidad del medio de disolución

En el caso de procesos de disolución controlados por difusión sería de esperar que la velocidad de disolución disminuyera con un aumento de la viscosidad. Sin embargo, en el caso de los procesos de disolución controlados a nivel de la interfase la viscosidad debe tener poco efecto. La ecuación de Stokes-Einstein describe el coeficiente de difusión D en función de la viscosidad. (Braun & Parrott, 1972) demostraron que la velocidad de disolución del ácido benzoico es inversamente proporcional a la viscosidad del medio de disolución utilizando diversas concentraciones de soluciones de sacarosa y metilcelulosa.

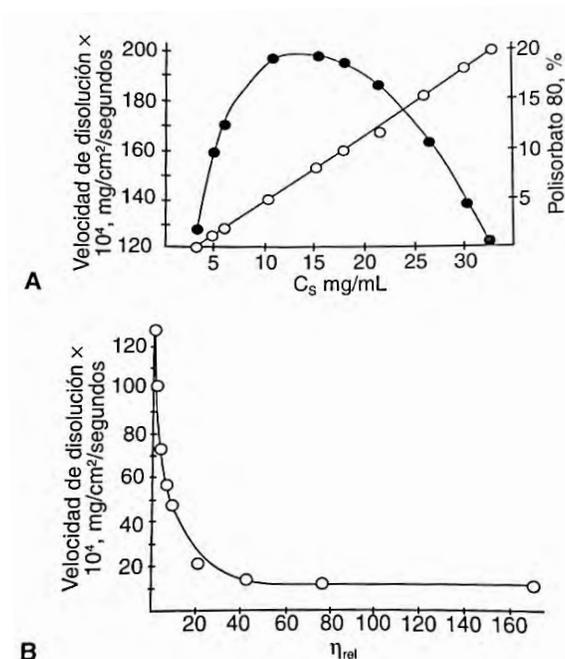


Figura 16 Efecto de la viscosidad sobre la velocidad de disolución

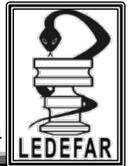
A. Relación de la solubilidad total del ácido benzoico a 25° con la velocidad de disolución y la concentración de polisorbato 80. ● velocidad, y ○ concentración. B. Relación de la viscosidad con la velocidad de disolución del ácido benzoico en soluciones de metilcelulosa acuosa a 25°. Modificado de (Gennaro, 2003)

3.2.5. Desarrollo de un nuevo método de disolución

Los datos de disolución sobre la base de una prueba discriminatoria y bien desarrollada tienen un enorme valor en la selección de la formulación apropiada. La prueba de disolución también puede servir como un mecanismo de control de rutina para asegurar la uniformidad de lotes de producción regulares. Una de las primeras decisiones que deben tomarse en el proceso de desarrollo de un nuevo método de disolución es la elección del aparato.

En la Farmacopea de Estados Unidos USP 38 aparecen siete tipos de aparatos de disolución:

- Aparato 1 (Aparato con canastilla)
- Aparato 2 (Aparato con paletas)
- Aparato 3 (Cilindro oscilante)
- Aparato 4 (Celda de flujo continuo)
- Aparato 5 (Paleta sobre disco)
- Aparato 6 (Cilindro)
- Aparato 7 (Soporte oscilante)



Los cuales difieren en cuanto a la forma y la geometría del recipiente de disolución, el tipo y la intensidad de la agitación, la posición del preparado, la dispersión de las partículas, el volumen del medio de disolución, la capacidad de cambiar el solvente con una cierta velocidad para mantener las condiciones de sink y la reproducibilidad del sistema.

John Wagner advirtió que la variabilidad inherente en el método de disolución debía ser menor que la variabilidad inherente que puede ser tolerada en el producto. También aconsejó el aparato sea científicamente realista y económicamente estable y tenga la capacidad de proporcionar una condición hidrodinámica eficaz. (Wagner, 1971)

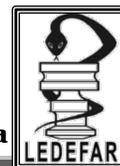
En la decisión en cuanto a que aparato va a ser usado para la prueba debe enfatizarse en que sus características deben permitir un mecanismo conveniente y reproducible para la introducción de la formulación en una posición fija en el medio de disolución con la mínima alteración hidrodinámica. La temperatura del medio de disolución debe ser mantenida rigurosamente con vibraciones mínimas y sin puntos de calentamiento excesivo localizados.

El aparato de disolución también debe permitir el mantenimiento de condiciones sink por medio de la posibilidad del cambio constante del líquido de disolución o mediante el aumento en el volumen de disolución. El aparato debe servir para la prueba de diversos tipos de preparados con una técnica de muestreo conveniente y reproducible que dé como resultado la mínima alteración del lecho de disolución de la formulación o de la condición hidrodinámica del medio de disolución. Deben usarse métodos analíticos simples y rápidos ya que muchos fármacos tienden a degradarse con rapidez en soluciones acuosas.

En general, si va a usarse un aparato del compendio, 900 mL de agua destilada con una velocidad de agitación de 100 rpm para la canasta giratoria y 50 rpm para el método con paletas son buenos puntos de comienzo. Sin embargo, debe llevarse a cabo un control para determinar si es necesaria la desaireación del agua. Si estos parámetros resultan inadecuados, puede probarse con una velocidad de agitación más rápida. Si no resulta exitoso, podría cambiarse la composición del medio de disolución. Podrían probarse sistemas de ácido clorhídrico diluido o buffer de diferentes pH.

El conocimiento de la velocidad de disolución de fármacos escasamente solubles (velocidad de disolución intrínseca, $K=kD/h$ de la ecuación 3) es muy útil para predecir si su absorción biológica está limitada por la disolución o no.

Dependiendo de qué tan lenta sea la velocidad de disolución intrínseca, el operador puede elegir mejorarla por medio de micronización, la formación de complejos, la desintegración o cualesquiera de las otras técnicas generalmente utilizadas para incrementar la velocidad de disolución de fármacos insolubles. (Gennaro, 2003)



3.2.6. Equipos de disolución

A medida que el concepto de disolución adquirió importancia durante las últimas décadas, los métodos y las técnicas usados en el procedimiento *in vitro* han evolucionado considerablemente de un simple aparato rudimentario que puede elaborarse con las herramientas cotidianas de laboratorio a un equipo altamente sofisticado, controlado por microprocesadores y totalmente automático. Los diversos equipos y técnica de disolución por lo general se clasifican de acuerdo con su hidrodinámica asociada.

Se reconoce en dos categorías generales: los sistemas cerrados o métodos con vasos y los sistemas abiertos o métodos de flujo continuo.

El diseño del aparato afecta los resultados de la disolución a través de una cantidad de factores. Estos incluyen la geometría y la estructura del recipiente, el tipo y la intensidad de la agitación, así como la composición y el volumen del medio de disolución. Estos factores a su vez afectan la velocidad de erosión del preparado sólido intacto sobre las partículas, la dispersión de las partículas desintegradas, la homogeneidad del líquido de disolución y finalmente la reproducibilidad del sistema de una corrida a otra.

A continuación, se hace la descripción de los más utilizados.

3.2.6.1. Métodos con vaso

Estos incluyen todos los sistemas con compartimento cerrados con un mecanismo mezclador por convección forzada, en los cuales hay un volumen relativamente grande del medio de disolución (200 a 2000 mL) en un vaso de precipitados o frasco y la agitación se lleva a cabo por medio de algún tipo de mecanismo de agitación, de rotación o de oscilación. Los aparatos 1,2,3,5,6 y 7 descritos en la USP pertenecen a esta categoría.

Sin embargo, los aparatos 1 y 2 son los que se utilizan comúnmente en la práctica.

Aparato 1 de la USP

Consiste en un recipiente de 1000 mL cilíndrico cubierto de vidrio o un material inerte, una canasta de acero inoxidable cilíndrica de malla 40 conectada a un vástago metálico de conducción y un motor de velocidad regulada. El conjunto se coloca en un baño de agua que permite una temperatura constante dentro de la cubeta de $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$ durante la prueba. Se insertan cada uno de estos 6 comprimidos o cápsulas en cada canasta y las canastas se bajan hacia los recipientes de disolución que contienen el volumen del medio de disolución específico, en general agua destilada o HCl 0.1 N. Se recogen muestras filtradas del medio de disolución con ciertos intervalos de tiempo para la determinación de la cantidad del ingrediente activo disuelto



Figura 17 Aparato de disolución I (Aparato de canastilla)

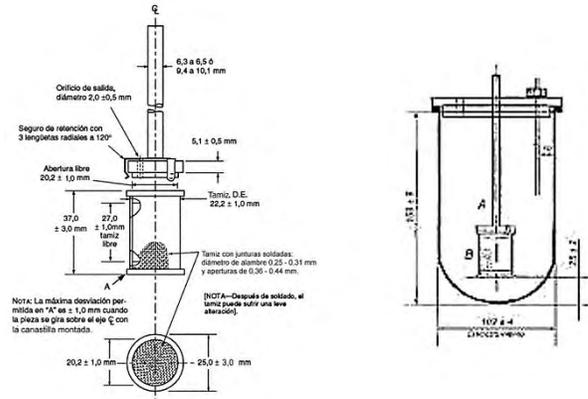


Figura 18 Elemento de agitación de canastilla

Aparato 2 de la USP

Es similar al aparato 1, excepto que se usa una paleta metálica, por lo común recubierta por material inerte, en lugar de la canasta. La paleta se forma de una hoja soldada a un vástago que puede ser conectado al motor de velocidad regulada. Los comprimidos o las cápsulas que dejan caer libremente hasta el fondo del recipiente y se gira la paleta con la velocidad especificada.



Figura 19 Aparato de disolución II (Aparato de paletas)

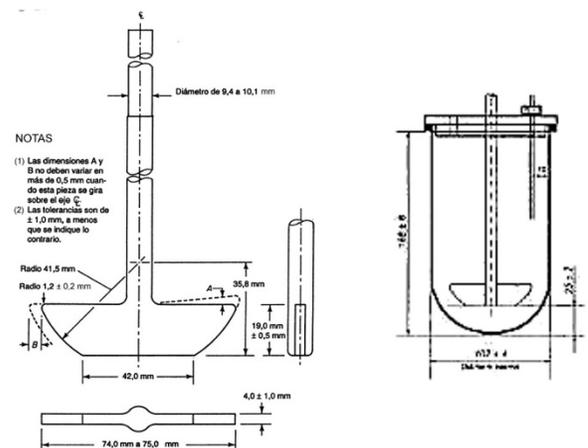


Figura 20 Elemento de agitación de paletas

3.2.6.2. Otros métodos

Las formas de liberación prolongada son ensayadas usando cuatro tipos de aparatos. Los aparatos 1 y 2 son los mismos que los utilizados para los comprimidos y cápsulas de liberación intermedia. El aparato 3 se clasifica como del tipo del cilindro oscilante y el aparato 4 es del tipo de flujo continuo.

Aparato 3

Consiste en un grupo de recipiente cilíndricos de vidrio, de fondo plano; un grupo de cilindros de vidrio recíprocos; adaptadores y pantallas de acero inoxidable que se adaptan en la parte superior en la base de los cilindros de interior indicó un ensamble propulsor y conductor para mover los cilindros verticalmente dentro de los recipientes. El aparato también tiene la capacidad de alinear los cilindros en otra fila de recipientes. Los recipientes están parcialmente inmersos en un apropiado baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$.

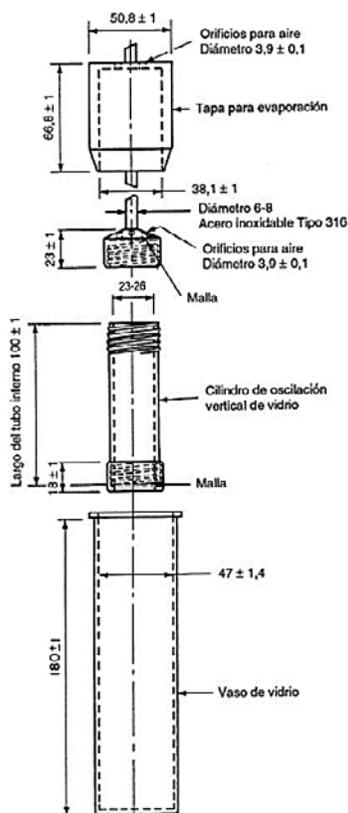


Figura 21 Aparato de disolución III (Cilindro oscilante)

Aparato 4

El equipo se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37\text{ °C} \pm 0.5\text{ °}$. Usar la celda del tamaño (especificado en la monografía individual). La bomba desplaza el medio de disolución a través de la celda de flujo en dirección ascendente. La bomba tiene un intervalo de operación de 240 mL a 960 mL por hora y las velocidades de flujo estándares son de 4 mL, 8 mL y 16 mL por minuto. La bomba debe suministrar un flujo constante (+5% de la velocidad de flujo nominal); el perfil del flujo es sinusoidal con una pulsación de 120+10 pulsos por minuto. La celda de flujo, de un material transparente e inerte, está montada verticalmente con un sistema de filtro que impide que se escapen partículas no disueltas de la parte superior de la celda. La base cónica de la celda esta generalmente llena de pequeñas perlas de vidrio de aproximadamente 1 mm de diámetro y una de esas perlas, de aproximadamente 5 mm, está ubicada en el ápice para proteger el tubo de entrada del fluido. La celda se sumerge en un baño de agua y se mantiene la temperatura a $37\text{ °C} \pm 0.5\text{ °}$.



Figura 22 Aparato IV (celda de flujo continuo)

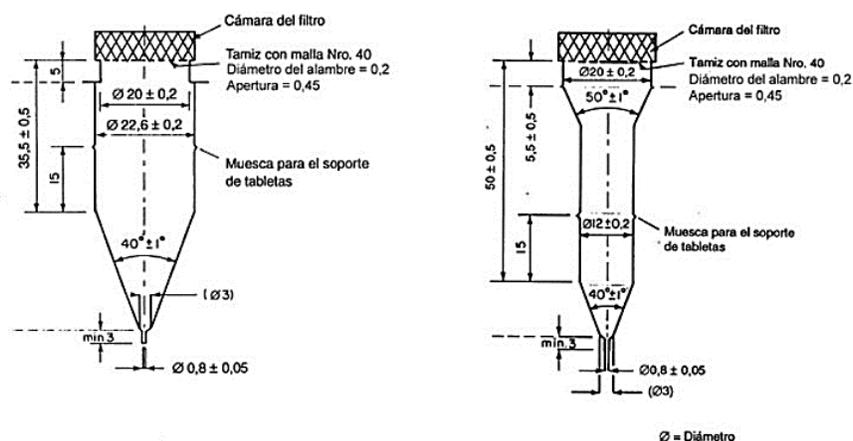
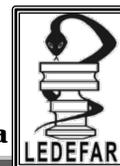


Figura 23 Celda (arriba) y portatabletas (abajo) para tabletas y capsulas, grande y pequeña (izquierda y derecha)

(The United States Pharmacopeial, 2007)



3.3. Cromatografía

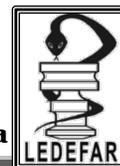
La cromatografía es un potente método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. La técnica fue inventada y denominada así por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX. Él la utilizaba para separar varios pigmentos vegetales, como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar soluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego chroma que significa “color”, y graphein que significa “escribir”).

Descripción general

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas; muchas de dichas separaciones son imposibles por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una fase móvil (que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico) la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil. En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa. (Skoog, 2008)

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
1. Cromatografía de gases (CG)	a) Cromatografía gas-líquido (CGL)	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre un gas y un líquido
	b) Gas-sólido	Sólido	Adsorción
2. Cromatografía de líquidos (CL)	a) Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre líquidos inmiscibles
	b) Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	c) Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	d) Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución-exclusión
	e) Afinidad	Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida	Distribución entre el líquido de la superficie y el líquido móvil
3. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS; fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

Tabla 1 Clasificación de los métodos cromatográficos de columna (Skoog, 2008)



3.3.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

3.3.1.1. Antecedentes

En el inicio de la Cromatografía de Líquidos (CL), ésta se llevaba a cabo en columnas de vidrio con diámetros de 10 a 50 mm. Las longitudes rellenas de la columna eran de 50 a 500 cm de partículas sólidas cubiertas con un líquido adsorbido que formaba la fase estacionaria. Para asegurar tasas de flujo razonables a través de este tipo de fase estacionaria, las dimensiones de las partículas sólidas se mantenían en más de 150 a 200 μm . Incluso así, las tasas de flujo eran bajas, de un máximo de unas pocas décimas de mililitro por minuto.

En las primeras etapas de desarrollo de la cromatografía de líquidos, los científicos se dieron cuenta de que podían conseguir aumentar en forma notable la eficiencia de la columna al disminuir el tamaño de las partículas del empaque. Utilizar empaques de tamaño de partícula tan pequeños como del orden de 3 a 10 μm . Esta técnica requería instrumentos complejos para poder trabajar a altas presiones, lo que contrasta de manera notable con las sencillas columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica cuyo flujo se debía a la gravedad. Para diferenciar estos procedimientos más nuevos de los métodos originales de flujo por gravedad se empleó en un principio la denominación de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). En la actualidad, toda la cromatografía de líquidos se efectúa con flujo presurizado y se utilizan las siglas LC o HPLC sin distinción.

3.3.1.2. Campo de aplicación

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas. (Skoog, 2008)

3.3.1.3. Parámetros cromatográficos

Todo tipo de cromatografía tiene en común las definiciones y cálculos de parámetros y requerimientos generales para comprobar la aptitud del sistema.

Estos parámetros se determinan con respecto al cromatograma correspondiente, el cual es un gráfico o representación de la respuesta del detector en función del tiempo. Este es útil tanto para análisis cualitativo como cuantitativo, ya que la posición de los picos en el eje del tiempo puede ayudar para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de cada componente.

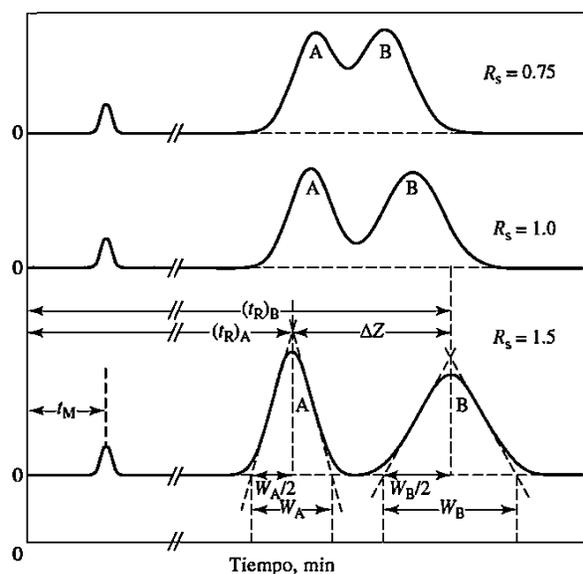


Figura 24 Cromatogramas donde se muestran los parámetros de la cromatografía (Skoog, 2008)

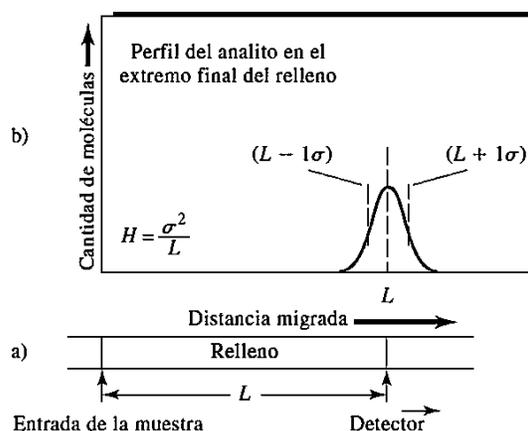


Figura 25 Definición de altura de platos teóricos (Skoog, 2008)

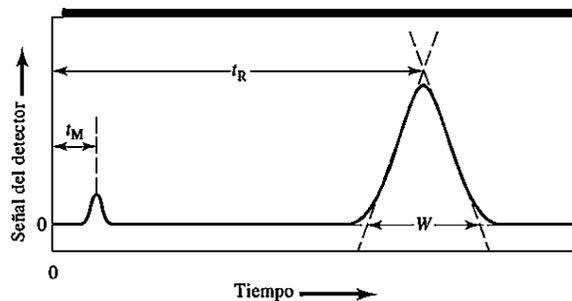
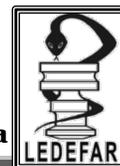


Figura 26 Determinación de la cantidad de platos teóricos

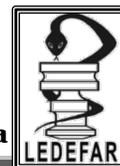


Nombre	Símbolo del parámetro experimental
Tiempo de migración, especies no retenidas	t_M
Tiempos de retención, especies A y B	$(t_R)_A, (t_R)_B$
Tiempo de retención ajustado para A	$(t'_R)_A$
Anchuras de picos para A y B	W_A, W_B
Longitud del relleno de la columna	L
Tasa de flujo volumétrico	F
Velocidad de flujo lineal	u
Volumen de la fase estacionaria	V_S
Concentración del analito en las fases móvil y estacionaria	c_M, c_S

Tabla 2 Parámetros cromatográficos (Skoog, 2008)

Nombre	Cálculo de cantidades derivadas	Relación con otros parámetros
Velocidad lineal de la fase móvil	$u = \frac{L}{t_M}$	
Volumen de la fase móvil	$V_M = t_M F$	
Factor de retención	$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	$k = \frac{KV_S}{V_M}$
Constante de distribución	$K = \frac{kV_M}{V_S}$	$K = \frac{c_S}{c_M}$
Factor de selectividad	$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$	$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Resolución	$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right)$
Número de platos	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$	$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2$
Altura de plato	$H = \frac{L}{N}$	
Tiempo de retención	$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k_B)^3}{(k_B)^2}$	

Tabla 3 Relaciones cromatográficas importantes (Skoog, 2008)



3.3.1.4. *Conformación del cromatógrafo de líquidos*

Con el objetivo de alcanzar flujos razonables con rellenos de tamaño de partícula de entre 3 y 10 μm , que por otra parte son comunes en la cromatografía de líquidos moderna, se requieren presiones de bombeo de varios cientos de atmósferas. Debido a estas presiones elevadas, el equipo necesario para la cromatografía de líquidos de alta resolución tiende a ser más complejo y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía.

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos característico en general son los siguientes con varias opciones:

- Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento del solvente
- Sistemas de bombeo
 - Bombas reciprocantes
 - Bombas de desplazamiento
 - Control de flujo y sistemas de programación
- Sistemas de inyección de muestra
- Columnas para cromatografía de líquidos de alta resolución
 - Columnas analíticas
 - Precolumna
 - Control de la temperatura de la columna
- Varios Tipos de rellenos de la columna
- Detectores
 - Detectores de absorción UV-visible
 - Detectores de absorción en el infrarrojo.
 - Detectores de fluorescencia
 - Detectores de índice de refracción
 - Detector de la dispersión de la luz tras evaporación
 - Detectores electroquímicos
 - Detectores espectrométricos de masas

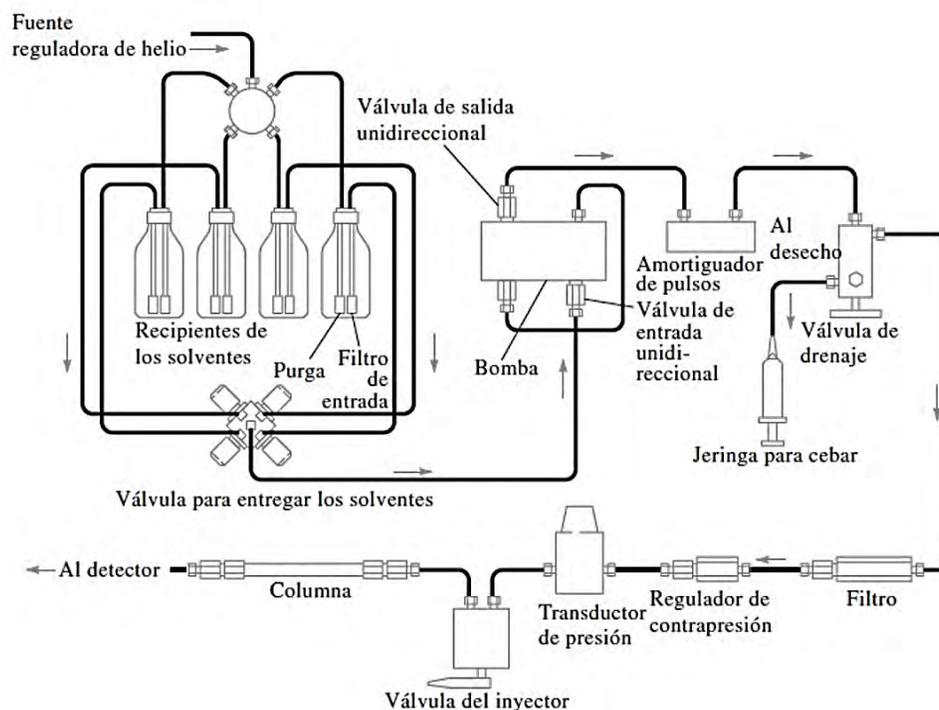
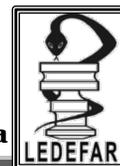


Figura 27 Diagramas de bloques que muestra los componentes de un aparato característico de CLAR (Skoog, 2008)

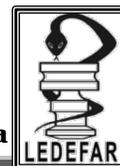
Detector HPLC	Disponible comercialmente	Límites de detección de masa* característicos	Intervalo lineal [†] (décadas)
Absorbancia	Sí	10 pg	3-4
Fluorescencia	Sí	10 fg	5
Electroquímica	Sí	100 pg	4-5
Índice de refracción	Sí	1 ng	3
Conductividad	Sí	100 pg-1 ng	5
Espectrometría de masas	Sí	<1 pg	5
IR de transformada de Fourier	Sí	1 µg	3
Dispersión de la luz	Sí	1 µg	5
Actividad óptica	No	1 ng	4
Selectivo a elementos	No	1 ng	4-5
Fotoionización	No	<1 pg	4

Tabla 4 Características de los detectores para CLAR (Skoog, 2008)



4. HIPOTESIS

Si se desarrolla y valida un método analítico para cuantificar curcumina en un medio de disolución y si se definen condiciones de operación óptimas en el aparato de Wood, se podrán elaborar cinéticas de disolución y se obtendrán los valores de la velocidad de disolución intrínseca k ($\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$) de curcumina



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

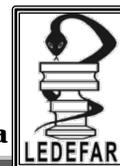
5.1. MATERIALES

Material

- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3 y 4 mL (KIMAX “A”)
- Matraces Volumétricos de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 L (KIMAX)
- Varilla de vidrio
- Pipetas graduadas de 2 y 10 mL (KIMAX)
- Pesa muestras de vidrio
- Vaso de precipitados de 50, 100, 500 mL (KIMAX)
- Espátula de acero inoxidable
- Probetas de vidrio de 100 y 1000 mL (KIMAX)
- Vaso para disolutor 1000 mL (VARIAN)
- Barras magnéticas (35 x 10 mm)
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Tubos de ensayo (85 x 15 mm)
- Celdas de cuarzo 1 cm longitud (Varian Cary UV) (4.5 mL volumen)
- Filtros de disco 0.45 μm (Acrodisc GHP)
- Columna de vidrio para cromatografía (4.5 x 46 cm)
- Silica para cromatografía de capa fina (Kiesegel 60 GF₂₅₄)
- Silica para cromatografía en columna (0.2 – 0.5 mm)
- Placas para cromatografía de capa fina en hojas de aluminio (Silica gel 60 F₂₅₄)
- Cámara cromatográfica
- Frascos de vidrio de 100 mL
- Matraz de bola de 500 mL
- Embudo de vidrio de cola larga
- Papel filtro Watman 540, 542 y 44
- Campana de vacío
- Equipo de filtración (VWR)/membranas HVLP 0.45 μm

Equipo

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (WatersTM)
 - Controlador (Waters 600)
 - Bomba (Waters 616)
 - Desgasificador (Degasys Populaire DP4010 Uniflows)
 - Automuestreador (Waters 717 plus)
 - Detector (Waters 996 PAD)



- Software (Empower 1.0)
- Columna XBridge C₁₈ 4.6 x 250 mm, 5µm [186003117]
- Espectrofotómetro UV (VARIAN, Cary 100 Conc.)
 - Software (Cary WinUV Scan 3.0, Cary WinUV Simple Reads 3.0)
- Disolutor Varian, (VK 7000)
 - Heater/Circulador (Varian VK 650A)
- Aparato de Wood
- Automuestreador (Varian VK 8000)
 - Bomba neumática (Vankel)
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (Varian Mercury-300)
- Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-6010LA)
- Purificador de agua (Elix 5, MiliQ-5)
- pH metro (Metler Toledo, Seven Multi)
- Balanza Analítica (Metler Toledo AB204-5)
- Prensa Hidráulica (Carver Modelo C)
- Agitador Magnético (IKA Werke RO 10 power)
- Rotavapor (BÜCHI R-200)
- Cámara UV (UVP Modelo UVLS-24)
- Infrarrojo (FOSS NIR System 6500II)
 - Software (FOSS Nirsystems, Inc. VISION 3.1.0.0)

Reactivos

- Ácido clorhídrico “Grado Reactivo” 36.5-38 % (J.T. Baker)
- Agua desionizada (Milli Q)
- Fosfato de potasio monobásico “Grado Reactivo” 99.3 % (J.T. Baker)
- Acetato de sodio trihidratado “Grado Reactivo” 99.8 % (J.T. Baker)
- Ácido acético “Grado Reactivo HPLC” 100.0 % (J.T. Baker)
- Hidróxido de sodio “Grado Reactivo” 97.0 % (J.T. Baker)
- Ácido Tricloroacético “Grado Reactivo” 99.0 % ()
- Hidróxido de amonio “Grado Reactivo” 28.8 %
- Acetonitrilo “Grado HPLC” 99.99 % (J.T. Baker)
- Metanol “Grado HPLC” 99.96 % (J.T. Baker)
- Cloroformo “Grado Reactivo” 99.9 % (Fermont)

Materia prima

- Tween 80 (Canarcel)
- Lauril sulfato de Sodio (Reactivos Meyer)
- Curcumina (Sigma Aldrich Lote 081M1611V) ≈ 70%
- Curcumina Purificada

5.2.METODO

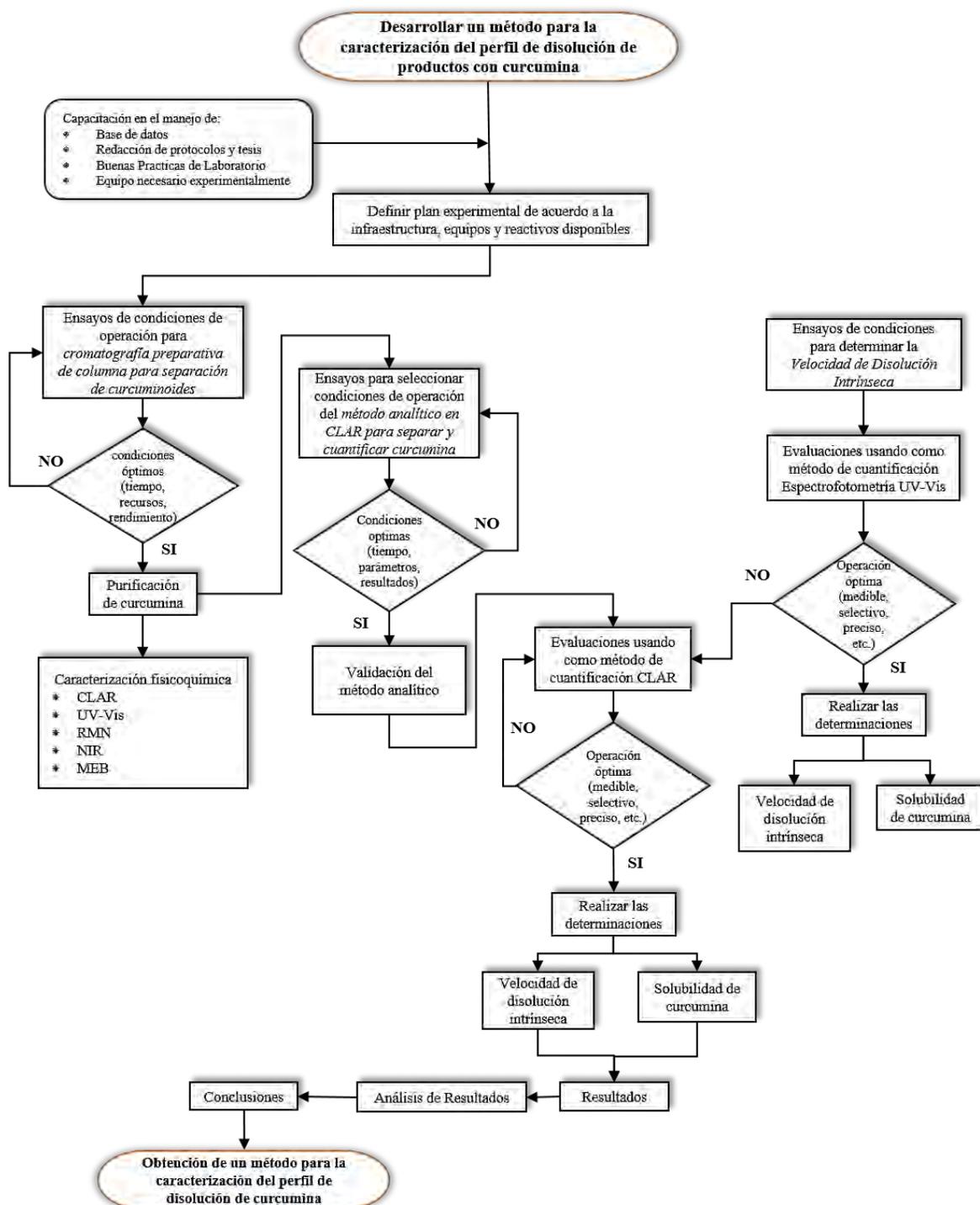
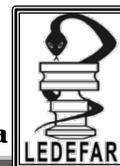


Figura 28 Diagrama de flujo del desarrollo experimental



Como preámbulo al desarrollo experimental se tuvo una capacitación en el manejo de base de datos de la UNAM, con el fin de conocer el estado del arte sobre cualquier tópico necesario para la elaboración del presente trabajo. Alternadamente se tomó un curso de redacción de protocolos y tesis con la finalidad de cumplir con los requisitos y calidad en el trabajo de tesis redactado.

Seguido a la capacitación documental se tomó una capacitación experimental sobre BPL y el correcto uso de los equipos e instrumentos que se utilizaron para el desarrollo del trabajo.

5.2.1. Separación de curcumina

5.2.1.1. Selección de condiciones para cromatografía preparativa en columna

Las condiciones de trabajo se basaron en la investigación bibliográfica de métodos de separación de curcuminoides en CCF (Cromatografía de capa fina) y CCFAR (Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución).

Se reportó una buena separación de los curcuminoides en una fase estacionaria de silica gel y una fase móvil de Cloroformo: Metanol=19:1 (v/v). (Lestari & Indrayanto, 2014)

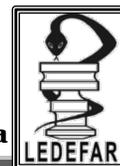
Las condiciones de CCF se transfirieron a una CL (Cromatografía de Líquidos) probando:

- *Tamaño de partícula silica gel:*
 - 9.5 - 11.5 μm
 - 200 - 500 μm
- *Columna (diámetro x altura):*
 - 4.5x46 cm
 - 12x46 cm

Finalmente se usó silica de tamaño 9.5-11.5 μm y la columna de 4.5 x 46cm, que separo la curcumina eficientemente. El sistema cromatógrafico se conectó a un sistema de vacío, así el proceso de separación duró alrededor de 8 horas.

5.2.1.2. Cromatografía preparativa en columna

Inicialmente, se evaluaron los solventes para descartar la presencia de agua en alto porcentaje, mediante RMN para H^1 con CDCl_3 (Cloroformo deuterado) y TMS (Tetrametilsilano) como fuente de H^1 y referencia respectivamente, los espectros se muestran en Anexos Figura 72 y 73.



1. Montar sistema cromatográfico:

- 1.1. Armar un soporte universal y sujetar un aro de metal 7 cm de diámetro a 20 cm del nivel de la mesa.
- 1.2. Debajo del aro colocar la campana de vacío.
- 1.3. Pasar la columna a través del aro y descansarla sobre la campana de vacío.

2. Preparar muestra

- 2.1. Pesar en un vaso de precipitados de 100 mL alrededor de 2 g de Curcumina Sigma Aldrich (mezcla de curcuminoides).
- 2.2. Adicionar un poco de metanol para disolver la curcumina.
- 2.3. Agregar alrededor de 10 g de silica gel.
- 2.4. Adicionar lo mínimo necesario de cloroformo para formar una suspensión muy densa.
- 2.5. Mezclar y poner en una campana de vacío para evaporar los solventes.

3. Preparar columna

- 3.1. Preparar una suspensión de silica gel
 - 3.1.1. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL colocar aproximadamente 300 g de silica gel, seguido por aproximadamente 300 mL de fase móvil de cloroformo:metanol=19:1 (v/v)
 - 3.1.2. Con una varilla de vidrio agitar hasta obtener una suspensión homogénea
- 3.2. Colocar dentro de la columna los siguientes elementos en el orden que aparecen:
 - 3.2.1. Tapón de algodón (ligeramente apretado)
 - 3.2.2. Suspensión de silica gel, con ayuda de un embudo grande*
 - 3.2.3. Papel filtro de poro mediano de 4.5 cm de diámetro
 - 3.2.4. Muestra, con ayuda de un embudo de vidrio de cola larga
 - 3.2.5. Trozo de algodón

*Una vez agregada la suspensión esperar a que asiente la silica suspendida (alrededor de 4 horas)

4. Elución

- 4.1. Encender el sistema de vacío
- 4.2. Recolectar las fracciones en frascos de vidrio cada 20 mL aproximadamente
- 4.3. Monitorear las fracciones obtenidas mediante cromatoplasca Silica gel 60 F₂₅₄ de 15 x 40 mm usando como referencia Curcumina Sigma Aldrich
 - 4.3.1. Los curcuminoides se logran ver (color naranja) sin revelado y revelado con lámpara UV a 365nm

5. Obtener polvo de curcumina purificada

- 5.1. Juntar las fracciones que contienen únicamente curcumina y vaciar a un matraz de bola de 500 mL.
- 5.2. Colocar el matraz en un rotavapor a una temperatura de 70 °C
- 5.3. Retirar el matraz cuando se observe una solución más concentrada, sin que todo el solvente se evapore
- 5.4. Vaciar a un frasco de vidrio y colocar en campana de vacío para evaporar a temperatura ambiente todo el solvente restante
- 5.5. Resguardar en un vial apropiado el polvo de curcumina obtenido

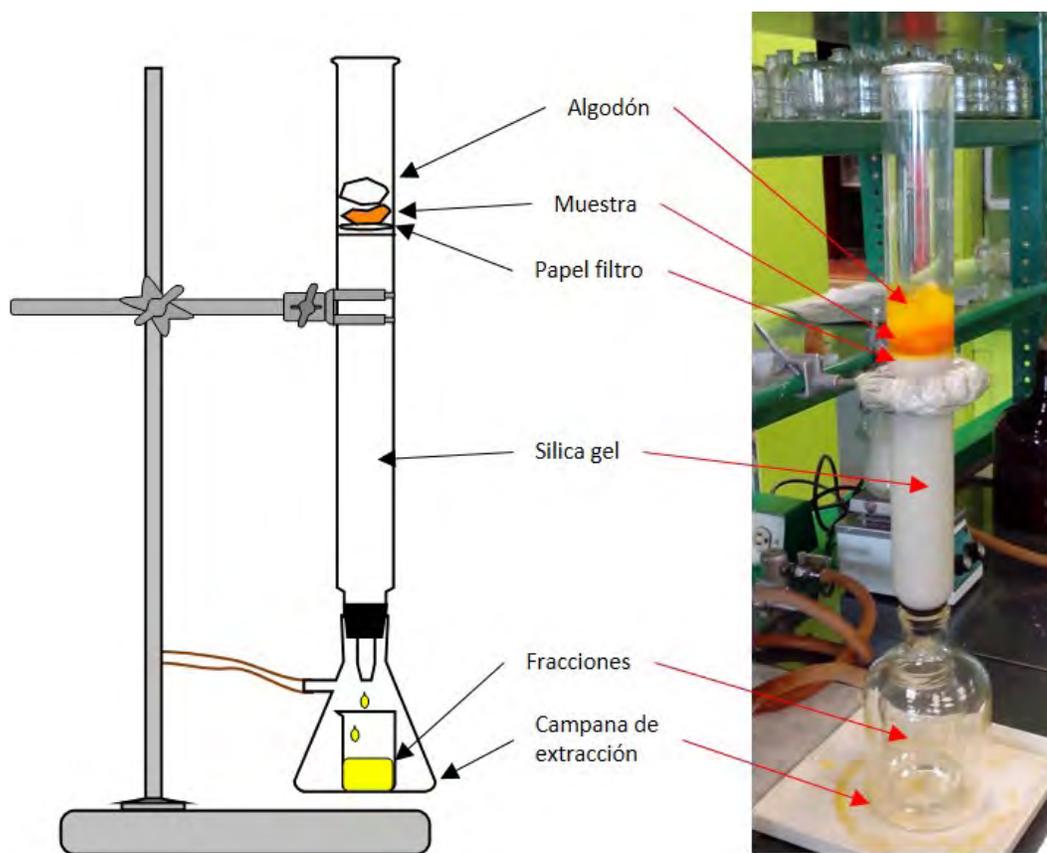
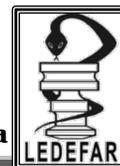


Figura 29 Esquema para montar el sistema de cromatografía preparativa



6. Caracterización:

6.1. RMN

- 6.1.1. Preparar muestra en un vial, con 30 mg Curcumina en DMSO
- 6.1.2. Obtener espectro¹H-RMN y ¹³C-RMN de curcumina en espectrómetro de RMN Varian Mercury-300, tomando como referencia TMS

6.2. UV-VIS

- 6.2.1. Preparar muestras de curcumina de 4 y 8 µg/mL a partir de un stock de 100 µg/mL para evaluar linealidad del sistema a 425 nm
- 6.2.2. Realizar un barrido espectrofotométrico de 200-800 nm en agua

6.3. CLAR

- 6.3.1. Preparar stock de aproximadamente 10 mg de curcumina estándar en 100mL de Acetonitrilo
- 6.3.2. A partir del stock diluir 1mL en 50mL aforando con fase móvil
- 6.3.3. Tomar 2 mL de la dilución anterior y aforar a 10mL con fase móvil
- 6.3.4. Inyectar 50µL de la solución final y analizar con el procedimiento descrito en “Método analítico en CLAR” en la siguiente sección.

6.4. MEB

- 6.4.1. Encender el Microscopio electrónico de barrido
- 6.4.2. Preparar muestras de menos de 1 mg en los portamuestras del microscopio
- 6.4.3. Realizar enfoques para visualizar las muestras
- 6.4.4. Obtener imágenes de curcumina estándar con MEB

6.5. NIR

- 6.5.1. Encender el Espectrómetro de Infrarrojo
- 6.5.2. Calibrar con la referencia
- 6.5.3. Tomar una muestra de aproximadamente 5 mg de curcumina y colocarla dentro de un vial para leer en el espectro
- 6.5.4. Realizar la lectura de 1100 a 2500 nm

5.2.2. Definición del sistema para cuantificar curcumina por CLAR con DAD

5.2.2.1. Selección de condiciones del método analítico en CLAR

Con la investigación bibliográfica se encontraron distintos métodos de separación, detección y cuantificación de curcuminoides, sin embargo los experimentos realizados se apoyan en el trabajo de “Jadhav, Mahadik, & Paradkar, 2007”, para el estudio se eligieron los siguientes materiales y condiciones a estudiar:

- *Columna*
 - Vydac C₁₈, 4.6 x 250 mm, 10µm [201HS104]
 - Simmetry C₁₈, 4.6 x 250 mm, 5µm [WAT054275]
 - XBridge C₁₈ 4.6 x 250 mm, 5µm [186003117]

- *Proporción de Fase móvil (ATC: ACN)*
 - 50:50
 - 52:48
 - 54:46

- *Velocidad de flujo*
 - 1 mL/min
 - 1.1 mL/min
 - 1.2 mL/min
 - 1.3 mL/min
 - 1.5 mL/min

- *Volumen de inyección*
 - 10 µL
 - 20 µL
 - 30 µL
 - 50 µL
 - 100 µL

Finalmente, las condiciones óptimas para el estudio que fueron seleccionadas son las siguientes:

Temperatura ambiente (23-26°C), Columna XBridge C₁₈ 4.6 x 250 mm, 5µm, fase móvil Acido Tricloroacético 0.1%: Acetonitrilo (52:48), velocidad de flujo de 1.1 mL/min, detección en 425nm, 50µL volumen de inyección

5.2.2.2. Método analítico en CLAR

1. Preparación de sistema cromatográfico

- 1.1. Preparar solución de ATC 0.1% en agua desionizada y ajustar a un pH=3 con hidróxido de amonio
- 1.2. Filtrar la solución de ATC 0.1%, Acetonitrilo, metanol y agua desionizada a través de un filtro de membrana de 0.45 μ m
- 1.3. Encender todo el sistema cromatográfico (desgasificador, bomba, detector, automuestreador, ordenador) y purgar las 4 líneas (ATC 0.1%, Acetonitrilo, metanol y agua desionizada).
- 1.4. Conectar la columna XBridge C₁₈ 4.6 x 250 mm, 5 μ m
- 1.5. Equilibrar la columna durante 40 minutos con la fase móvil.
- 1.6. Realizar prueba de *adecuabilidad* con el punto central de la curva de calibración
- 1.7. Colocar las muestras para analizar en los viales del Automuestreador
- 1.8. Comenzar el análisis

2. Preparación de muestras

2.1. Curcumina Estándar

- 2.1.1. Pesar aproximadamente 10 mg de curcumina estándar.
- 2.1.2. Aforar a 100 mL con Acetonitrilo (Stock)
- 2.1.3. Tomar 1 mL del stock y aforar a 50 mL con fase móvil ACT 0.1 %: ACN (50:50)
- 2.1.4. De la dilución anterior tomar alícuotas de 0.5, 1, 2, 3, 4 mL y aforar a 10 mL con fase móvil ACT 0.1 %: ACN (50:50) que formaran la curva de calibración para la validación del sistema
- 2.1.5. Validación del sistema
 - 2.1.5.1. Linealidad
 - 2.1.5.1.1. Realizar la determinación de 5 niveles de concentración, cada nivel por triplicado, utilizando como medio de disolución la fase móvil, y mediante el análisis en CLAR obtener los valores correspondientes de área en función de la concentración, obtener el coeficiente de regresión (r^2), la pendiente (m) el intercepto (b); y calcular el coeficiente de variación expresado en porcentaje (C.V%).
 - 2.1.5.2. Precisión
 - 2.1.5.2.1. Realizar la determinación de tres niveles de concentración de una solución estándar de curcumina, los puntos extremos y el centro por sextuplicado, finalmente evaluar el coeficiente de variación expresado en porcentaje (C.V.%)
- 2.1.6. Tomar con una jeringa de la dilución final trasvasar a los viales del automuestreador del cromatógrafo filtrando con disco GHP 0.45 μ m.

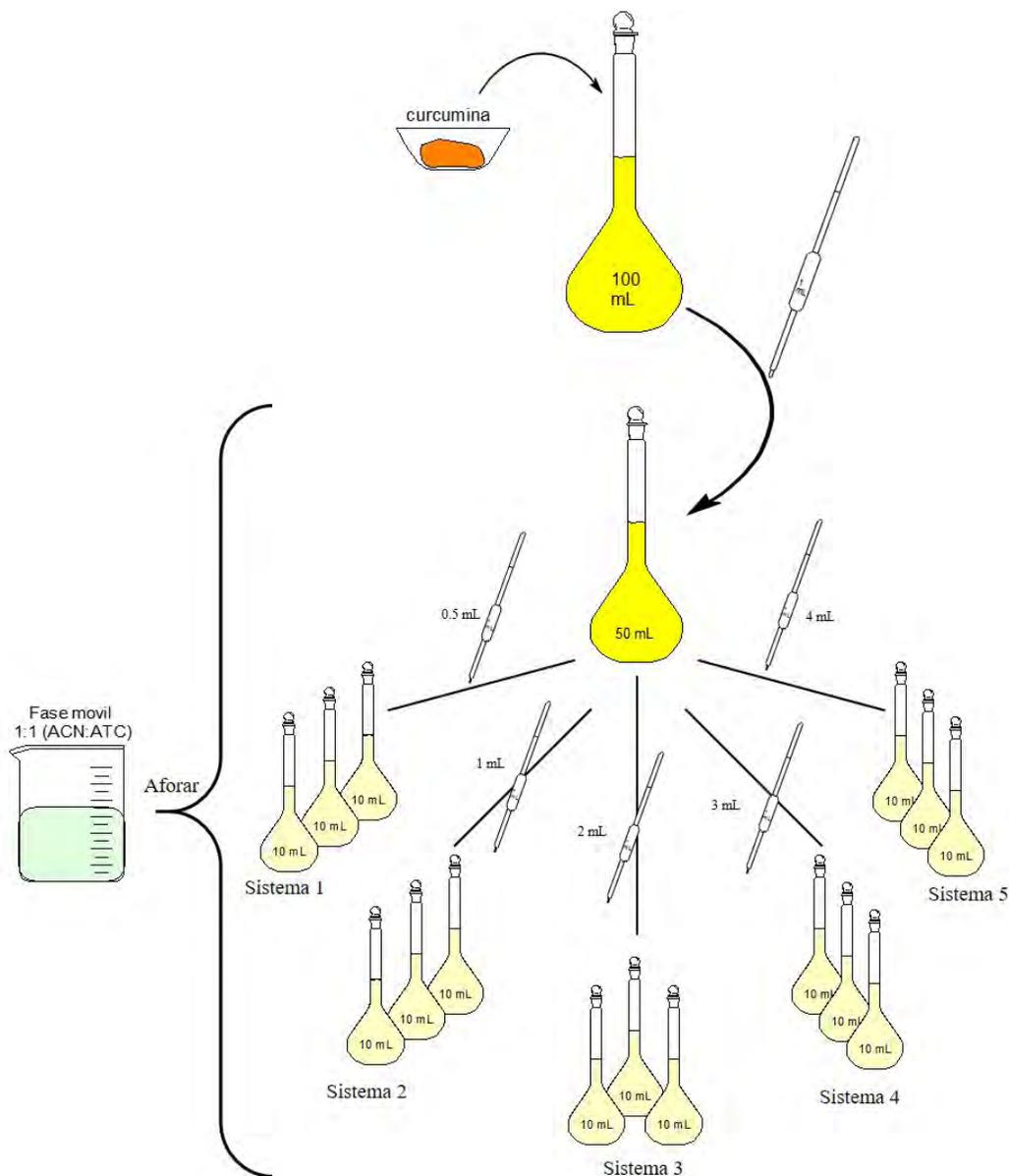


Figura 30 Metodología para construir una curva de calibración de curcumina y evaluar linealidad del sistema

Tabla 5 Niveles de concentración para evaluar linealidad del sistema de curcumina

Sistema	Alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.5	10	0.096
2	1	10	0.192
3	2	10	0.384
4	3	10	0.576
5	4	10	0.768

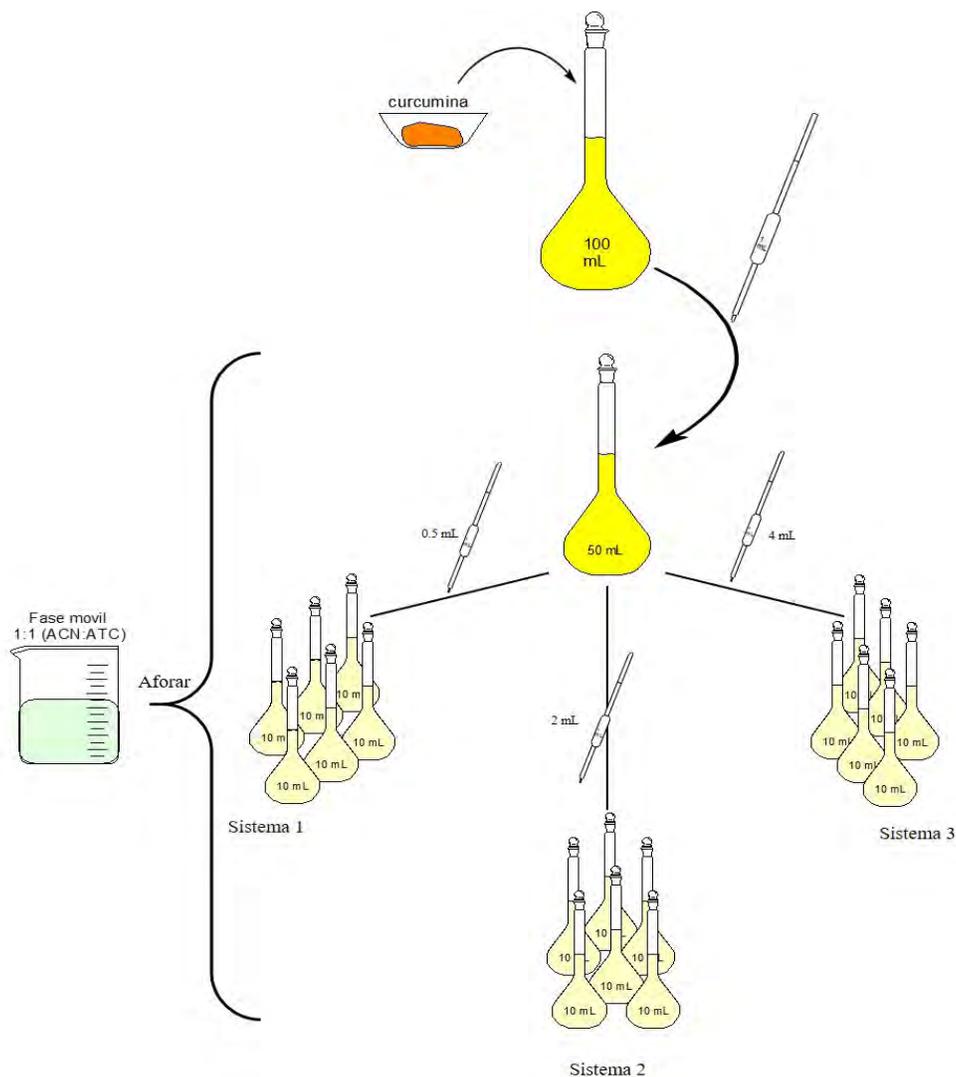


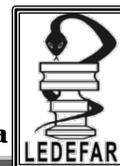
Figura 31 Metodología para evaluar precisión del sistema de curcumina

Tabla 6 Niveles de concentración para evaluar precisión del sistema de curcumina

Sistema	Alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (µg/mL)
1	0.5	10	0.096
2	2	10	0.384
3	4	10	0.768

2.2. Velocidad de disolución intrínseca

- 2.2.1. Las muestras recolectadas por el automuestreador de la disolución se toman hasta que alcancen la temperatura ambiente
- 2.2.2. Tomar con una jeringa de las muestras recolectadas y trasvasar a los viales del automuestreador del cromatógrafo filtrando con disco GHP 0.45µm.



5.2.3. Validación del proceso de disolución

5.2.3.1. Selección de condiciones para el perfil de disolución de curcumina

La USP 30 describe en el capítulo <1087> la determinación de la velocidad de disolución intrínseca, indicando que debe de existir para la sustancia pura un área superficial constante y comprimir la sustancia en una prensa hidráulica durante 1 minutos a la mínima fuerza de compresión que no se desintegre el compacto formado (The United States Pharmacopeial, 2007). También menciona factores intrínsecos y extrínsecos que influyen la velocidad de disolución intrínseca y que no están establecidos, ajustables a cada sustancia. Por esto se estudiaron los siguientes factores:

- Cuantificación
 - Espectrofotómetro UV-Vis
 - Cromatografía CLAR
- Fuerza de compresión del compacto (Ton)
 - 0.5
 - 0.7
 - 0.9
- Velocidad de agitación (rpm)
 - 50
 - 75
 - 100
- Surfactante en el medio de disolución
 - Tween 80
 - 0.5%
 - 1.5%
 - Dodecil Sulfato de sodio
 - 0.5%
- Medio de disolución (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014)
 - SV de Ácido Clorhídrico 0.1 N o 0.1M pH 1.2 pág. 147
 - SA de Acetato de sodio trihidratado-Ácido acético 2 N pH 4.5 pag.166
 - SA de Fosfatos pH 6.8 (Fosfato monobásico de potasio-Hidróxido de sodio) pág. 175

Los factores que se mantuvieron constantes fueron: Aparato de Wood, 37 °C Temperatura del medio de disolución, 900 mL medio de disolución, área de exposición 0.5 cm², 5mL muestreo.

Las condiciones que se determinaron óptimas para la disolución intrínseca fueron las siguientes: Fuerza de compresión de 0.9 Ton., velocidad de agitación de 75 rpm, Tween al 1.5 % en el medio, a pH 1.2 y 6.8.

5.2.3.2. Velocidad de disolución intrínseca

1. Solubilidad de curcumina “Shake Flask Method”

- 1.1. Pesar 50 mg aproximadamente de *Curcumina polvo Sigma Aldrich* (~70%) y aforar con Tween 1.5 % en agua destilada, en un matraz de 100 mL
- 1.2. Mantener en agitación durante 24 horas
- 1.3. Tomar muestra de 10 mL aproximadamente y agregarla en un tubo de vidrio para centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos
- 1.4. Tomar una alícuota de 100 μ L del sobrenadante trasvasar a un matraz de 100 mL y aforar
- 1.5. De la última dilución tomar una muestra y trasvasar a los viales del automuestreador del cromatógrafo para analizar

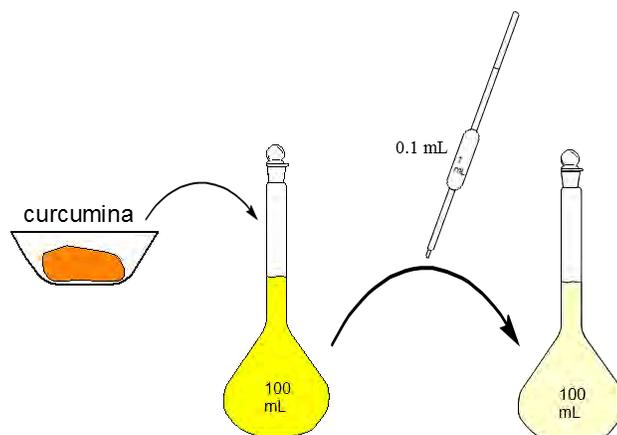


Figura 32 Metodología para evaluar solubilidad de curcumina

2. Medios de disolución

- 2.1. Preparar con Tween 80 y agua destilada una solución al 1.5% (p/v), agitar con una barra magnética hasta su completa disolución.
- 2.2. Utilizar la solución anterior para preparar los medios de disolución:
 - 2.2.1. SV de Ácido Clorhídrico 0.1 N o 0.1M pág. 147 (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014)
 - 2.2.2. SA de Fosfatos pH 6.8 (Fosfato monobásico de potasio-Hidróxido de sodio) pág. 175 (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014)
 - 2.2.3. Colocar 900mL del medio de disolución en cada vaso del disolutor
 - 2.2.4. Esperar a que alcance una temperatura de 37 °C

3. Prueba de disolución intrínseca

- 3.1. Montar el aparato de Wood en el equipo de disolución
- 3.2. Pesar aproximadamente 200 mg de curcumina Sigma Aldrich en un pesamuestra.
- 3.3. Proceder como se especifica en el Capítulo <1087> *Disolución Intrínseca* (The United States Pharmacopeial, 2007), con una fuerza de 0.9 Ton. para formar el compacto
- 3.4. Establecer las siguientes condiciones fijas durante todo el ensayo:
 - 3.4.1. Temperatura del medio de disolución 37°C
 - 3.4.2. Velocidad de rotación 75 rpm
 - 3.4.3. Sin reemplazo del medio, se toman 5 mL de medio en cada tiempo de muestreo a los 90, 120, 150, 180 y 210 min
- 2.3. Analizar las muestras obtenidas siguiendo el procedimiento de “*Método analítico en CLAR: Velocidad de disolución intrínseca*” descrito en la sección anterior.

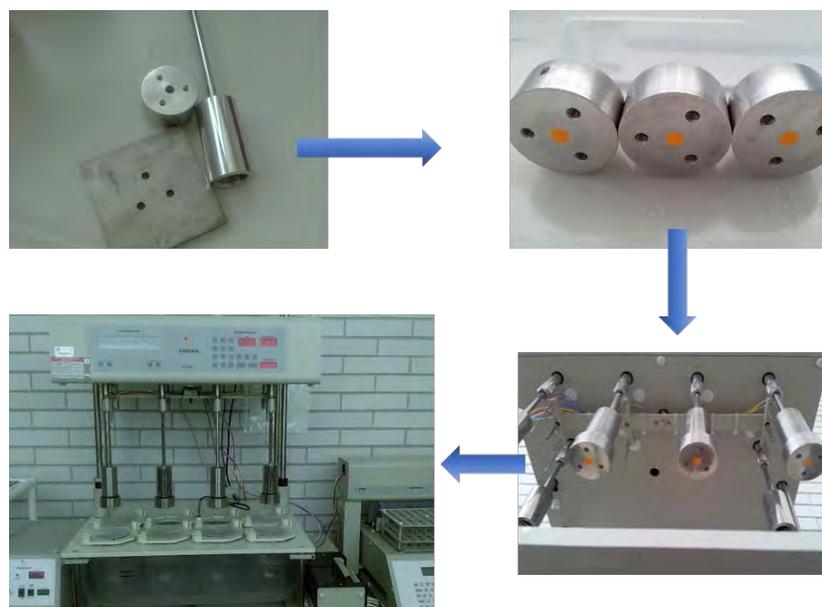


Figura 33 Formación del compacto de curcumina y montaje del aparato de Wood para VDI

6. RESULTADOS Y ANALISIS

6.1. Separación de la curcumina

A partir de curcumina Sigma Aldrich la cual esta mezclada con sus otros dos curcuminoides (demetoxicurcumina y bis-demetoxicurcumina) se hizo la cromatografía preparativa, para aislar curcumina.

Con la fase móvil cloroformo: metanol=19:1 (v/v), el tamaño de partícula de 200-500 μm , en una columna de 4.5 x 46 cm, no logra la separación de los curcuminoides. Las cromatoplasmas muestran desde la segunda fracción recolectada mezcla de curcumina y demetoxicurcumina (Fig. 34), indicando mala separación.

Se cambió el tamaño de la columna de 4.5 x 46cm a 12 x 46 cm sin buenos resultados.

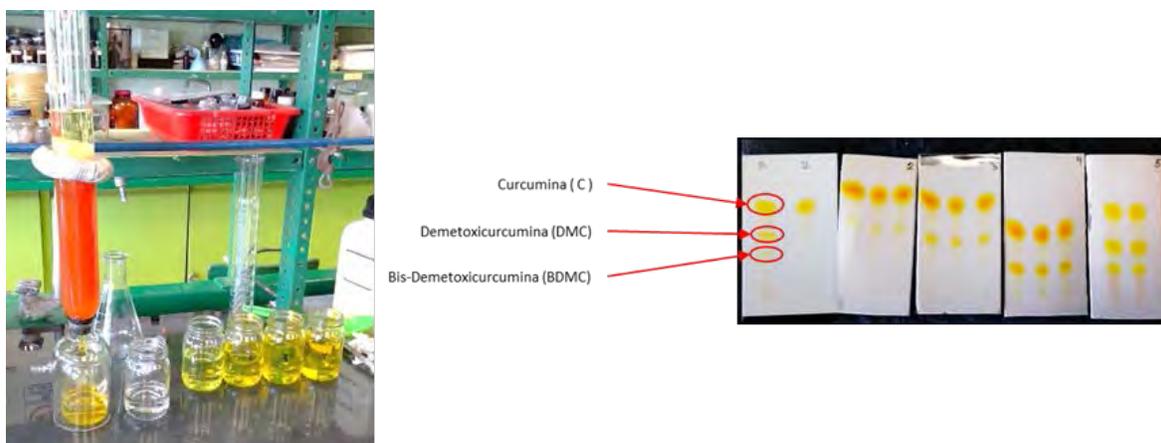


Figura 34 Cromatografía preparativa de curcuminoides y las fracciones recolectadas (izq.) y cromatoplasmas de cada fracción para evaluar la separación (der.)

La sílica con tamaño de partícula 9.5-11.5 μm y la columna de 4.5 x 46cm separa la curcumina eficientemente, como se muestra en las Fig. 35 y 36. El sistema cromatográfico se conectó a un sistema de vacío, así el proceso de separación dura alrededor de 8 horas.



Figura 35 Cromatografía preparativa de curcuminoides eficiente (izq.) y seguimiento de la elución mediante cromatoplacas con detección UV a 365nm (centro) y a simple vista (der.)

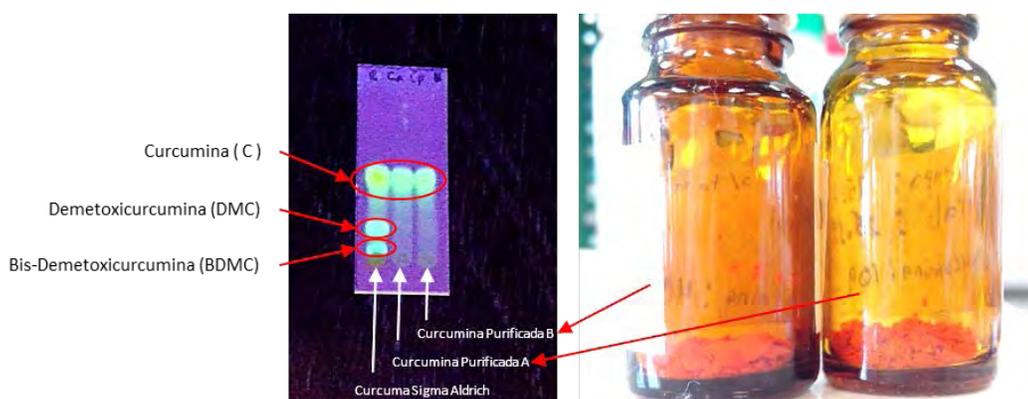


Figura 36 Curcumina pura, obtenida en la cromatografía preparativa

La figura 37 a continuación muestra gráficos de 2D y 3D de curcumina, que caracterizan a la curcumina en una corrida de HPLC, y en la Tabla 7 los parámetros correspondientes.

6.1.1. Caracterización fisicoquímica

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Tabla 7 Parámetros cromatográficos obtenidos en CLAR-DAD, de curcumina pura a 0.768 µg/mL

Tiempo de retención (min)	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Área	Altura	k'	Factor de coleo	N
9.4	0.65	1.061	223758.2	16423	1.7504	1.2072	11155.99

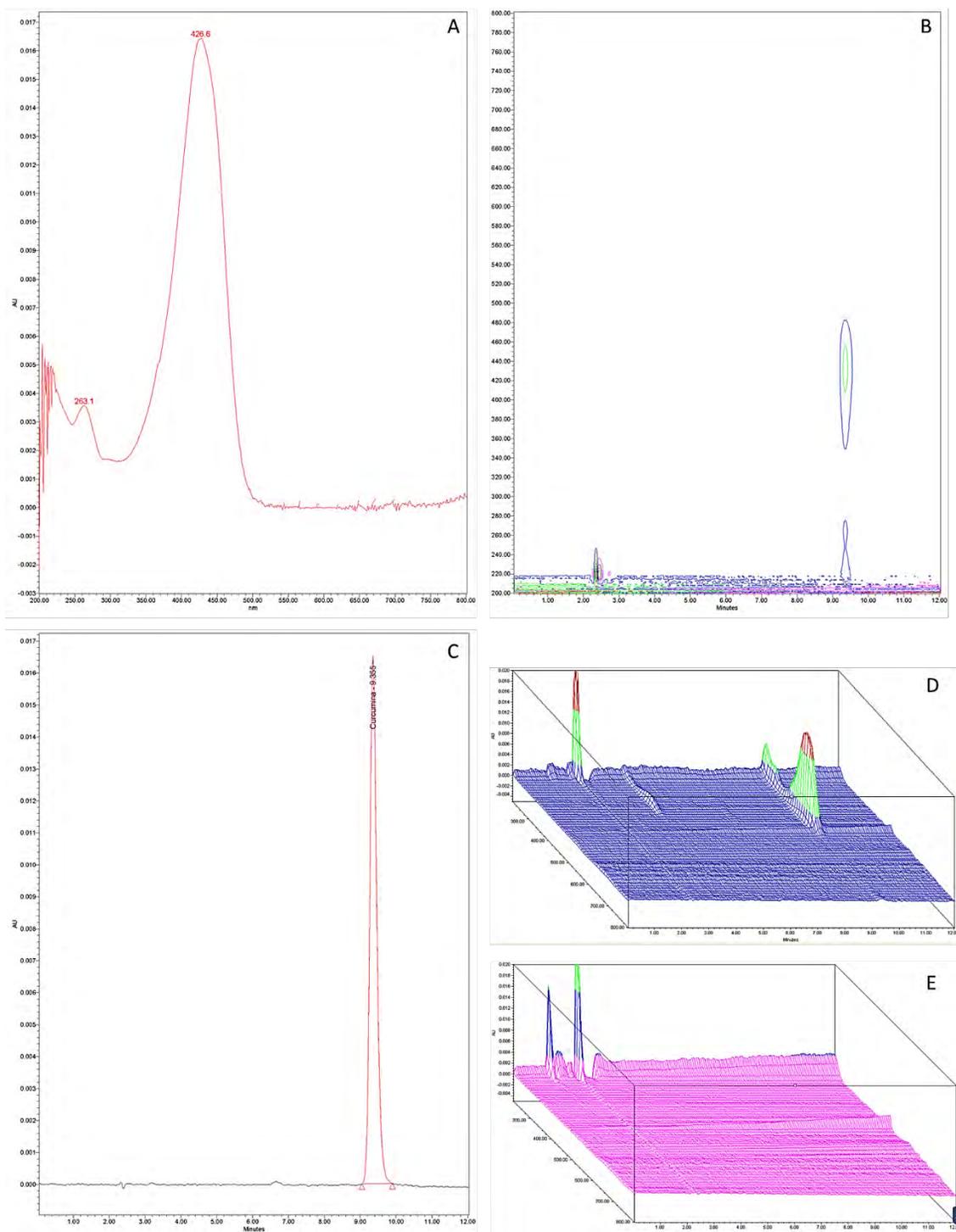


Figura 37 Curcumina pura a 0.768 $\mu\text{g/mL}$: A) Espectro de curcumina Abs vs Long. de onda (nm), B) Long. de onda vs. tiempo (min), C) Cromatograma Abs vs. Tiempo (min), D) Salida 3D del detector DAD Abs vs. Long. de onda (nm) vs. Tiempo (min) y E) Salida 3D del detector DAD para el blanco Abs vs. Long. de onda (nm) vs. Tiempo (min)

Espectrofotometría UV-Vis

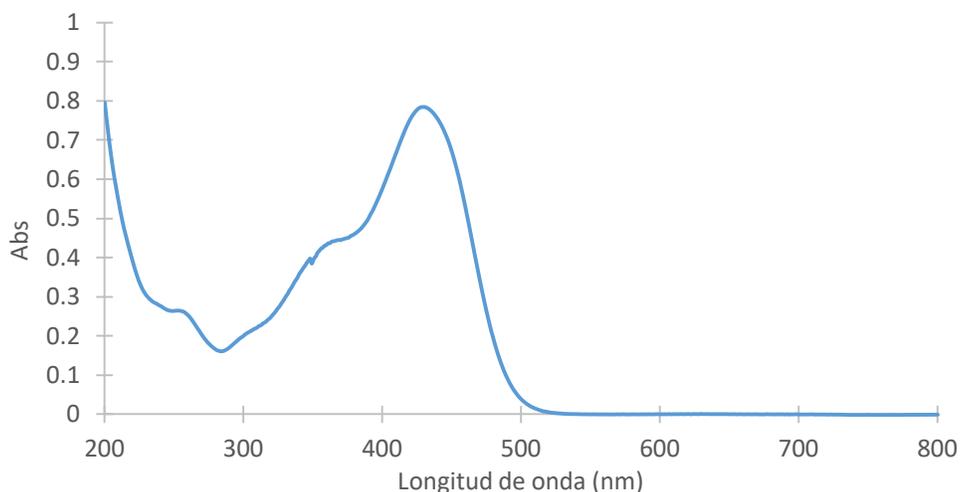


Figura 38 Espectros de curcumina concentración de 8.32 µg/mL en agua

Su λ_{\max} (longitud máxima de absorción) es 428 nm, donde tiene una absorbancia de 0.784 para 8.32 µg/mL. (Tomado de un stock en Acetonitrilo de 104 µg/mL)

Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIR)

Espectro infrarrojo cercano picos de absorción en 440,462, 503, 597, 658 y 682 cm^{-1} curcumina en estado solido

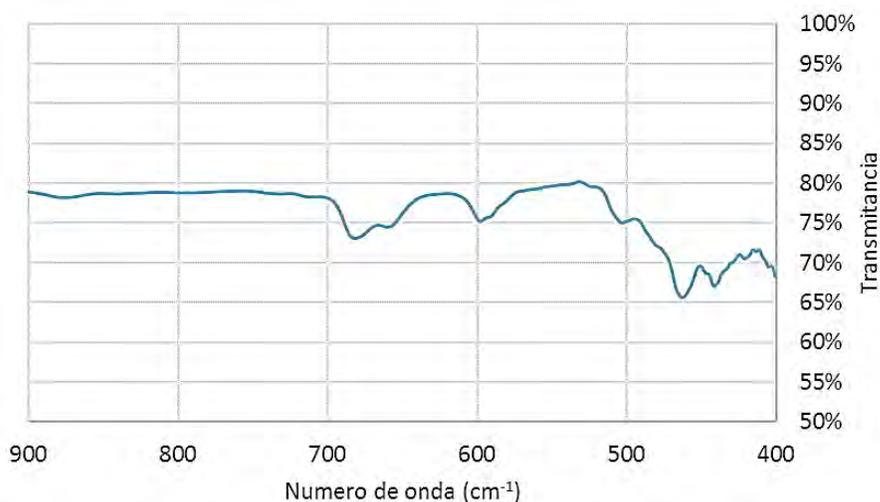


Figura 39 Espectro de infrarrojo cercano de curcumina pura

Debido a las limitaciones del equipo no se lograron obtener los picos característicos que se encuentran a un numero de onda mayor

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C (RMN)

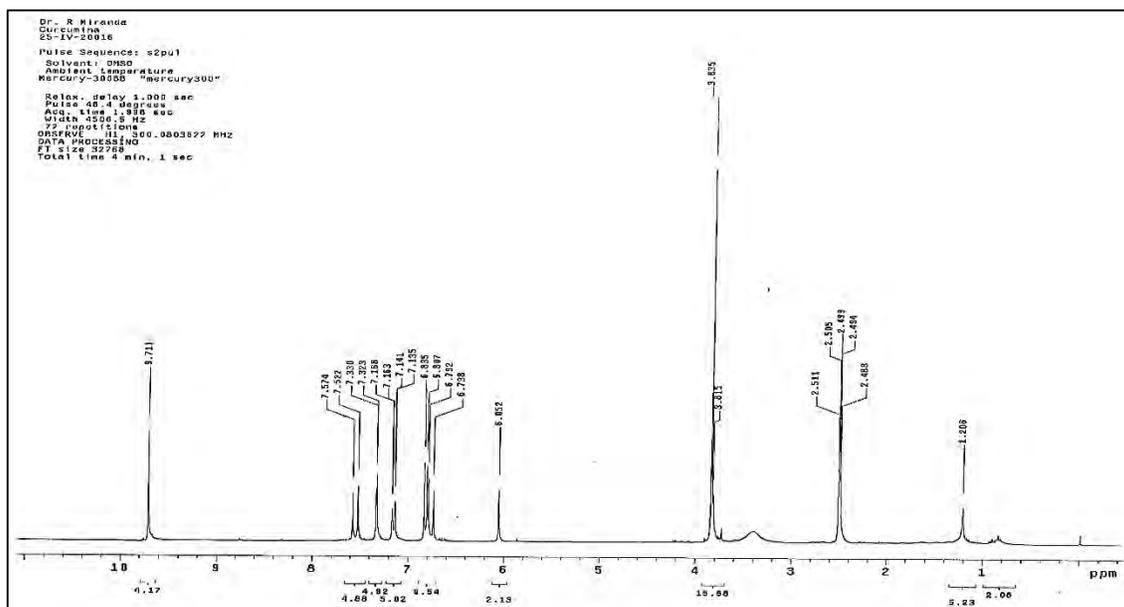


Figura 40 Espectro ^1H -RMN en DMSO de curcumina purificada

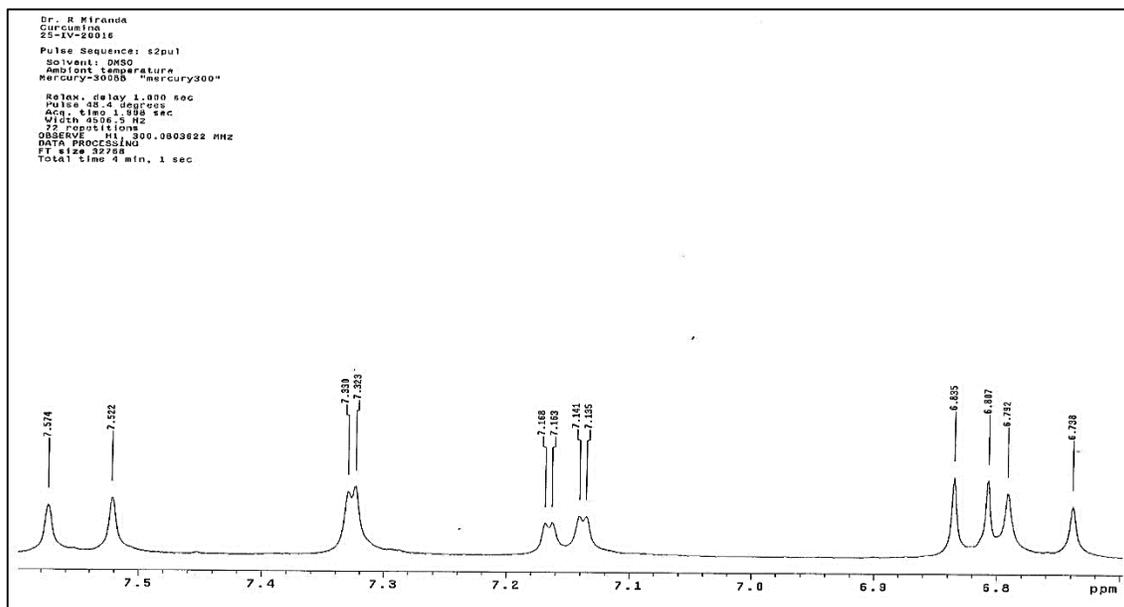


Figura 41 Espectro ^1H -RMN en DMSO de curcumina purificada (acercamiento)

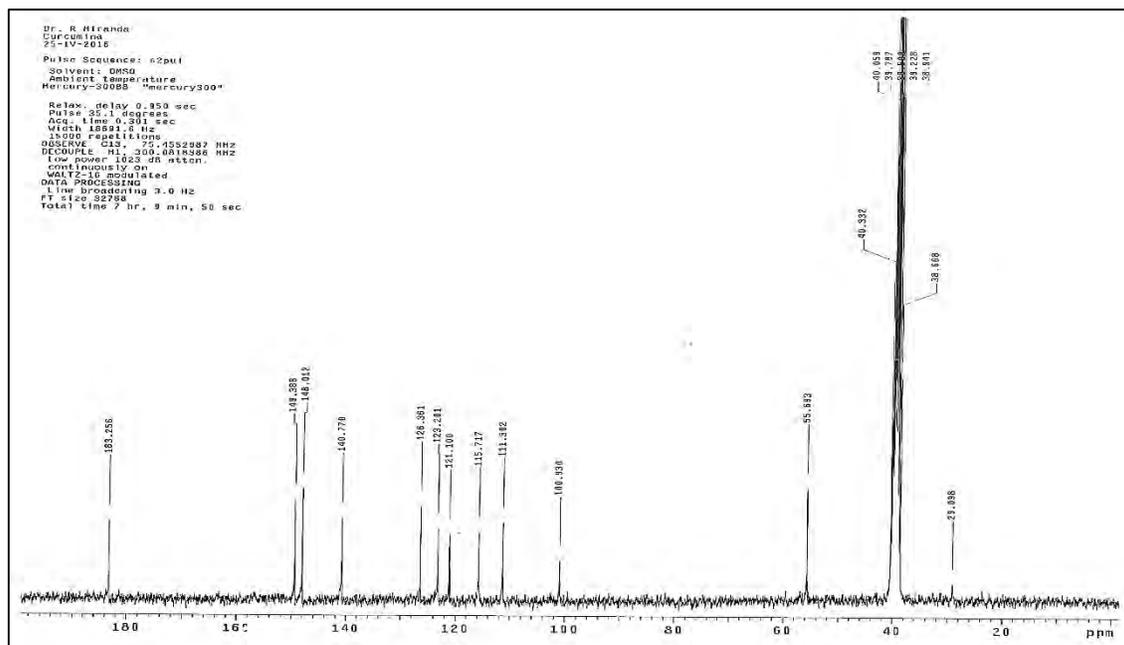
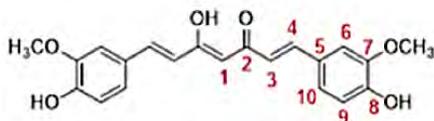


Figura 42 Espectro ^{13}C -RMN en DMSO de curcumina purificada

Tabla 8 Desplazamientos químicos de Hidrogeno (H) y Carbono (C) en los espectros RMN ^{13}C y ^1H de curcumina

H	δ (ppm)*	δ (ppm)	C	δ (ppm)*	δ (ppm)
1	6.08	6.05	1	101.37	100.93
3	6.78	6.79	2	183.71	183.26
4	7.57	7.57	3	123.64	123.2
6	7.35	7.33	4	141.22	140.77
9	6.85	6.84	5	126.82	126.36
10	7.18	7.14	6	111.79	111.3
Ar-OH	9.7	9.71	7	148.48	148.01
Ar-OCH ₃	3.86	3.82	8	149.48	149.38
			9	116.19	115.71
			10	121.57	121.1
			Ar-OCH ₃	56.16	55.7



*(Sueth-Santiago, Peron Mendes-Silva, Decoté-Ricardo, & Edilson Freire De Lima, 2015)

Los espectros de las figuras de 40-42 muestra los desplazamientos de la muestra de curcumina y en la tabla 8 se hace una comparación de los desplazamientos encontrados en la muestra purificada comparada con los reportados en un artículo publicado.

Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Condiciones de adquisición:

Instrumento: 6010LA
 Voltaje: 10.00 Kv
 Tiempo real: 40.04 s
 Tiempo muerto: 0.00%
 Velocidad de conteo: 81.00 CPS

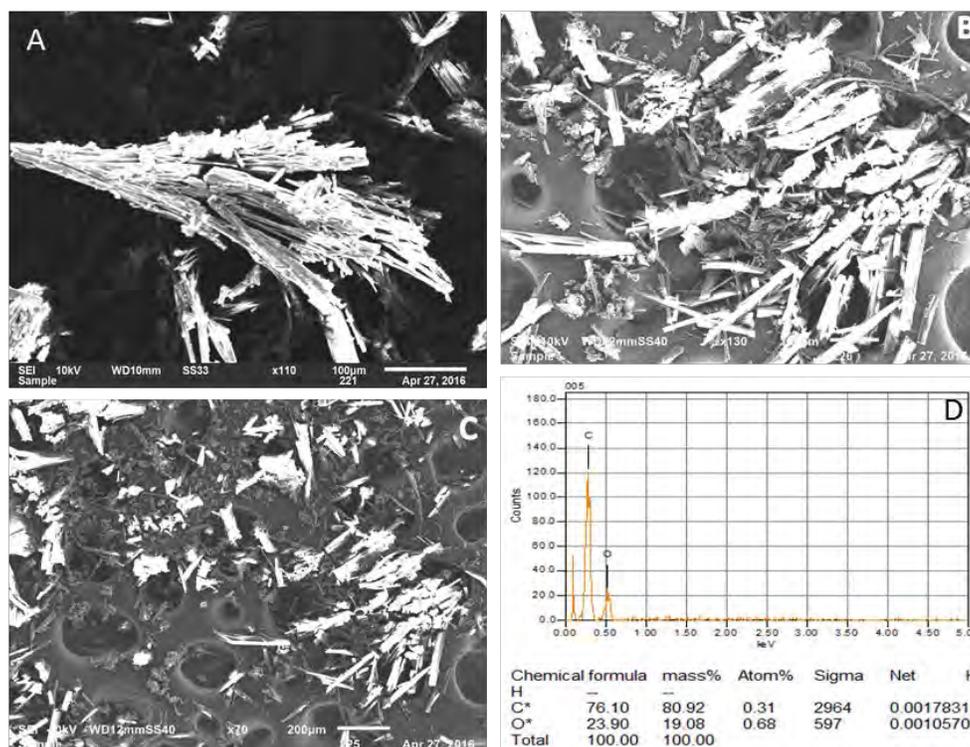


Figura 43 Microscopias de curcumina purificada: A) aumento x110, B) aumento x130, C) aumento x70 y D) conteo atómico de la muestra

Con la caracterización fisicoquímica se evidencia que la fracción obtenida de los curcuminoides, se trata de curcumina con alta pureza química, esto mediante la comparación de resultados obtenidos, con resultados reportados en la bibliografía (RMN, UV-Vis, CLAR y NIR). En el cromatograma de la Figura 37 está la presencia de un solo pico (curcumina), seguidos de los espectros UV-Vis, NIR y RMN con sus puntos característicos de la curcumina en cada espectro, los cuales concuerdan con los datos reportados para la curcumina.

Por ultimo las imágenes son de cristales de curcumina recristalizados de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 19:1 (v:v) a temperatura ambiente.

6.2. Definición del sistema para cuantificar curcumina por CLAR

6.2.1. Desarrollo del método analítico por CLAR

Para encontrar las condiciones de trabajo se evaluaron varios factores controlados (Composición de la fase móvil, velocidad de flujo, columna, concentración de curcumina y volumen de inyección) se muestran los resultados cromatográficos de curcuminoides en diferentes columnas.

Tabla 9 Resultados de parámetros cromatográficos con diferentes columnas cromatográficas

Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil ATC:ACN		Columna	Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Área	N
1	50	50	Vydac C18,10 μ -4.6x250mm	0	0	0	0	0
1	50	50	Simmetry C18, 5 μ m,4.6x250mm	10.95	2.29	1.09	3637737	10701.80
1	50	50	XBridge C18, 5 μ m,4.6x250mm	10.27	2.36	1.19	3797992	13280.37

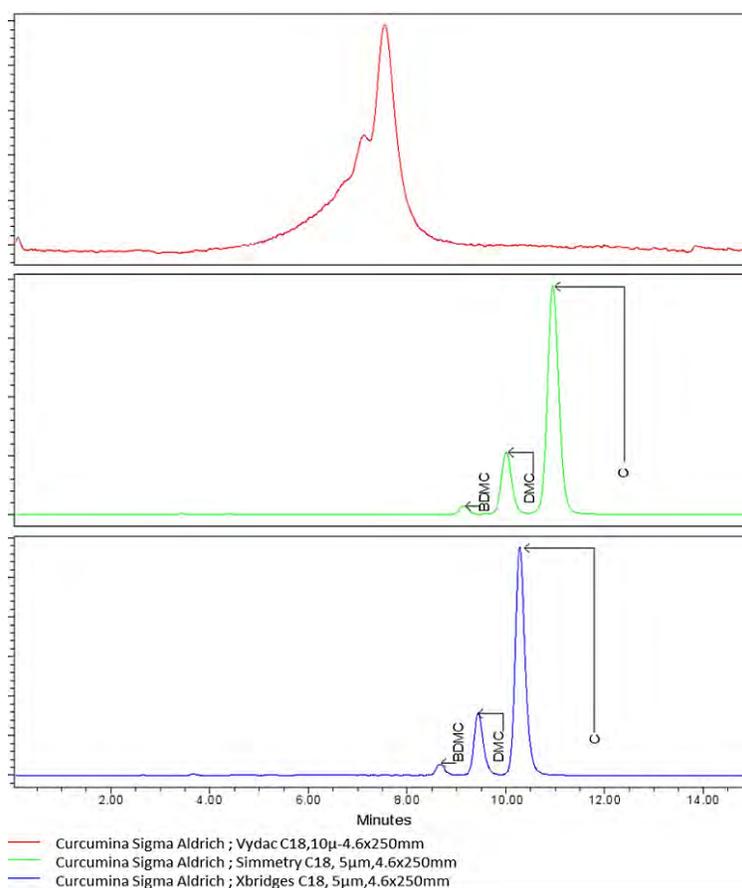


Figura 44 Cromatogramas de diferentes columnas, curcumina sigma Aldrich 3.072 μ g/mL

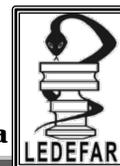


Tabla 10 Resultados de parámetros cromatográficos con diferentes proporciones de fase móvil

Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil ATC:ACN		Columna	Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Área	N
1	50	50	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	10.95	2.29	1.09	6377378	10701.80
1	52	48	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	13.35	2.43	1.09	6311807	11366.64
1	54	46	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	16.29	1.09	6183101	11966.47	
1	50	50	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	8.66	1.84	1.14	166399	8558.54
1	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	9.9	2	1.16	160413	9197.69
1	54	46	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	11.5	2.18	1.19	120069	10312.30

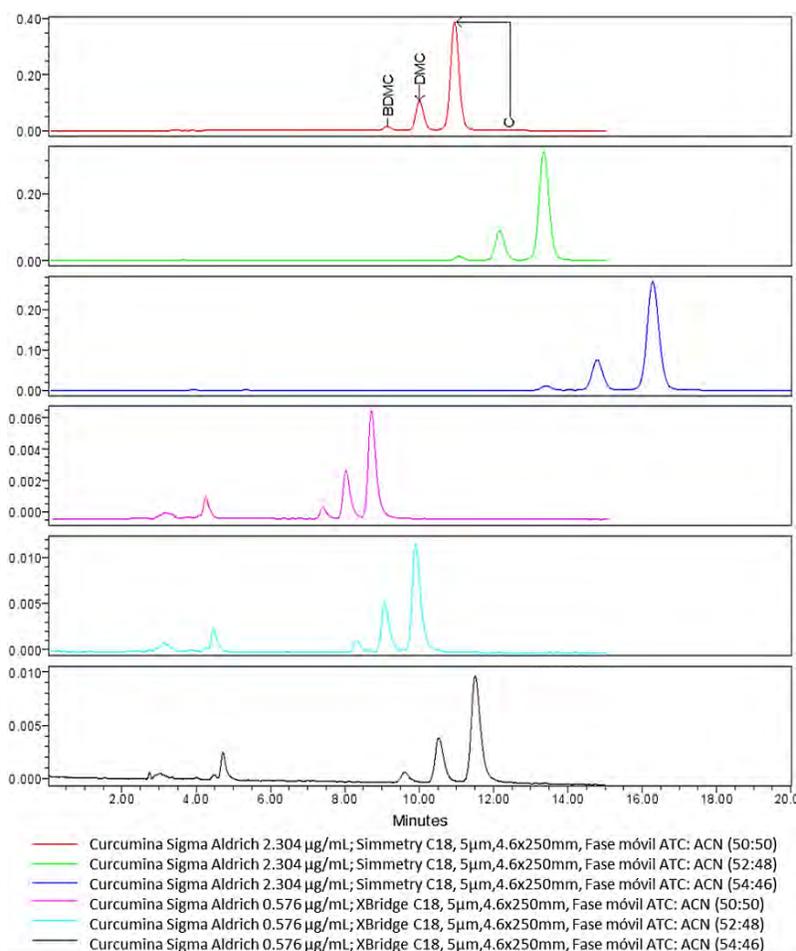


Figura 45 Cromatogramas de diferentes proporciones de fase móvil

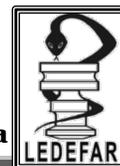


Tabla 11 Resultados de parámetros cromatográficos con diferentes velocidades de flujo

Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil ATC:ACN		Columna	Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Área	N
1	52	48	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	13.35	2.43	1.09	6311807	11366.64
1.3	52	48	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	10.31	2.35	1.07	4910893	10282.17
1.5	52	48	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	9.00	2.27	1.05	4302328	9413.96
1.2	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	8.2	1.97	1.14	137070	8877.5
1.1	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	8.99	2	1.14	147530	9139.94
1	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	9.9	2	1.15	160413	9197.69

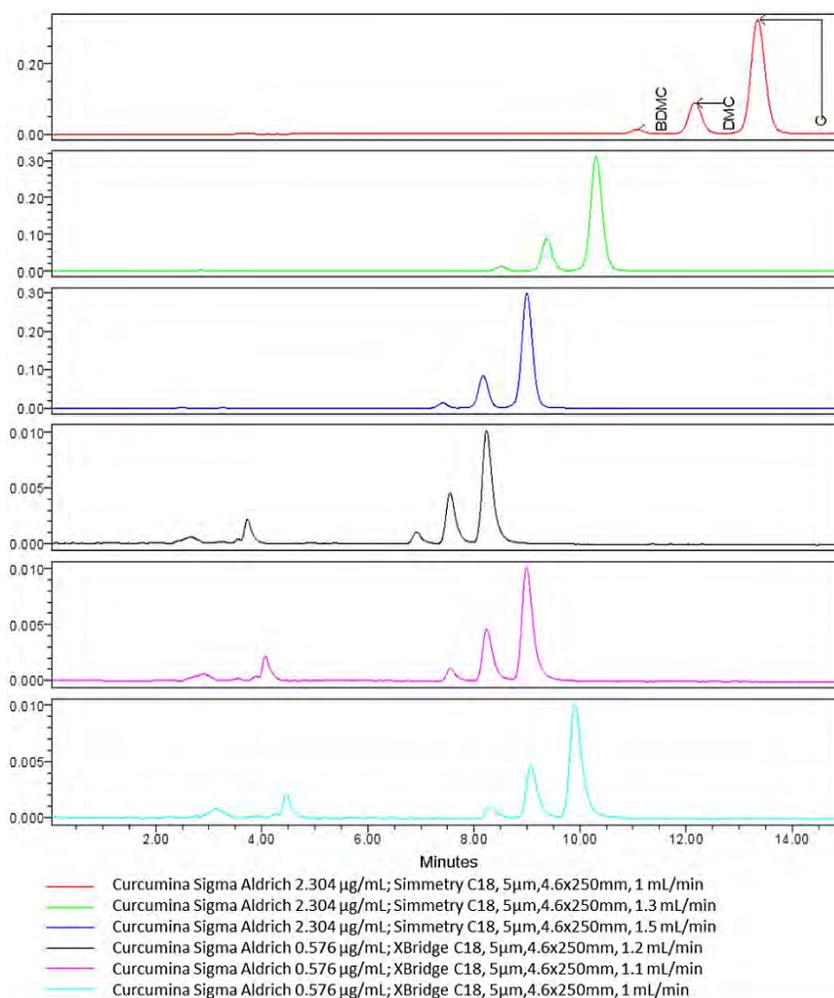
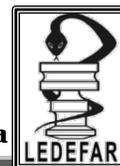


Figura 46 Cromatogramas de diferentes velocidades de flujo



Análisis mediante modelo lineal generalizado por Área

Tabla 12 Análisis de varianza para área

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.04867E14	5	2.09733E13	345.29	0.0000
Residuo	5.46673E11	9	6.07415E10		
Total (Corr.)	1.05413E14	14			

Tabla 13 Suma de cuadrados para área

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Curcumina	1.54838E13	1	1.54838E13	254.91	0.0000
Vol_ Inyeccion	9.98023E12	1	9.98023E12	164.31	0.0000
VelFM	3.4654E12	1	3.4654E12	57.05	0.0000
Columna	7.56488E12	2	3.78244E12	62.27	0.0000
Residuo	5.46673E11	9	6.07415E10		
Total (corregido)	1.05413E14	14			

El modelo determinado para el área del pico mostro que el factor fase móvil (FM) tiene un efecto nulo, o estadísticamente no significativo ($p > 0.05$). Por otro lado, hay una relación estadísticamente significativa entre Área y las variables restantes con un nivel de confianza del 95.0%.

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Área} = -37291.3 + 4.36509E6 * \text{Curcumina} + 2.63026E6 * \text{Vol_ Inyeccion} - 898420 * \text{VelFM} + 1.04178E6 * Y - 2.24381E6 * Z$$

en donde:

Y = 1 si Columna=Simmetry, -1 si Columna=Xbridge, 0 de lo contrario

Z = 1 si Columna=Vydac, -1 si Columna=Xbridge, 0 de lo contrario

$R^2 = 99.4814$ porciento

Error estándar del est. = 246458.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 99.4814% de la variabilidad en Área. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 246458. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

Tabla 14 Coeficientes del modelo su valor absoluto y el error estándar determinado para el área del pico

Parámetro	Coeficiente Estimado del modelo	Coeficiente estimado del modelo	Error Estándar
CONSTANTE	-37291.3		170810
Curcumina	4.37E+06	4365090	273399
Vol_ Inyección	2.63E+06	2630260	205197
VelFM	-898420	898420	118945
Columna Y	1.04E+06	1041780	201232
Columna Z	-2.24E+06	2243810	201232

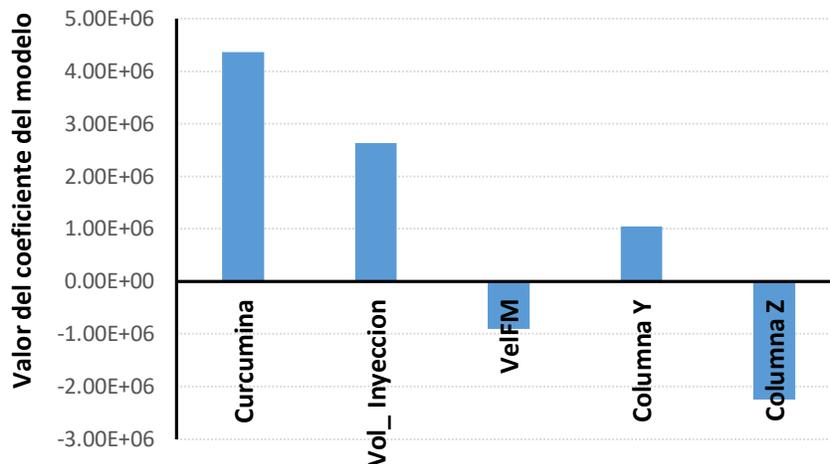


Figura 47 Coeficientes del modelo determinado para el área del pico

Los coeficientes del modelo indican como y cuanto afectan las variables en la respuesta, en este caso el área, mostrando así que esta respuesta depende en mayor medida de la concentración y volumen de inyección de curcumina y que el área es proporcional a estas variables

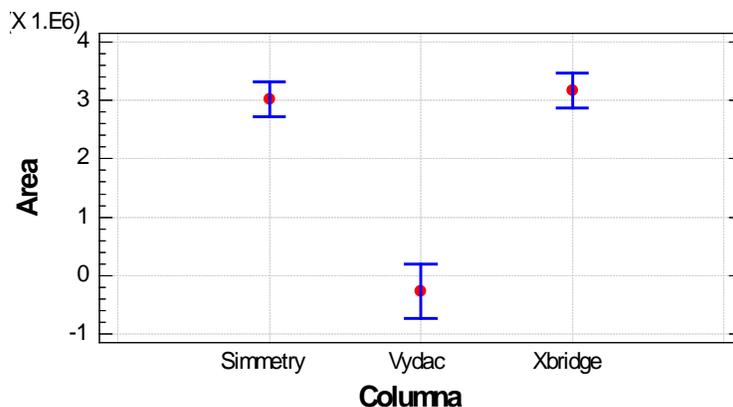


Figura 48 Comportamiento del área del pico en función de la columna: Medias y 95.0% intervalos LSD

La figura 48 muestra el área promedio obtenida por columna y su comparación, gráficamente Simmetry y Xbridge no tienen diferencia significativa ya que se traslapan los intervalos, Vydac en cambio da respuestas bajas, así que no es conveniente usarla.

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

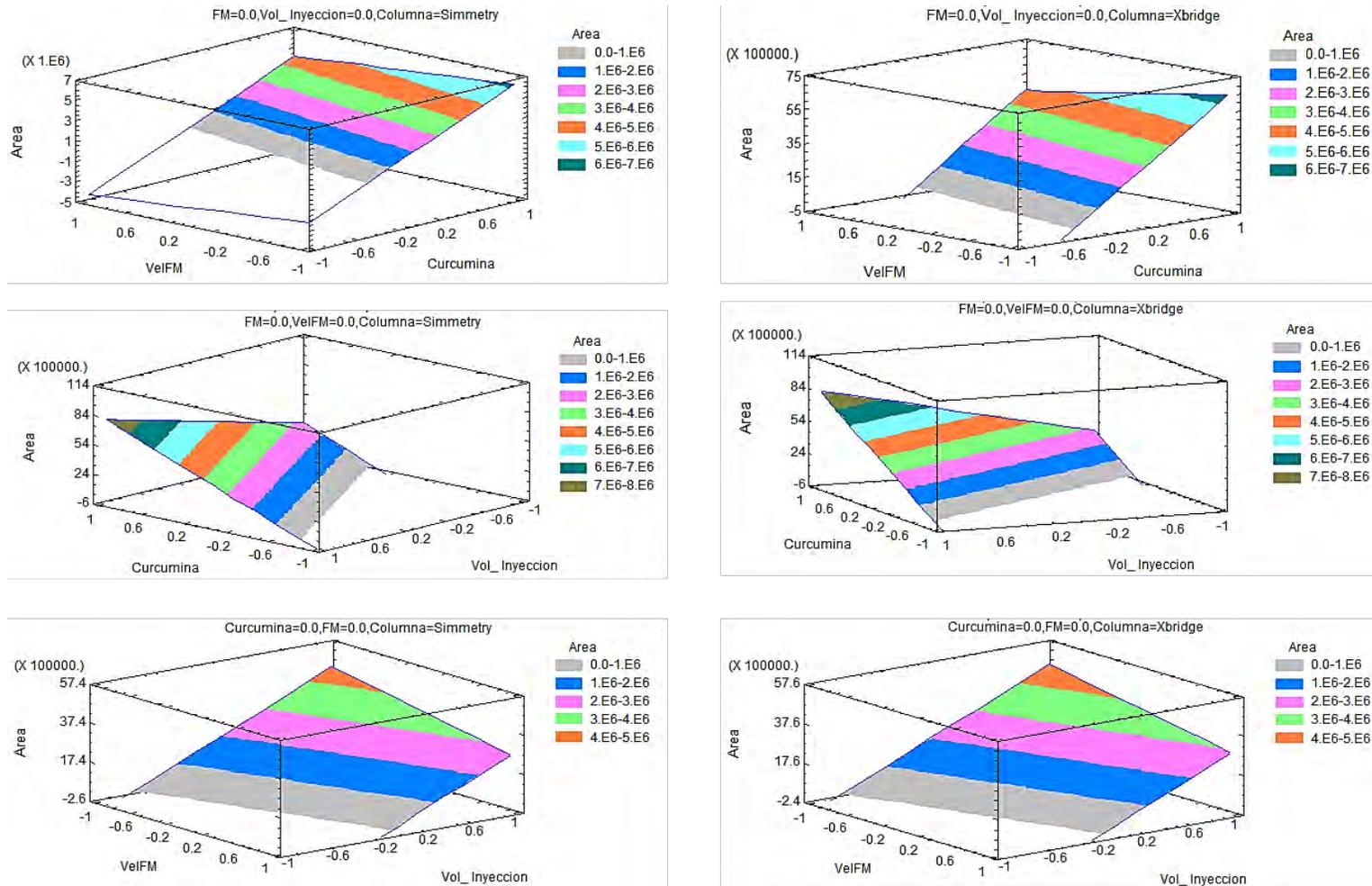
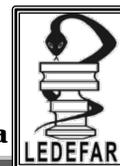


Figura 49 Superficie de respuesta estimada para Área

Debido a la poca utilidad de Vydac en el análisis de curcumina se omitió su gráfico de respuesta, en la figura 49 se muestra los gráficos que explican la manera que es afectada el área por los factores evaluados, los valores de los factores se muestran codificados, para conocer su valor real se puede recurrir a la Tabla 51 en Anexos



Análisis mediante modelo lineal generalizado para Tiempo de retención

Tabla 15 Análisis de varianza para tiempo de retención

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	67.7972	4	16.9493	27.27	0.0000
Residuo	6.21464	10	0.621464		
Total (Corr.)	74.0118	14			

Tabla 16 Suma de cuadrados para tiempo de retención

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Columna	35.6332	2	17.8166	28.67	0.0001
VelFM	24.3459	1	24.3459	39.17	0.0001
FM	17.5091	1	17.5091	28.17	0.0003
Residuo	6.21464	10	0.621464		
Total (corregido)	74.0118	14			

El modelo determinado para el Tiempo de retención (Tr) mostro que los factores volumen de inyección (Vol_inyeccion) y concentración de curcumina (curcumina) tiene un efecto nulo, o estadísticamente no significativo ($p > 0.05$). Por otro lado, hay una relación estadísticamente significativa entre Tiempo de retención (Tr) y las variables restantes con un nivel de confianza del 95.0%.

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es

$$Tr = 8.63791 + 2.38028*Y - 1.69946*Z - 2.32539*VelFM + 1.76384*FM$$

en donde:

Y = 1 si Columna=Simmetry, -1 si Columna=Xbridge, 0 de lo contrario

Z = 1 si Columna=Vydac, -1 si Columna=Xbridge, 0 de lo contrario

$R^2 = 91.6032$ por ciento

Error estándar del est. = 0.78833

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 91.6032 % de la variabilidad en el Tiempo de retención (Tr). El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.78833. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

Tabla 17 Coeficientes del modelo, su valor absoluto y el error estándar determinado para el tiempo de retención de curcumina

Parámetro	Coeficiente Estimado del modelo	Coeficiente estimado del modelo	Error Estándar
CONSTANTE	8.63791		0.430146
Columna Y	2.38028	2.38028	0.365655
Columna Z	-1.69946	1.69946	0.578288
VelFM	-2.32539	2.32539	0.371528
FM	1.76384	1.76384	0.332305

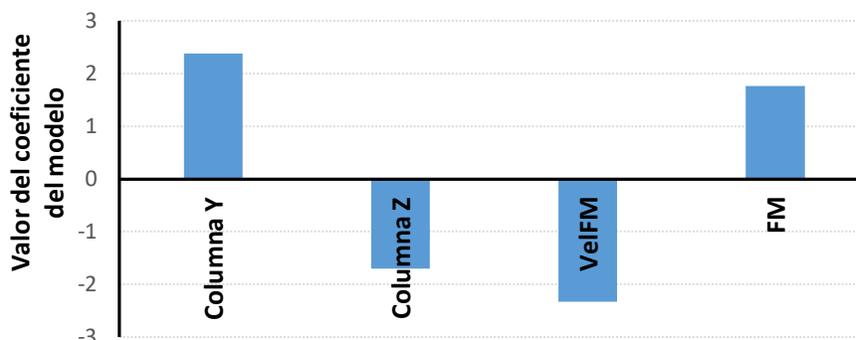


Figura 50 Coeficientes del modelo determinado para el tiempo de retención de curcumina

Los coeficientes del modelo indican como y cuanto afectan las variables en la respuesta, en este caso el tiempo de retención es proporcional a la composición de la fase móvil y se ve afectado de forma positiva por las columnas Simmetry y XBridge, así también se muestra que el tiempo de retención es inversamente proporcional a la velocidad de flujo

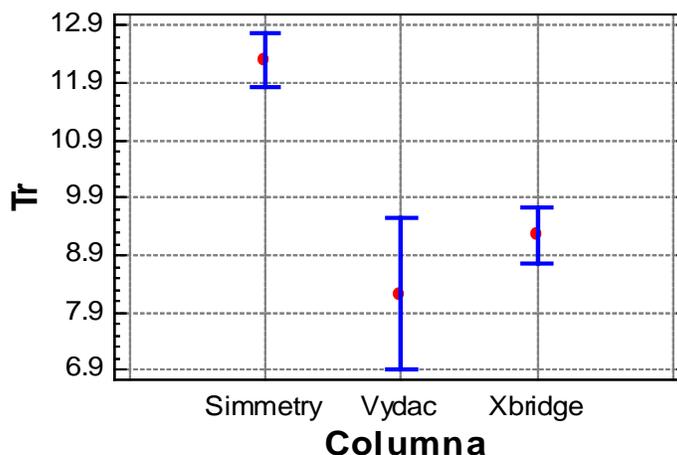


Figura 51 Comportamiento del tiempo de retención en función de la columna: Medias y 95.0% intervalos LSD

La columna Vydac muestra alta variabilidad en el tiempo de retención y Simmetry tiempos de retención altos, estas características se buscan evitar, para seleccionar el método se busca que haya baja variabilidad en las respuestas y el tiempo de retención más bajo es ideal

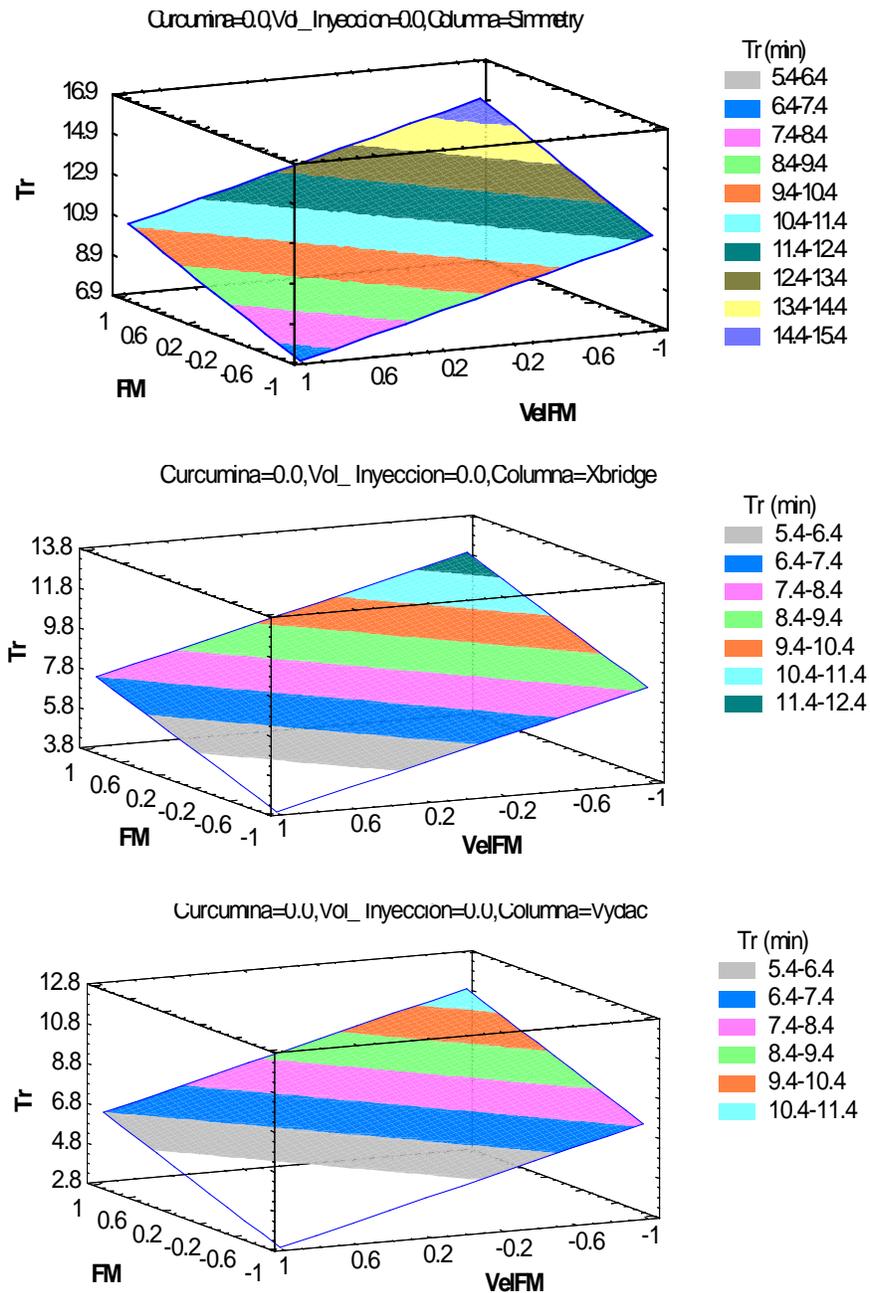


Figura 52 Superficie de respuesta estimada para Tiempo de retención

En la figura 52 se muestra los gráficos de superficie para las tres columnas ensayadas, donde el tiempo de retención (Tr) está en función de dos factores: proporción de la fase móvil (FM) y velocidad de flujo (VelFM) los cuales modifican la respuesta significativamente. Como muestran los gráficos, el Tr aumenta proporcionalmente a la fase móvil más polar [54:46 ~ ATC (0.1%) : ACN] e inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil. Los valores de los factores se muestran codificados, para conocer su valor real se puede ver la Tabla 51 en la sección *Anexos*.

Análisis mediante modelo lineal generalizado para Resolución

Tabla 18 Análisis de varianza para resolución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5.1499	4	1.28747	391.66	0.0000
Residuo	0.0328723	10	0.00328723		
Total (Corr.)	5.18277	14			

Tabla 19 Suma de cuadrados para resolución

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Columna	4.36285	2	2.18142	663.60	0.0000
Curcumina	0.183344	1	0.183344	55.77	0.0000
FM	0.124213	1	0.124213	37.79	0.0001
Residuo	0.0328723	10	0.00328723		
Total (corregido)	5.18277	14			

El modelo determinado para la Resolución (Rs) mostro que los factores volumen de inyección (Vol_inyeccion) y Velocidad de fase móvil (VelFM) tiene un efecto nulo, o estadísticamente no significativo ($p > 0.05$). Por otro lado, hay una relación estadísticamente significativa entre Resolución (Rs) y las variables restantes con un nivel de confianza del 95.0%.

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es

$$Rs = 1.48356 + 0.796298*Y - 1.56766*Z + 0.252588*Curcumina + 0.168492*FM$$

en donde:

Y = 1 si Columna=Simmetry, -1 si Columna=Xbridge, 0 de lo contrario

Z = 1 si Columna=Vydac, -1 si Columna=Xbridge, 0 de lo contrario

R-Cuadrada = 99.3657 por ciento

Error estándar del est. = 0.0573344

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 99.3657% de la variabilidad en la Resolución (Rs). El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.0573344. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

Tabla 20 Coeficientes del modelo, su valor absoluto y el error estándar determinado para la resolución de curcumina-demetoxicurcumina (C-DMC)

Parámetro	Coeficiente Estimado del modelo	Coeficiente estimado del modelo	Error Estándar
CONSTANTE	1.48356		0.0241548
Columna	0.796298	0.796298	0.0282681
Columna	-1.56766	1.56766	0.0454552
Curcumina	0.252588	0.252588	0.0338216
FM	0.168492	0.168492	0.0274102

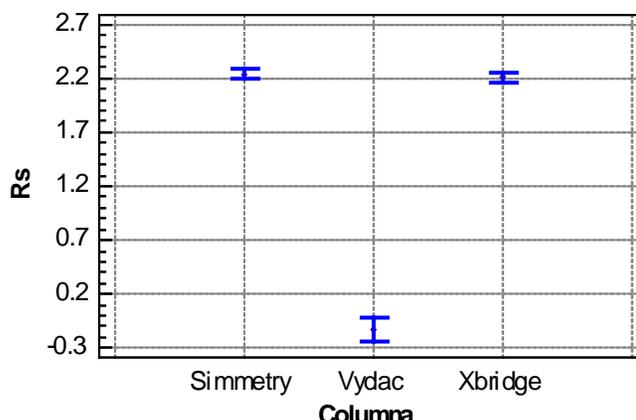


Figura 53 Comportamiento de la Resolución en función de la columna: Medias y 95.0% intervalos LSD

No existe Resolución en la columna Vydac y no hay diferencia significativa entre usar la columna Simmetry o Xbridge como se muestra en la figura 53 ya que los intervalos de ambas columnas se traslapan.

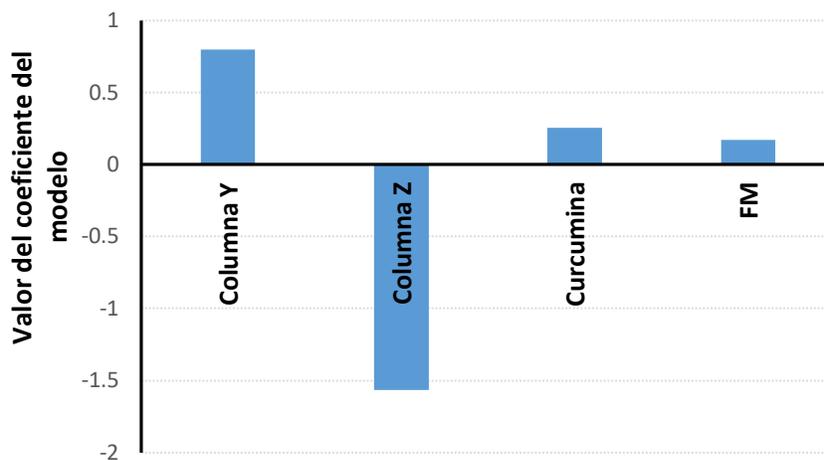


Figura 54 Coeficientes del modelo determinado para la resolución Curcumina-Demetoxicurcumina (C-DMC)

Los coeficientes del modelo indican como y cuanto afectan las variables en la respuesta, en este caso la resolución es proporcional a la concentración de curcumina y a la composición de la fase móvil (entre más polar, mayor resolución) y se ve afectado de forma positiva por las columnas Simmetry y XBridge.

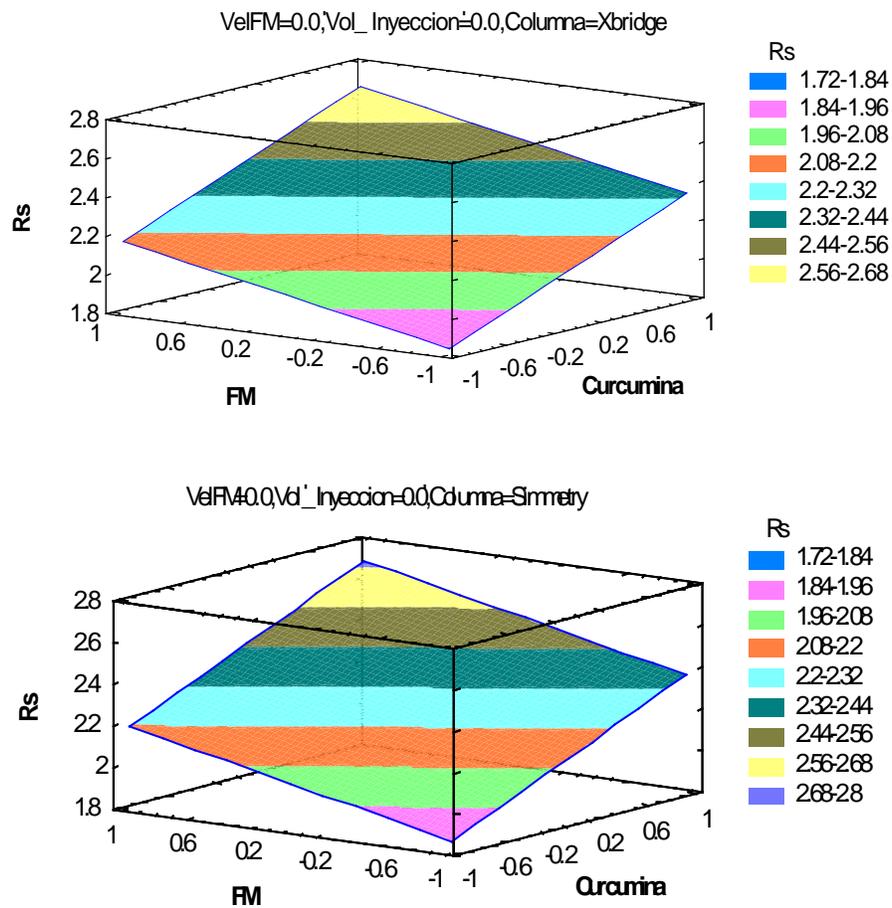


Figura 55 Superficie de respuesta estimada para resolución

En la figura 55 se muestra los gráficos que explican la manera que los factores evaluados modifican la respuesta Resolución (Rs), la columna Vydac no aparece debido a que no existe una resolución de picos

La respuesta Resolución es modificada significativamente por los factores: curcumina y composición de la fase móvil.

Como muestran los gráficos la Resolución aumenta proporcionalmente a la concentración de curcumina y a la Fase móvil más polar [54:46 ~ ATC (0.1%) : ACN].

Los valores de los factores se muestran codificados, para conocer su valor real se puede recurrir a la Tabla 51 en Anexos

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 21 Resultados de parámetros cromatográficos con diferente volumen de inyección a 1 mL/min

Concentración de curcumina (µg/mL)	Volumen de inyección (µL)	Fase móvil ATC:ACN		Columna	Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Área	N
0.832	10	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.372	-	1.04	46866	12755.03
0.832	20	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.399	-	1.05	95531	12419.05
0.832	30	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.4	-	1.07	143774	12306.96
0.832	50	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.439	-	1.08	241512	11463.9
0.832	100	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.481	-	1.11	482517	10485.81
0.104	10	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.444	-	1.00	8736	7440.9
0.104	20	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.462	-	1.01	13072	6470.93
0.104	30	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.487	-	0.88	17540	8166.38
0.104	50	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.478	-	0.91	28009	10291.97
0.104	100	52	48	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	12.513	-	0.97	52976	9945.06

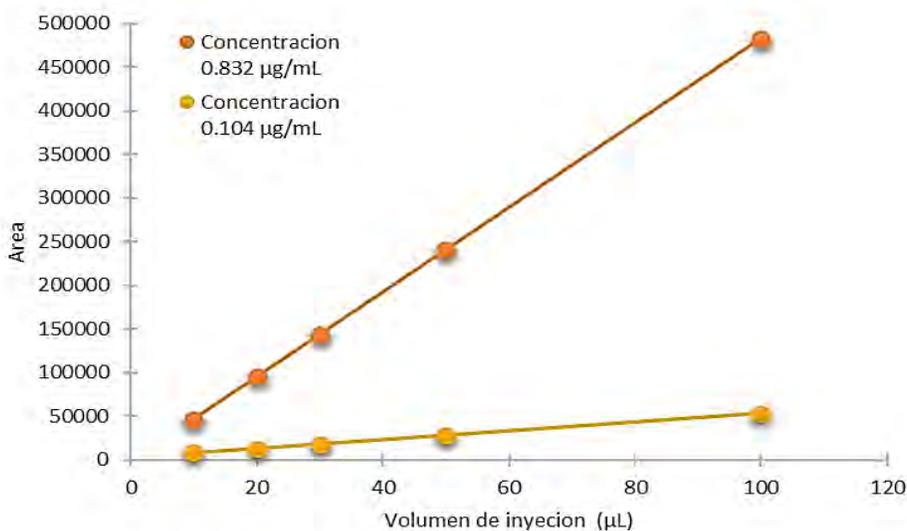


Figura 56 Gráfica de ajuste de regresión del volumen de inyección de curcumina 0.832 µg/mL y 0.104 µg/mL

Resumen estadístico

Tabla 22 Estadísticas de la regresión de la linealidad del volumen de inyección

Modelo lineal ajustado	0.832 µg/mL	Modelo lineal ajustado	0.104 µg/mL
Área=4840.8(Concentración) - 1274.7		Área=495.87 (Concentración) + 3239.69	
Coefficiente de correlación	0.9999	Coefficiente de correlación	0.9997
Coefficiente de determinación R ²	0.9999	Coefficiente de determinación R ²	0.9994
	Coefficientes		Coefficientes
Intercepción (b)	-1274.7244	Intercepción (b)	3239.6929
Pendiente (m)	4840.8267	Pendiente (m)	495.8787

El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica 99.99% de la variabilidad en Área. El coeficiente de correlación es igual a 0.9999, es decir que la mayoría de los puntos experimentales se encuentran sobre una línea recta para una concentración de 0.832 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina y que por lo tanto hay una relación lineal entre el volumen de inyección y el área del pico.

El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica 99.97% de la variabilidad en Área. El coeficiente de correlación es igual a 0.9994, es decir que la mayoría de los puntos experimentales se encuentran sobre una línea recta para una concentración de 0.104 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina y que por lo tanto hay una relación lineal entre el volumen de inyección y el área del pico.

(Miller & Miller, 2002)

Indicando así que al modificar el volumen de inyección no cambiará la respuesta (área de pico) impredeciblemente, sino que lo hará proporcionalmente según el modelo obtenido para cada concentración, dentro del rango experimentado de 10-100 μL .

Así se cambió el volumen de 20 a 50 μL , aumentando el área de pico y disminuyendo el ruido del sistema que se tenía con 20 μL también disminuyó la variabilidad de las lecturas, volviéndose más conveniente usar 50 μL .

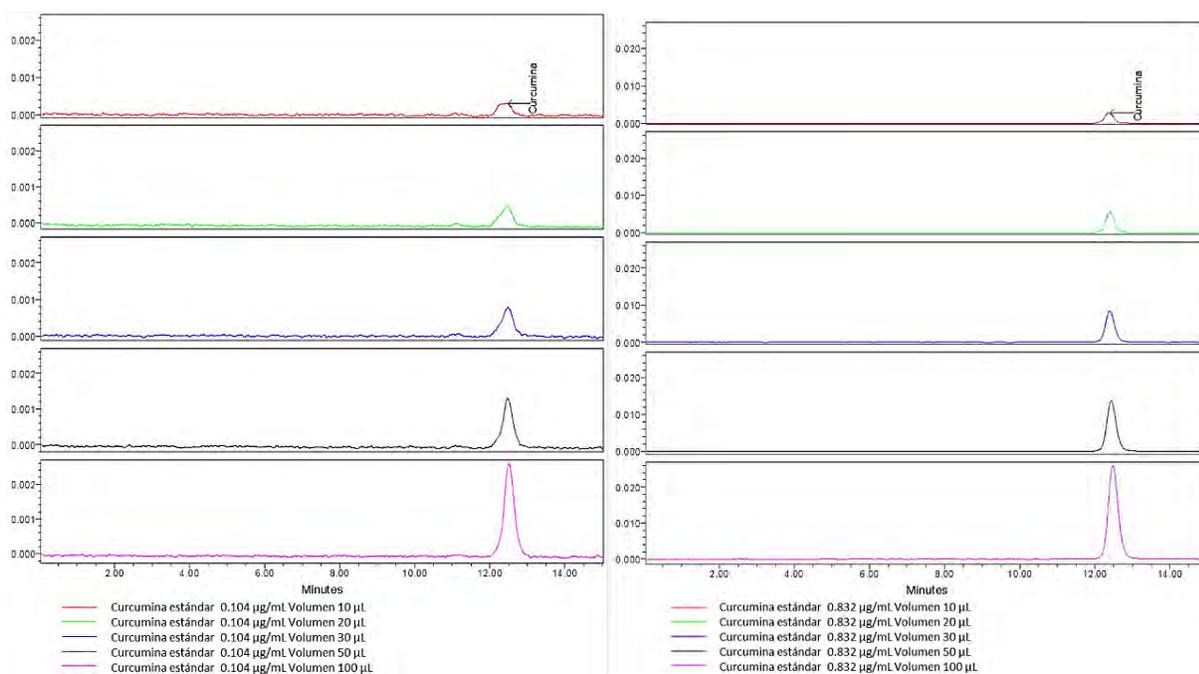


Figura 57 Cromatogramas de diferentes volúmenes de inyección a 1 mL/min

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 23 Resultados de parámetros cromatográficos de curcumina con diferentes tratamientos de filtrado a 1 mL/min

Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Fase móvil ATC:ACN		Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Área	N
Millipore Nylon 0.2 µm	0.832	52	48	12.40	-	0.94	12310	9993.23
Millipore Nylon 0.2 µm	0.832	52	48	12.38	-	0.99	13135	10174.09
Millipore Nylon 0.2 µm	0.832	52	48	12.41	-	0.97	13789	9364.45
Acrodisc Nylon 0.45 µm	0.832	52	48	12.40	-	1.08	85940	12449.54
Acrodisc Nylon 0.45 µm	0.832	52	48	12.41	-	1.14	86804	12378.4
Acrodisc Nylon 0.45 µm	0.832	52	48	12.41	-	1.12	87604	12417.96
Acrodisc GHP 0.45 µm	0.832	52	48	12.39	-	1.12	107643	12208.37
Acrodisc GHP 0.45 µm	0.832	52	48	12.41	-	1.11	109630	12195.71
Acrodisc GHP 0.45 µm	0.832	52	48	12.42	-	1.10	109998	12256.05
N.A	0.832	52	48	12.38	-	1.11	111168	12533.29
N.A	0.832	52	48	12.38	-	1.12	110441	12506.18
N.A	0.832	52	48	12.41	-	1.08	112199	12138.95
Acrodisc GHP 0.45 µm	0.104	52	48	12.45	-	1.16	10770	10372.83
Acrodisc GHP 0.45 µm	0.104	52	48	12.45	-	1.08	11310	10731.14
Acrodisc GHP 0.45 µm	0.104	52	48	12.46	-	1.28	11872	14207.08
N.A	0.104	52	48	12.43	-	1.28	10366	12362.75
N.A	0.104	52	48	12.44	-	1.13	10747	13120.03
N.A	0.104	52	48	12.44	-	1.25	12462	11361.94

N.A =No hay tratamiento de filtrado

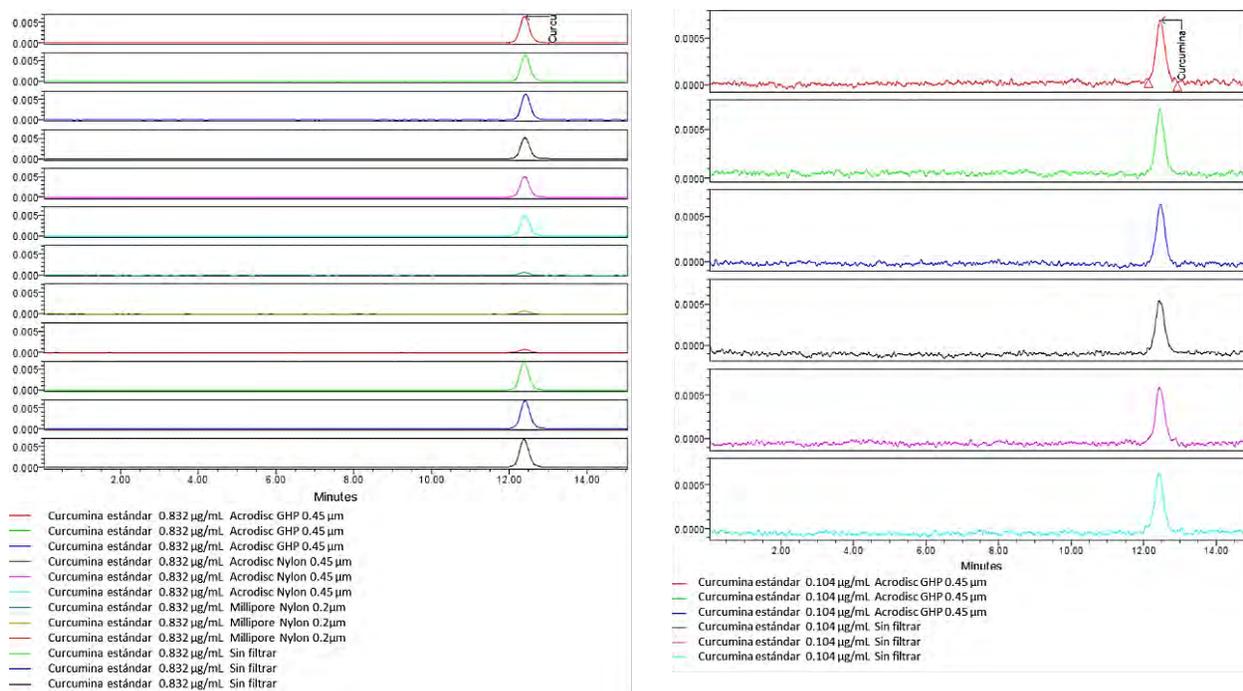
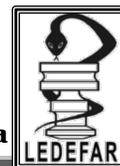


Figura 58 Cromatogramas de diferentes tratamientos de filtrado



Análisis estadístico del tratamiento de filtrado

Tabla 24 Resumen estadístico del área para curcumina 0.832 µg/mL

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Porcentaje que atraviesa el filtro %
Acrodisc GHP 0.45 µm	3	109090.	1266.86	98.04
Acrodisc Nylon 0.45 µm	3	86782.7	832.205	77.99
Millipore Nylon 0.2 µm	3	13078.0	741.146	11.75
N.A	3	111269.	883.37	100

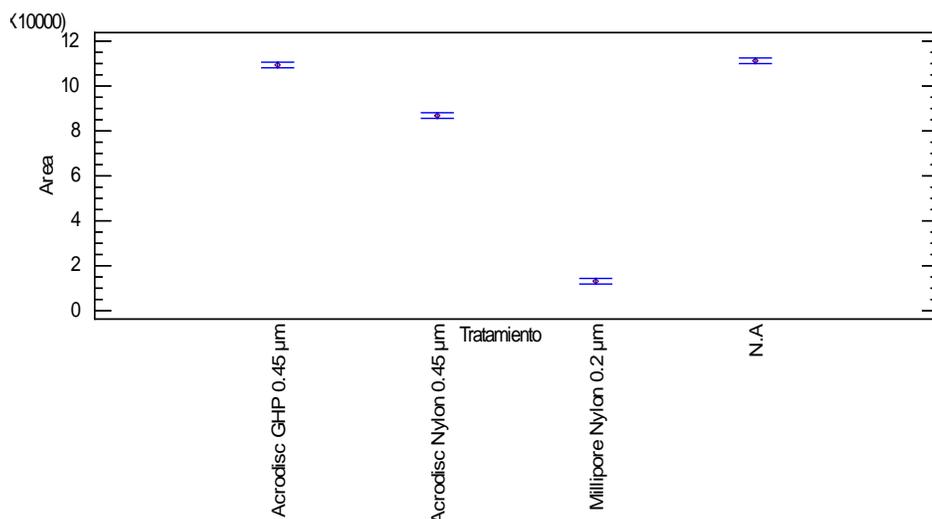


Figura 59 Comparación de medias e intervalos de confianza HSD en los tratamientos de filtración para curcumina a 0.832 µg/mL

Tabla 25 ANOVA del tratamiento de filtración de curcumina a 0.832 µg/mL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.90457E10	3	6.34857E9	7001.18	0.0000
Intra grupos	7.25428E6	8	906785.		
Total (Corr.)	1.90529E10	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras

Pruebas de Rangos Múltiples

Tabla 26 Comparación múltiple para determinar las medias significativamente diferentes de otras. Método: diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey 95 %

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Millipore Nylon 0.2 μm	3	13078.0	X
Acrodisc Nylon 0.45 μm	3	86782.7	X
Acrodisc GHP 0.45 μm	3	109090.	X
N.A	3	111269.	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Acrodisc GHP 0.45 μm - Acrodisc Nylon 0.45 μm	*	22307.7	2488.98
Acrodisc GHP 0.45 μm - Millipore Nylon 0.2 μm	*	96012.3	2488.98
Acrodisc GHP 0.45 μm - N.A		-2179.0	2488.98
Acrodisc Nylon 0.45 μm - Millipore Nylon 0.2 μm	*	73704.7	2488.98
Acrodisc Nylon 0.45 μm - N.A	*	-24486.7	2488.98
Millipore Nylon 0.2 μm - N.A	*	-98191.3	2488.98

* indica una diferencia significativa.

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Como resultado se encontró que no hay diferencia significativa entre:

- Acrodisc GHP 0.45 μm - N.A

Se comparan las medias de estas dos variables que no tienen diferencia estadísticamente significativa.

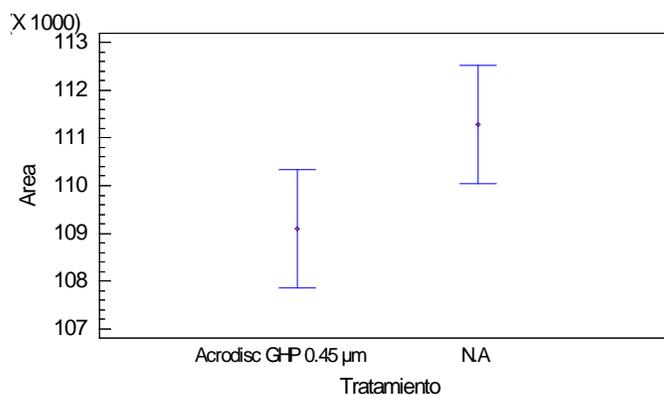


Figura 60 Comparación de medias e intervalos de confianza LSD en los tratamientos de filtración para curcumina a 0.832 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 27 ANOVA del tratamiento de filtración de curcumina a 0.832 µg/mL • Acrodisc GHP 0.45 µm - N.A

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.12206E6	1	7.12206E6	5.97	0.0709
Intra grupos	4.77056E6	4	1.19264E6		
Total (Corr.)	1.18926E7	5			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Y el porcentaje de retención del filtro a 0.832 µg/mL es de 1.96 %, menor del 2% que se indica como máximo adecuado para la retención del analito.

Tabla 28 Resumen estadístico del área para curcumina 0.104 µg/mL

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Porcentaje que atraviesa el filtro %
Acrodisc GHP 0.45 µm	3	11317.3	551.037	101.126
N.A	3	11191.7	1116.51	100

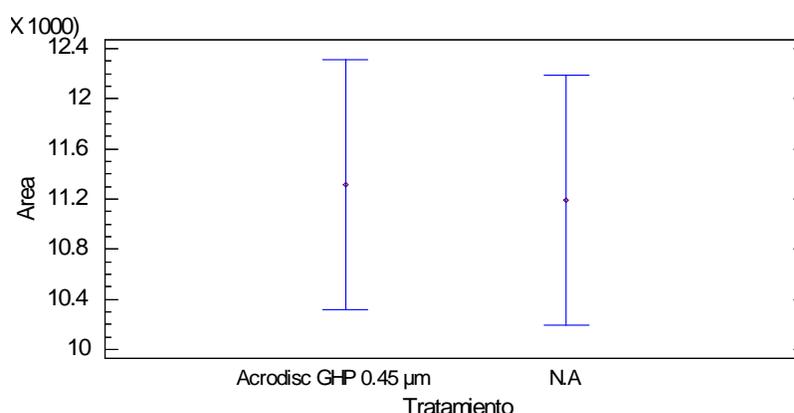


Figura 61 Comparación de medias e intervalos de confianza LSD en los tratamientos de filtración para curcumina a 0.104 µg/mL

Tabla 29 ANOVA del tratamiento de filtración de curcumina a 0.104µg/mL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	23688.2	1	23688.2	0.03	0.8697
Intra grupos	3.10048E6	4	775121.		
Total (Corr.)	3.12417E6	5			

Puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Y el porcentaje de retención del filtro a 0.104 µg/mL es de -1.126 %, menor del 2% que se indica como máximo adecuado para la retención del analito. Por los resultados analizados el filtro adecuado para utilizar en este trabajo es Acrodisc GHP 0.45 µm ya que es el filtro con menor influencia en la respuesta de área, permitiendo el filtrado de las muestras sin retención significativa del analito curcumina.

6.2.2. Validación del método analítico

Validación del sistema

Adecuabilidad

Para verificar que el sistema cromatográfico es apto para realizar análisis, se determinó la reproducibilidad del equipo, con los siguientes criterios de aceptación:

Factor de coe < 2

Coefficiente de variación % del tiempo de retención (T_r) $< 2\%$

Coefficiente de variación % del área $< 2\%$

Tabla 30 Resultados de adecuabilidad para cuantificar curcumina

Parámetro	Resultado
Factor de coe	1.2
Tiempo de retención C.V. %	0.24
Área C.V. %	0.495
Numero de platos teóricos	11133.96

Previo a la realización de cada prueba de la validación se realizó la prueba de adecuabilidad, cumpliendo los parámetros de aceptación

Linealidad

En la Tabla 22 se presentan los resultados obtenidos de la curva de calibración del estándar de curcumina, usando como medio de disolución la fase móvil en un intervalo de concentraciones de 0.096 a 0.768 $\mu\text{g/mL}$, la curva contiene 5 sistemas por triplicado cada sistema.

Tabla 31 Concentración de curcumina ($\mu\text{g/mL}$) y su respuesta analítica (área) obtenidas para evaluar la linealidad del sistema

Sistema	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área
1	0.096	27120
1	0.096	26871
1	0.096	27058
2	0.192	54285
2	0.192	55374
2	0.192	56536
3	0.384	108503
3	0.384	108801
3	0.384	108671
4	0.576	163871
4	0.576	164938
4	0.576	163404
5	0.768	220306
5	0.768	221274
5	0.768	218563

En la siguiente grafica se muestra la linealidad de la curva de calibración, mostrando el aumento proporcional de la respuesta con al aumento de la concentración de curcumina

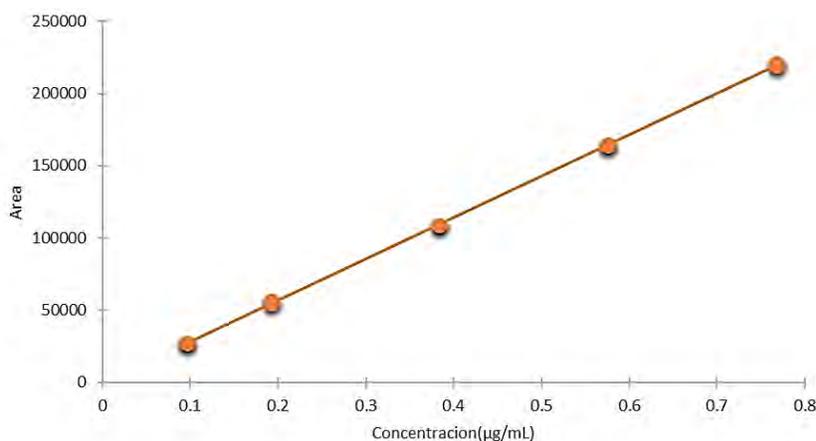


Figura 62 Área en función de la concentración de curcumina para evaluar la linealidad del sistema.
Modelo: $\text{Área} = 286283(\text{Concentración}) - 391.069$

En la siguiente tabla se presentan los parámetros estadísticos obtenidos del análisis de regresión, los cuales se encuentran dentro de los límites de aceptación establecidos.

Tabla 32 Resultados del análisis de regresión e intervalo de confianza (95%) de la ordenada al origen

Parámetros estadísticos de la regresión	Valor obtenido
R	0.9999
R ²	0.9998
Pendiente	286283.24
Intercepto	-391.07
IC (Bo)	-1485.79 a 703.66

A continuación, se muestra un análisis de varianza que evalúa la linealidad del sistema, las hipótesis son las siguientes:

Hipótesis:

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y el área.
- Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Criterios de aceptación:

- Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítica}}$ se acepta Ho
- Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítica}}$ se rechaza Ho

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 33 Análisis de varianza realizado para determinar la relación lineal entre la concentración de curcumina y la respuesta analítica (área)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F crítica
Modelo	1	74324057802	74324057802	71185.37764	1.08701E-25
Residuos	13	13573191.34	1044091.642		
Total	14	74337630993			

Estadísticamente, existe una relación lineal entre la concentración y el área de curcumina, ya que $F_{cal} > F_{crítica}$.

Precisión

Los resultados obtenidos de los tres niveles de concentración por sextuplicado para evaluar la precisión del sistema se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 34 Concentración de curcumina ($\mu\text{g/mL}$) y su respuesta analítica (área) obtenidas para evaluar la precisión del sistema

Sistema	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área/Concentración
1	0.768	204139	265805.99
1	0.768	202723	263962.24
1	0.768	200873	261553.39
1	0.768	202372	263505.21
1	0.768	201443	262295.57
1	0.768	201370	262200.52
2	0.384	102017	265669.27
2	0.384	99155	258216.15
2	0.384	100224	261000.00
2	0.384	101326	263869.79
2	0.384	101126	263348.96
2	0.384	98186	255692.71
3	0.096	26384	274833.33
3	0.096	25343	263989.58
3	0.096	24788	258208.33
3	0.096	24908	259458.33
3	0.096	24808	258416.67
3	0.096	25656	267250.00
		Promedio	262737.56
		Desv. Est.	4303.95
		C.V. %	1.64

El valor del coeficiente de variación obtenido se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido ($C. V. < 2\%$), por lo que se afirma que la dispersión de los datos es mínima y por lo tanto el sistema se considera preciso.

6.2.3. Solubilidad de productos con curcumina

La solubilidad evaluada del producto que contiene curcumina “*Curcumin from Curcuma longa (Turmeric), powder*” *Sigma Aldrich Lot#081M1611V E nsayo ~70% (HPLC)* se realizó en el medio de disolución utilizado para realizar los ensayos de Velocidad de Disolución Intrínseca; Tween 1.5 % en agua destilada mediante el método de “saturation shake-flask” y se determinó por HPLC

Tabla 35 Resultados de la solubilidad de curcumina y de la concentración en los medios de disolución

	Concentración de curcumina (µg/mL)		
	Tween 1.5 % en agua destilada	SA de Fosfatos pH 6.8 con Tween 1.5 %	Solución de Ácido Clorhídrico 0.1 N con Tween 1.5 %
Solubilidad	93.088		
Último punto de muestreo		0.45	0.37

Los medios de disolución alcanzaron en el último punto de muestreo una concentración de curcumina de 0.45 µg/mL en la Solución de Fosfatos y 0.37 µg/mL en la solución de Ácido Clorhídrico.

El 15% de la solubilidad máxima de curcumina en el medio evaluado es 13.96 µg/mL

Por tanto, la prueba de VDI para curcumina cumple con el requisito de condición sink, “*la concentración del soluto nunca llega a más del 10 al 15% de su solubilidad máxima*”

$$C_s \gg C_t$$

6.3. Velocidad de disolución intrínseca

6.3.1. Desarrollo del método para perfiles de VDI de curcumina

6.3.1.1. Desarrollo en UV-Vis

Con los siguientes medios de disolución:

Solución Tween 80 al 1% con HCl 0.1 N pH=1.35, Buffer de Acetatos pH= 4.5 y Buffer de acetatos 6.8

Solución DSS 80 al 1% con HCl 0.1 N pH=1.2, Buffer de Acetatos pH= 4.5 y Buffer de acetatos 6.8 se obtuvieron los siguientes espectros de curcumina Sigma Aldrich

Tabla 36 Absorbancias en diferentes medio de disolución y diferentes concentraciones de curcumina tomadas a 425 nm

Curcumina Sigma	Tween 80 al 1%		Dodecilsulfato de sodio al 1%	
	20 µg/mL	50 µg/mL	20 µg/mL	50 µg/mL
	Abs	Abs	Abs	Abs
HCl	2.4776	3.26918	2.5952	3.3999
Acetatos	2.1815	3.2369	2.2647	3.2788
Fosfatos	1.8393	3.2231	0	0

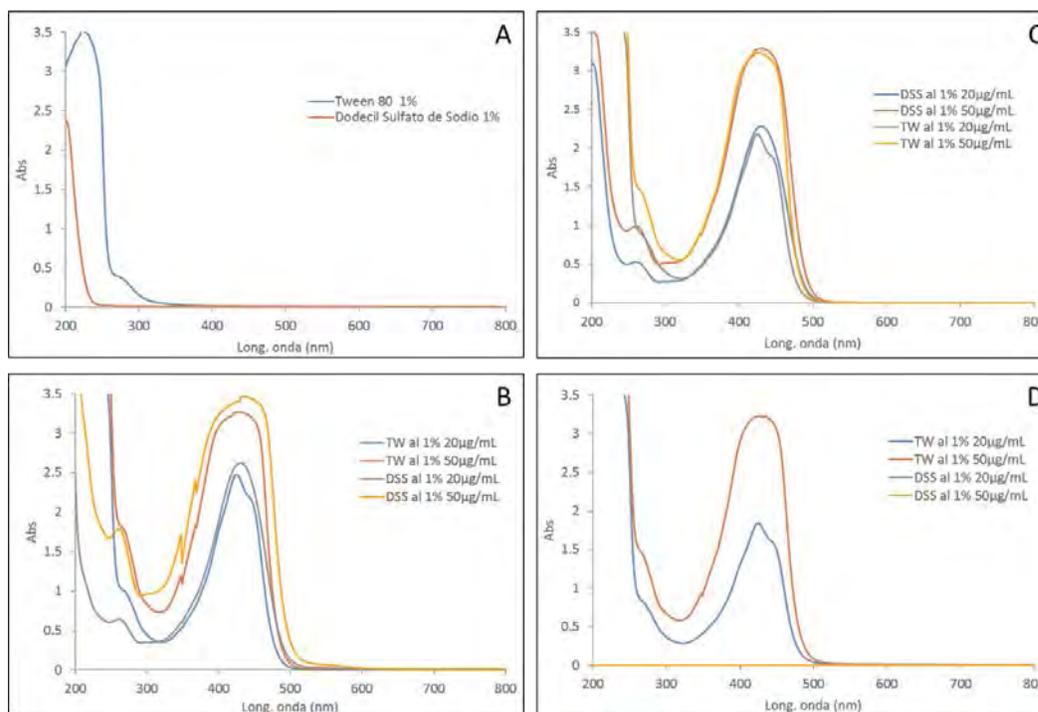


Figura 63 A) Solución Tw y DSS al 1%, B) Solución Tw y DSS al 1% en HCl 0.1 N, C) Solución Tw y DSS al 1% en Buffer de acetatos, D) Solución Tw y DSS al 1% en Buffer de fosfatos

El medio de disolución con dodecilsulfato de sodio es incompatible con el buffer de fosfatos y se precipita el medio de disolución

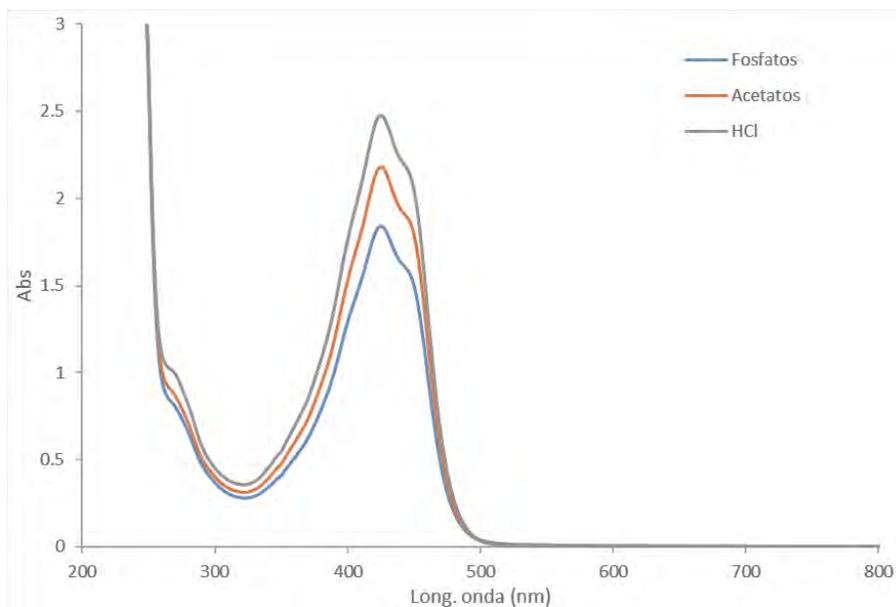
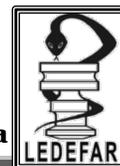


Figura 64 Espectro de curcumina sigma Aldrich 20 µg/mL en 3 medios de disolución con Tween 80 al 1%

Comparando los diferentes medios de disolución hay diferencia en sus solubilidades, mas no hay un efecto batocrómico/hipsocromico por efecto del pH y por lo tanto se tomaron lecturas a la longitud de onda 425 nm para los 3 medios

Para realizar la prueba de velocidad de disolución intrínseca, en la siguiente tabla se muestran los factores que se evaluaron en la VDI de curcumina

Tabla 37 Factores a evaluar en VDI de curcumina con cuantificación en espectrofotometría UV-Vis

Volumen del medio	Temperatura (°C)	Tween 80 (%)	Velocidad de agitación (rpm)	Fuerza de compresión (Ton.)	Medio	pH
900	37	0.5	50	1	HCl	1.38
900	37	0.5	100	0.5	HCl	1.14
900	37	0.5	50	1	Acetatos	4.49
900	37	0.5	100	0.5	Acetatos	4.5
900	37	0.5	50	1	Fosfatos	6.9
900	37	0.5	100	0.5	Fosfatos	6.9

A continuación, se muestra en la Figura 65 las gráficas de Abs vs tiempo de curcumina y en el apartado de Anexos la Tabla 52 las absorbancias de cada punto, con las siguientes condiciones:

Condición 1

- 50 rpm
- 1 t de fuerza de compresión
- Tween 80 al 0.5%
- 900 mL el volumen del medio de disolución

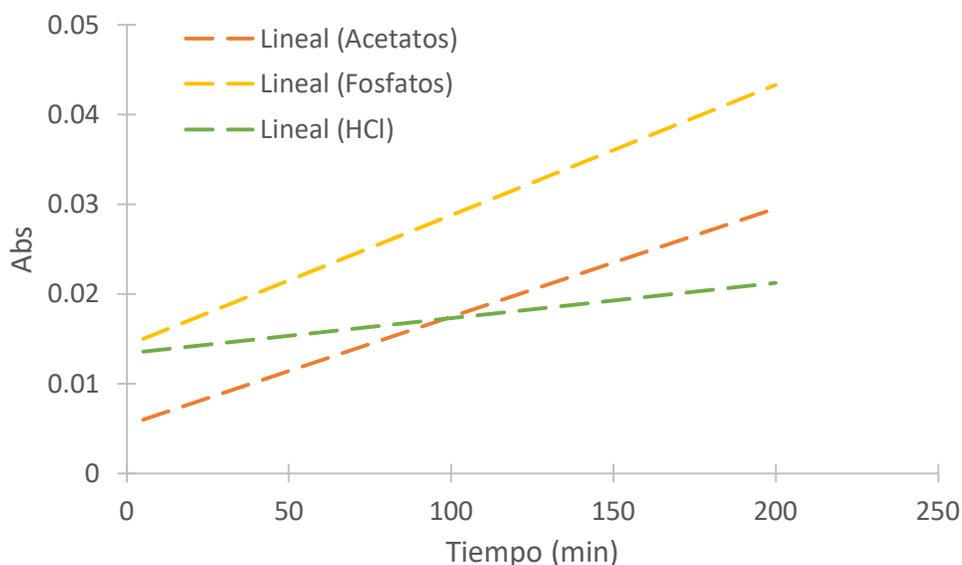


Figura 65 Regresión de las lecturas de abs vs tiempo de la curcumina sigma Aldrich en diferentes medios

Tabla 38 Resultados Abs vs tiempo de curcumina sigma Aldrich condición 1

Medio	Modelo	R ²
HCl	0.00004 x + 0.0134	0.6147
Acetatos	0.0001 x + .0054	0.9607
Fosfatos	0.0001 x + 0.0142	0.9242

A continuación, en la Figura 66 se muestran las gráficas de Abs vs tiempo de curcumina, y en el apartado de Anexos la Tabla 53 las absorbancias de cada punto, con las siguientes condiciones:

Condición 2

- 100 rpm
- 0.5 Toneladas (t) de fuerza de compresión
- Tween 80 al 0.5%
- 900 mL el volumen del medio de disolución

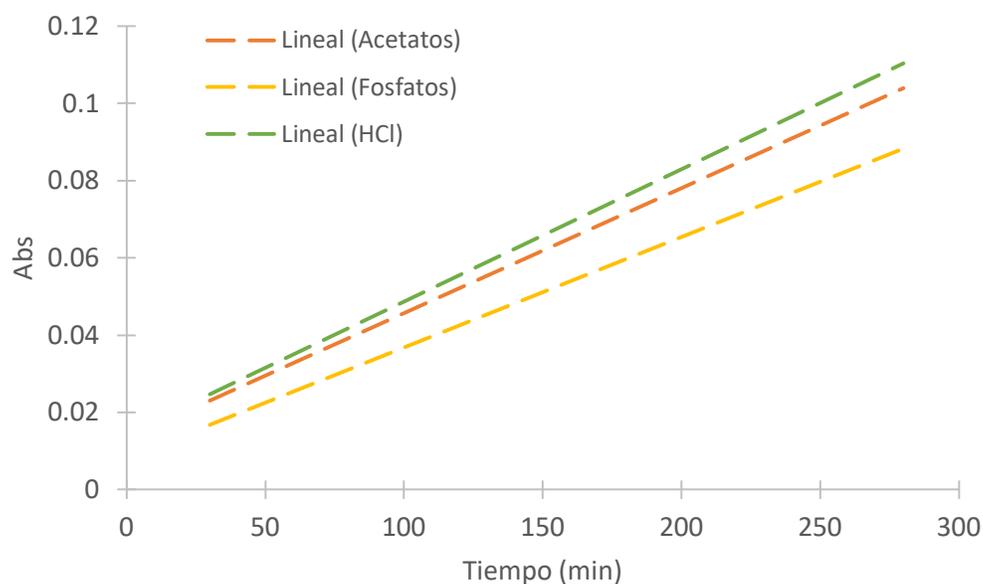


Figura 66 Regresión de las lecturas de abs vs tiempo de la curcumina sigma Aldrich en diferentes medios

Tabla 39 Resultados Abs vs Tiempo de curcumina sigma Aldrich condición 2

Medio	Modelo	R ²
HCl	0.0003 x + 0.0144	0.9783
Acetatos	0.0003 x + 0.0134	0.9914
Fosfatos	0.0003 x + 0.0081	0.9972

6.3.1.2. Desarrollo en CLAR

Por las concentraciones tan bajas se muestran como resultado y la falta de especificidad (entre curcuminoides) se continuo el desarrollo ahora con una cuantificación por CLAR con DAD

Tabla 40 Factores a evaluar en VDI de curcumina con cuantificación en CLAR con DAD

Volumen del medio	Temperatura (°C)	Tween 80 (%)	Velocidad de agitación (rpm)	Fuerza de compresión (T)	Medio	pH
900	37	1.5	75	0.7	HCl	1.3
900	37	1.5	75	0.7	Acetatos	4.45
900	37	1.5	75	0.7	Fosfatos	6.6
900	37	0.5	50	1	HCl	1.3
900	37	0.5	50	1	Acetatos	4.49
900	37	0.5	50	1	Fosfatos	6.9

A continuación, en la Figura 67 se muestran las gráficas de VDI Cantidad disuelta por área (mg/cm²) en función del tiempo (min) de curcumina. En la Tabla 55 en el apartado de Anexos se encuentran la cantidad disuelta por área (mg/cm²) de cada tiempo de los medios analizados con las siguientes condiciones:

- 50 rpm
- 1 T de fuerza de compresión
- Tween 80 al 0.5%
- 900 mL el volumen del medio de disolución

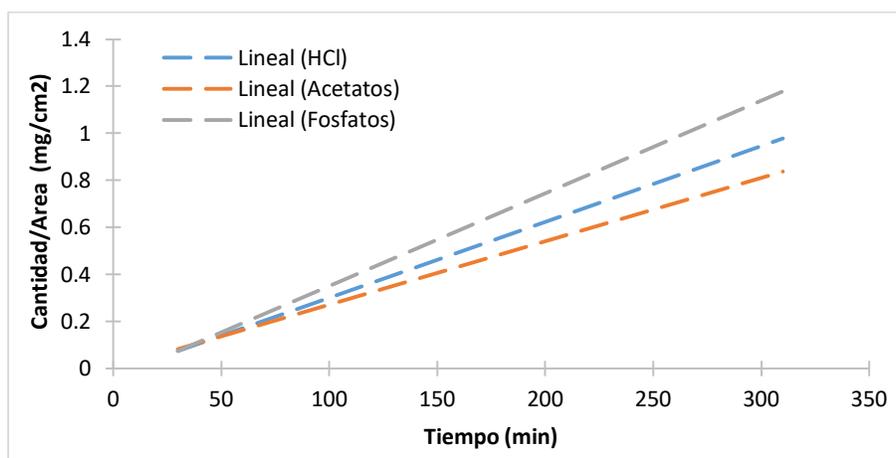


Figura 67 Regresiones lineales de curcumina en los diferentes medios para evaluar VDI $k = \text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$

Tabla 41 Velocidad de disolución intrínseca, obtenida por regresión lineal

	k (mg/cm ² /min)	R ²
HCl	0.0032	0.9667
Acetatos	0.0027	0.9406
Fosfatos	0.0039	0.9824

A continuación, en la Figura 68 se muestran las gráficas de VDI Cantidad disuelta por área (mg/cm²) en función del tiempo (min) de curcumina. En la Tabla 56 en el apartado de Anexos se encuentran la cantidad disuelta por área (mg/cm²) de cada tiempo de los medios analizados con las siguientes condiciones

- 75 rpm
- 0.7 T de fuerza de compresión
- Tween 80 al 1.5%
- 900 mL el volumen del medio de disolución

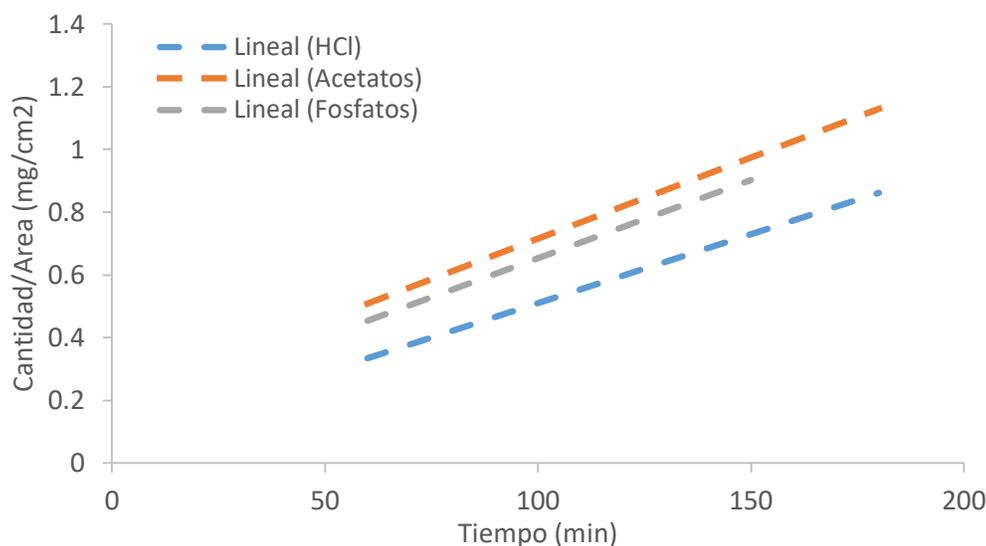
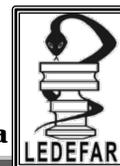


Figura 68 Regresiones lineales de curcumina en los diferentes medios para evaluar VDI $k = \text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$

Tabla 42 Velocidad de disolución intrínseca, obtenida por regresión lineal

	k (mg/cm ² /min)	R ²
HCl	0.0044	0.9791
Acetatos	0.0052	0.8716
Fosfatos	0.005	0.8982



Análisis mediante modelo lineal generalizado para constante *k* de VDI

*Tabla 43 Análisis de varianza para constante *k* de VDI*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00000384	1	0.00000384	14.31	0.0194
Residuo	0.00000107333	4	2.68333E-7		
Total (Corr.)	0.00000491333	5			

*Tabla 44 Suma de cuadrados para constante *k* de VDI*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Fuerza de compresión	0.00000384	1	0.00000384	14.31	0.0194
Residuo	0.00000107333	4	2.68333E-7		
Total (corregido)	0.00000491333	5			

El modelo determinado para la constante de disolución intrínseca (*k*) mostro que los factores velocidad de agitación (rpm), Tween (%) y pH tienen un efecto nulo, o estadísticamente no significativo ($p > 0.05$). Por otro lado, hay una relación estadísticamente significativa entre constante de disolución intrínseca (*k*) y las variables (Fuerza de compresión) restantes con un nivel de confianza del 95.0%.

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es:

$$k = 0.00406667 - 0.0008 * \text{Fuerza de compresión}$$

$$R^2 = 78.1547 \text{ por ciento}$$

$$\text{Error estándar del est.} = 0.000518009$$

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 78.1547 % de la variabilidad en la Resolución (R_s). El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.000518009. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

*Tabla 45 Coeficientes del modelo su valor absoluto y el error estándar determinado constante *k* de VDI*

Parámetro	Coeficiente Estimado del modelo	Coeficiente estimado del modelo	Error Estándar
CONSTANTE	0.00406667		0.00021148
Fuerza de compresión	-0.0008	0.0008	0.00021148

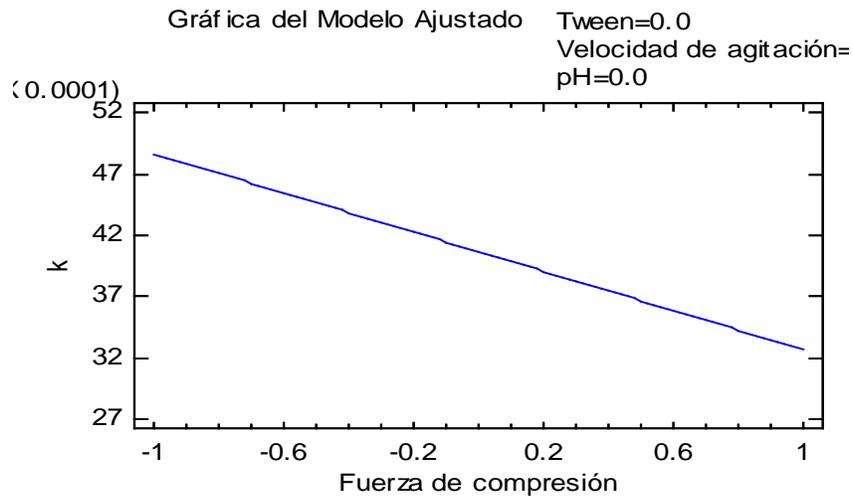
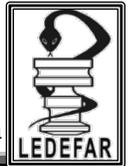


Figura 69 La respuesta k ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{min}$) en función de la fuerza de compresión (factor con efecto significativamente estadístico)

El modelo determinado para la constante de disolución intrínseca (k) mostro que los factores velocidad de agitación (rpm), Tween (%) y pH tienen un efecto nulo, o estadísticamente no significativo ($p > 0.05$), así por lo tanto la constante k esta en función de la fuerza de compresión (Ton.)

Y la constante de disolución (k) es inversamente proporcional a la fuerza de compresión, aunque el valor de k , realmente es muy ligeramente afectado por la fuerza de compresión por lo que se muestra en el modelo

$$k = 0.00406667 - 0.0008 * \text{Fuerza de compresión}$$

6.3.2. Perfiles de Disolución Intrínseca

Con los resultados encontrados en el desarrollo del método de VDI se determinaron las condiciones para realizar el método de disolución intrínseca para curcumina en el aparato de Wood y se muestran a continuación:

Medios farmacopeicos:

- HCl 0.1 M pH=1.2
- Buffer de fosfatos pH=6.8.

Ambos con una concentración de Tween 1.5%

Comprimido:

- 200 mg Curcumina Sigma Aldrich
- 0.9 Toneladas (t) fuerza de compresión

Condiciones de la disolución:

- 37 ° C
- 75 rpm
- 900 mL medio de disolución
- 5 mL de muestra sin reposición del medio

Tabla 46 Valores de K para curcumina obtenidos en medios diferentes y otros parámetros estadísticos

	HCl (0.1 M) pH 1.5	Buffer de Fosfatos pH 6.8
Constante de velocidad de disolución intrínseca k (mg/min/cm ²)	0.00279	0.0033
R	0.99	0.99
R ²	0.98	0.98

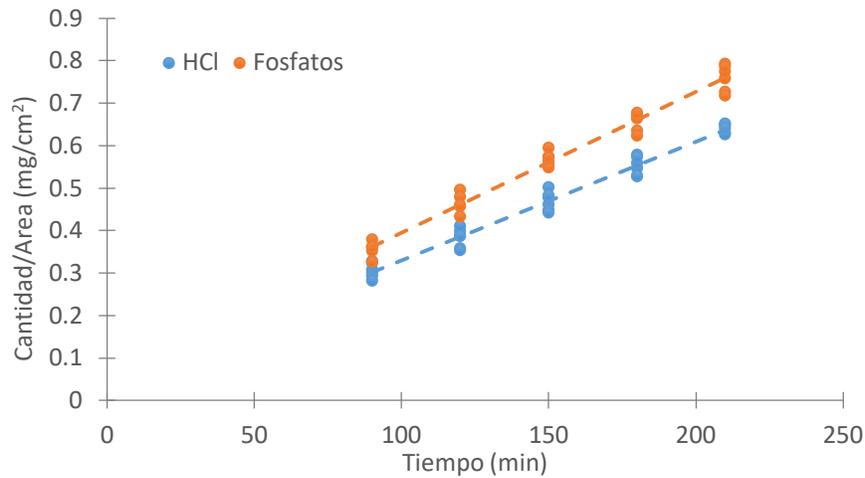
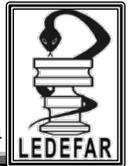


Figura 70 Velocidad de disolución intrínseca de curcumina en solución buffer de fosfatos y solución de HCl 0.1 N

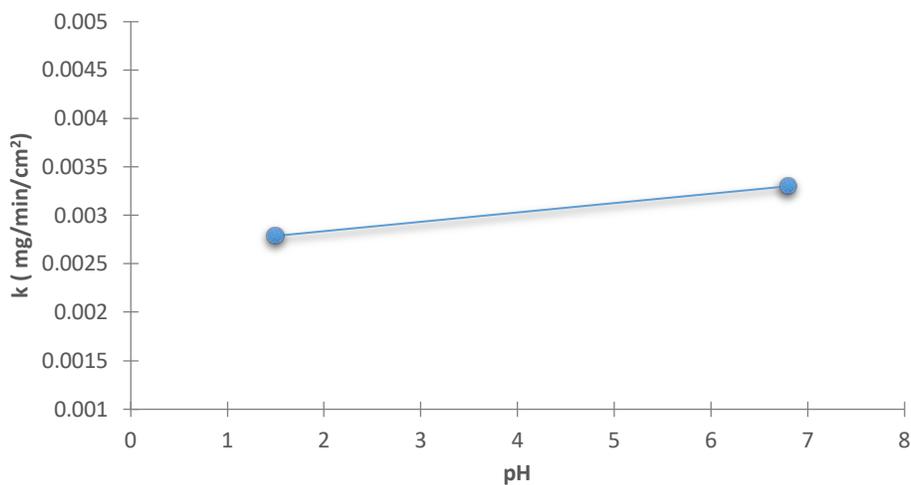
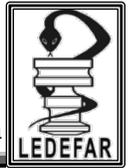


Figura 71 Efecto del pH en la velocidad de disolución intrínseca

Como se demostró en el análisis del desarrollo del método de disolución, el factor pH del medio de disolución tiene una influencia nula o estadísticamente no significativa ($p > 0.05$) sobre la velocidad de disolución intrínseca, probablemente debido a que dentro del rango evaluado de pH (1.2-6.8) la molécula permanece como la misma especie no ionizada.



7. CONCLUSIONES

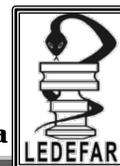
Se caracterizó la VDI de la curcumina en 2 medios de disolución para simular el ambiente gastrointestinal y comparar el efecto del pH sobre la constante de VDI.

Se aisló la curcumina a partir de una mezcla de curcuminoides mediante cromatografía preparativa, para utilizarla como estándar de referencia.

Se desarrolló un método analítico validado mediante HPLC para cuantificar curcumina en un perfil de disolución para la caracterización de la Velocidad de Disolución Intrínseca

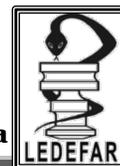
Se establecieron las condiciones de operación para lograr caracterizar los perfiles de disolución con los siguientes resultados:

- HCl 0.1N pH 1.5 es $k=0.00279$ (mg/min/cm²)
- Buffer de fosfatos pH 6.8, $k=0.0033$ (mg/min/cm²)



8. REFERENCIAS

- Amon, H., & MA, W. (1991). Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*, 57, 1–7.
- Aulton, M. E. (2001). Dissolution and solubility. In *Pharmaceutics: The science of dosage form design* (2nd ed., pp. 16–21, 122–123). Churchill Livingstone.
- Blumenthal, M. (1998). The Complete German Commission E Monographs. *American Botanical Council*.
- Braga, M. (2006). Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. *Carbohydr Polymers*, 63, 340–346.
- Braun, R., & Parrott, E. (1972). Influence of viscosity and solubilization on dissolution rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(2), 175–178.
- Bruner, L., & Tolloczko, S. (1900). Über die Auflösungs geschwindigkeit fester Körper. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie*, 35(1), 283–290.
- Brunner, E. (1904). Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z. Phys. Chem.*, 43, 56–102.
- Cano Vega, M. A. (2013). *Desarrollo de un nanosistema mucoadhesivo para la administracion oral de agentes antioxidantes en rumiantes*. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Chane-Ming, J. (2002). Chemical composition of essential oils from rhizomes, leaves and flowers of *Curcuma longa* L from Reunion Island. *J Essent Oil Res*, 14, 249–251.
- ChemicalBook. (2016). 458-37-7. Retrieved January 20, 2017, from http://www.chemicalbook.com/CASEN_458-37-7.htm
- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2010a). Assessment report on *Curcuma longa* L., rhizoma. Retrieved December 5, 2016, from http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal_med_000065.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d
- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2010b). Community Herbal Monograph on *Curcuma longa* L., rhizoma. Retrieved December 5, 2016, from http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal_med_000065.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d
- Edwards, L. J. (1951). The dissolution and diffusion of aspirin in aqueous media. *Trans. Faraday Soc.*, 47, 1191–1210.
- Elsevier. (2017). Analyzed search results. Retrieved January 20, 2017, from <https://www-scopus-com.pbidi.unam.mx:2443/term/analyzer.uri?sid=69ADDB65E7C9B241E09CC1EA9>



B838B8A.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3A400&origin=resultslist&src=s&s=TITL
E-ABS-KEY%28curcumin%29&sort=plf-
f&sdt=b&sot=b&sl=23&count=17392&analyzeResults=Analyze+results&tx

European Scientific Co-operative on Phytotherapy. (2003). *ESCOP monographs* (2nd ed.). ESCOP, Georg Thieme Verlag, Thieme New York.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, C. permanente. (2014). *FEUM 11a Edicion* (Vol. 1).

Gennaro, A. R. (Ed.). (2003). Disolucion. In *Remington: Farmacia Volumen 1* (20a ed., pp. 764–778). Ed. Médica Panamericana.

Gonda, R. (1990). Characterization of polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the rhizome of *Curcuma longa*. *Chem Pharm Bull*, 38, 482–486.

Gonda, R. (1992). Characterization of a neutral polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the rhizome of *Curcuma longa*. *Chem Pharm Bull*, 40, 185–188.

Haleblian, J. K. (1975). Characterization of Habits and Crystalline Modification of Solids and Their Pharmaceutical Applications. *J. Pharm. Sci.*, 64(8), 1269–1288.

Jadhav, B.-K., Mahadik, K.-R., & Paradkar, A.-R. (2007). Development and Validation of Improved Reversed Phase-HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bis-Demethoxycurcumin. *Chromatographia*, 65(7–8), 483–488.

Jiang, H. (2006). Use of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizome. *J Chromatogr*, 1111, 21–31.

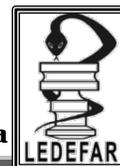
Lestari, M. L. A. D., & Indrayanto, G. (2014). Curcumin. In *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology* (Vol. 39, pp. 113–204).

Levy, G. (1961). Comparison of dissolution and absorption rates of different commercial aspirin tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(5), 388–392.

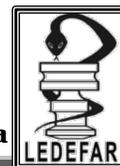
Li, W. (2009). Structure elucidation and NMR assignments for curcuminoids from the rhizomes of *Curcuma longa*. *Magn Reson Chem*, 47, 902–908.

Mammen, D. (2006). Phenolics. In *Medicinal Plants: Chemistry and properties* (pp. 144–145). Science publishers.

Miller, N. J., & Miller, J. C. (2002). Metodos de calibracion en analisis instrumental: regresion y correlacion. In *Estadística y quimiometria para quimica analitica* (4ta ed., pp. 115–122). España: Pearson Educacion S.A.



- Mullins, J., & Macek, T. (1960). Some pharmaceutical properties of novobiocin. *J. Pharm. Sci.*, 49, 245–248.
- Naz, S. (2010). Chemical analysis of essential oils from turmeric (*Curcuma longa*) rhizome through GC-MS. *Asian J Chem*, 22, 3153–3158.
- Nelson, K. G., & Miller, K. W. (1979). Principles of Drug Dissolution and Absorption Related to Bioavailability. In J. Blanchard, R. Sawchuk, & B. Brodie (Eds.), *Principles and Perspectives in Drug Bioavailability* (pp. 20–58). S. Karger.
- Nernst, W. (1904). Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z. Phys. Chem.*, 47, 52–55.
- Noyes, A. A., & Whitney, W. R. (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 19(12), 930–934.
- Park, S., & Kim, D. (2002). Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: A drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J Nat Prod*, 65, 1227–1231.
- Patricia269. (2006). Curcuma o turmeric (en ingles). Retrieved December 5, 2016, from <http://patricia269.blogspot.mx/2007/01/crcuma-o-turmeric-en-ingles.html>
- Payton, F. (2007). NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod*, 70, 143–146.
- Raina, V. (2005). Rhizome and leaf oil composition of *Curcuma longa* from the Lower Himalayan region of northern India. *J Essent Oil Res*, 17, 556–559.
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Shenghani, K., & Duvvuri, P. (2013). Degradation studies of curcumin. *Int. J. Pharm. Rev. Res.*, 3, 50–55.
- Shenoy, K., Chapman, D., & Campbell, J. (1959). Sustained release in pelleted preparations as judged by urinary excretion and in vitro methods. *Drug Stand.*, 27(3), 77–84.
- Skoog, D. A. (2008). Metodos de separacion. In *Principios de analisis instrumental* (6ta ed., pp. 816–855). Cengage Learning.
- Stuart, J. M., Veitch, N. C., Smith, M., Barnes, J., Anderson, L. A., & J., P. (Eds.). (2013). Turmeric. In *Herbal Medicines* (4th ed., pp. 716–720). Pharmaceutical Press.
- Sueth-Santiago, V., Peron Mendes-Silva, G., Decoté-Ricardo, D., & Edilson Freire De Lima, M. (2015). Curcumina, O Pó Dourado Do Açafão-Da-Terra: Introspeções Sobre Química E Atividades Biológicas. *Quim. Nova*, 38(4), 538–552. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>



- The United States Pharmacopeial, C. (2007). *2007 Usp 30 Nf 25. United States Pharmacopeia (USP 30) and National Formulary (NF 25)* (Vol. 1).
- Tonnesen, H. H., & Karlsen, J. (1985). Studies on Curcumin and Curcuminoids V. Alkaline Degradation of Curcumin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 180, 132–134.
- Tseng, Y. C., Patel, M., & Zhao, Y. (2014). Determination of intrinsic dissolution rate using miniaturized rotating and stationary disk systems. *Dissolution Technologies*, 21(2), 24–29. <https://doi.org/10.14227/DT210214P24>
- Wagner, J. G. (1971). *Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications.
- Wang, L. (2008). Diaryl derivatives from the root tuber of *Curcuma longa*. *Biochem Syst Ecol*, 36, 476–480.
- Wang, Y. J., Pan, M. ., Cheng, L., Lin, L. I., Ho, Y. S., & Hsieh, C. Y. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 1867–76.
- Wichtl, M. (Ed.). (2004). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis*. (3rd ed.). Stuttgart: medpharm Scientific publishers.
- World Health Organization, U. (1999). *WHO monographs on selected medicinal plants*. Geneve.
- Xiao, Y. (2011). Bisabocurcumin, a new skeleton curcuminoid from the rhizomes of *Curcuma longa* L. *Chin Chem Lett*, 22(1457–1460).
- Xiao, Y. (2012). Three new bisabolocurcumin ethers from the rhizomes of *Curcuma longa* L. *Helv Chim Acta*, 95, 327–332.
- Zeng, Y. (2007). New sesquiterpenes and calebin derivatives from *Curcuma longa*. *Chem Pharm Bull*, 55(940–943).

9. ANEXOS

Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 48.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 Single scan
 OBSERVE H1, 300.0789466 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min, 4 sec

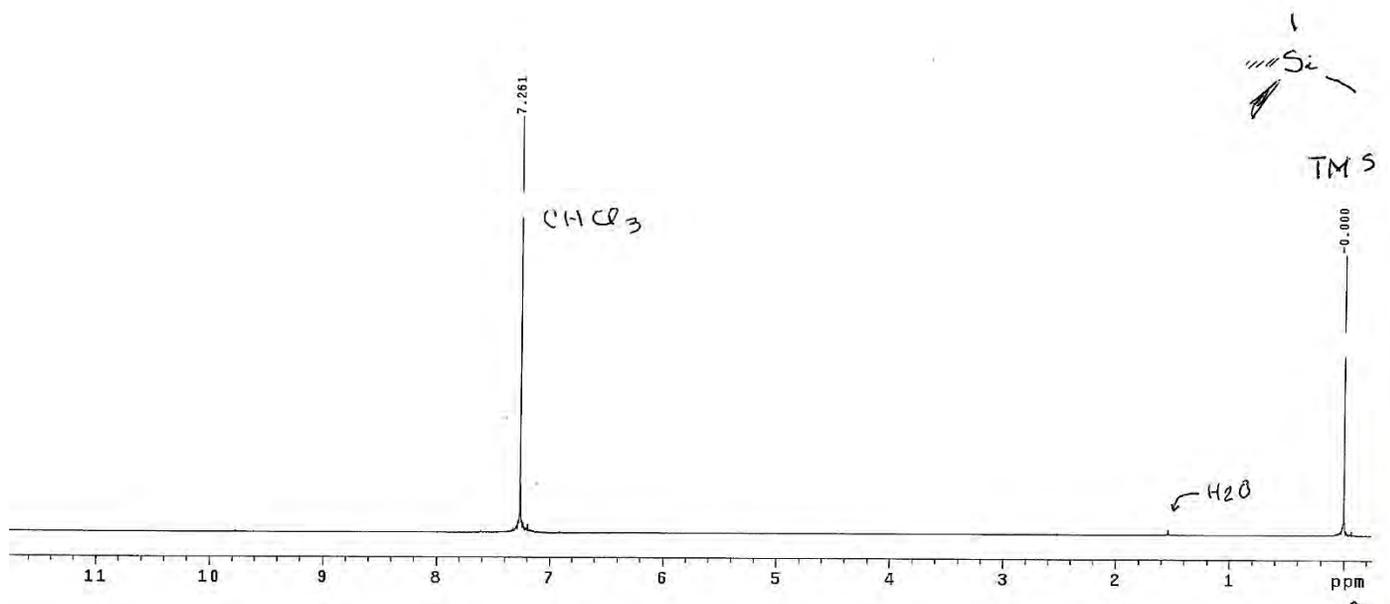


Figura 72 Solvente cloroformo; espectro 1H-RMN en CDCl_3 (Cloroformo deuterado) y TMS (Tetrametilsilano) como fuente de H^1 y referencia respectivamente

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 48.4 degrees
 Acq. time 1.988 sec
 Width 4506.5 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0789471 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min, 49 sec

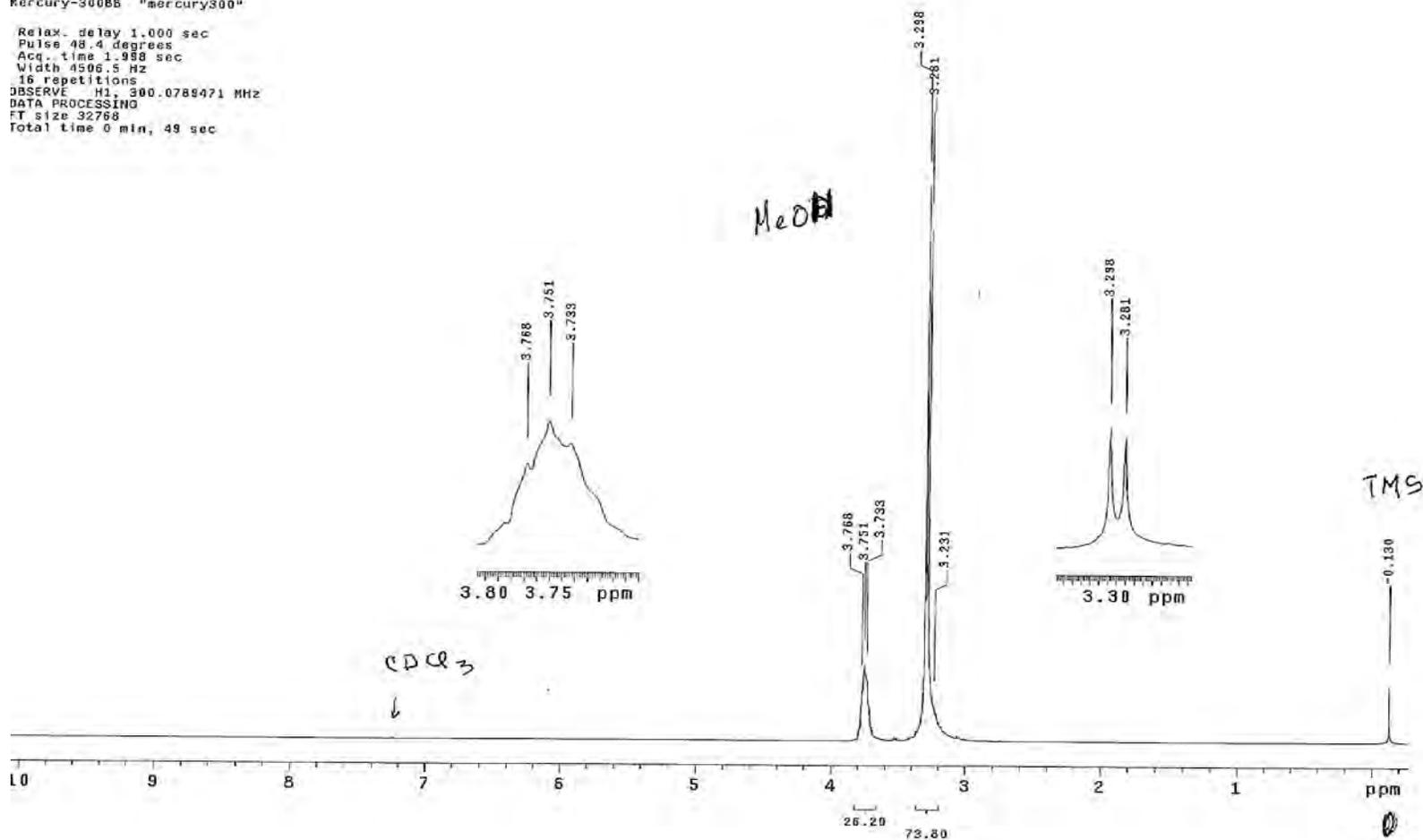


Figura 73 Solvente metanol; espectro 1H-RMN en CDCl₃ (Cloroformo deuterado) y TMS (Tetrametilsilano) como fuente de H¹ y referencia respectivamente

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 47 Resultados cromatográficos para la adecuabilidad del sistema en la cuantificación de curcumina

Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil ATC:ACN		Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Altura	k'	N	Concentración (µg/mL)	Área
1.1	52	48	9.35	-	1.20	16423	1.75	11155.99	0.768	222660
1.1	52	48	9.36	-	1.21	16445	1.75	11175.78	0.768	222697
1.1	52	48	9.37	-	1.20	16444	1.76	11163.66	0.768	224133
1.1	52	48	9.38	-	1.20	16435	1.76	11229.74	0.768	224000
1.1	52	48	9.41	-	1.18	16356	1.77	10944.63	0.768	225301
Promedio			9.37		1.20	16420.60	1.76	11133.96		223758.200
Desv. Est.			0.02		0.01	37.18	0.01	109.70		1108.080
C.V. %			0.24		0.75	0.23	0.38	0.99		0.495

Tabla 48 Resultados cromatográficos para la linealidad del sistema en la cuantificación de curcumina

Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil ATC:ACN		Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Altura	k'	N	Concentración (µg/mL)	Área
1.1	52	48	9.36	-	1.28	2017	1.75	11341.42	0.096	27120
1.1	52	48	9.35	-	1.20	1989	1.75	11345.88	0.096	26871
1.1	52	48	9.31	-	1.24	2056	1.74	12018.65	0.096	27058
1.1	52	48	9.30	-	1.23	4128	1.74	11914.87	0.192	54285
1.1	52	48	9.37	-	1.17	4198	1.76	11891.98	0.192	55374
1.1	52	48	9.41	-	1.16	4278	1.77	12025.96	0.192	56536
1.1	52	48	9.33	-	1.20	8203	1.74	11650.19	0.384	108503
1.1	52	48	9.33	-	1.22	8143	1.74	11475.84	0.384	108801
1.1	52	48	9.34	-	1.19	8163	1.75	11504.30	0.384	108671
1.1	52	48	9.32	-	1.22	12329	1.74	11490.03	0.576	163871
1.1	52	48	9.31	-	1.22	12362	1.74	11286.31	0.576	164938
1.1	52	48	9.34	-	1.21	12128	1.75	11421.22	0.576	163404
1.1	52	48	9.36	-	1.19	16570	1.75	11645.57	0.768	220306
1.1	52	48	9.33	-	1.20	16657	1.74	11559.24	0.768	221274
1.1	52	48	9.30	-	1.21	16611	1.74	11673.36	0.768	218563

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 49 Resultados cromatográficos para la precisión del sistema en la cuantificación de curcumina

Velocidad de flujo (mL/min)	Fase móvil ATC:ACN		Tr C (min)	Rs C-DMC	Coleo	Altura	k'	N	Concentración (µg/mL)	Área
1.1	52	48	9.353	-	1.229	14927	1.751	10769.50	0.768	204139
1.1	52	48	9.373	-	1.217	14740	1.757	10795.12	0.768	202723
1.1	52	48	9.384	-	1.202	14651	1.760	10914.66	0.768	200873
1.1	52	48	9.382	-	1.209	14942	1.759	10686.27	0.768	202372
1.1	52	48	9.439	-	1.201	14517	1.776	10663.88	0.768	201443
1.1	52	48	9.433	-	1.197	14534	1.774	10753.41	0.768	201370
1.1	52	48	9.468	-	1.214	7227	1.785	10366.94	0.384	102017
1.1	52	48	9.423	-	1.215	6984	1.771	10550.50	0.384	99155
1.1	52	48	9.456	-	1.192	7141	1.781	10539.46	0.384	100224
1.1	52	48	9.462	-	1.175	7257	1.783	10570.44	0.384	101326
1.1	52	48	9.458	-	1.207	7182	1.782	10264.32	0.384	101126
1.1	52	48	9.463	-	1.211	7031	1.783	10557.14	0.384	98186
1.1	52	48	9.495	-	1.124	1703	1.793	11131.40	0.096	26384
1.1	52	48	9.470	-	1.174	1829	1.785	10713.72	0.096	25343
1.1	52	48	9.450	-	1.153	1793	1.779	10770.36	0.096	24788
1.1	52	48	9.481	-	1.149	1788	1.789	10673.96	0.096	24908
1.1	52	48	9.466	-	1.152	1773	1.784	10386.13	0.096	24808
1.1	52	48	9.471	-	1.202	1831	1.786	10299.71	0.096	25656

$$\text{Nivel codificado} = 2 * \frac{\text{Nivel a codificar} - \text{Nivel central}}{\text{Nivel alto} - \text{nivel bajo}}$$

Figura 74 Formula para codificar factores

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 50 Factores controlados durante el desarrollo del método analítico y sus respuestas

Concentración curcumina	Composición fase móvil	Volumen de inyección	Velocidad de flujo fase móvil	Columnas	Área	RT	Rs
Curcumina	FM	Vol. Inyección	VelFM	Columna		min	C-DMC
µg/mL	v/v ATC(0.1 %)	µL	mL/min	Nombre			
3.072	50	20	1	Vydac C18,10µ-4.6x250mm	0	0	0
3.072	50	20	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	3637737	10.95	2.286
3.072	50	20	1	Xbridges C18, 5µm,4.6x250mm	3797992	10.273	2.363
2.304	50	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	6377378	10.95	2.290
2.304	52	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	6311807	13.35	2.430
2.304	54	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	6183101	16.29	2.570
0.576	50	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	166399	8.66	1.840
0.576	52	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	160413	9.9	2.000
0.576	54	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	120069	11.5	2.180
2.304	52	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	6311807	13.35	2.430
2.304	52	50	1.3	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	4910893	10.31	2.350
2.304	52	50	1.5	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	4302328	9	2.270
0.576	52	50	1.2	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	137070	8.2	1.970
0.576	52	50	1.1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	147530	8.99	2.000
0.576	52	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	160413	9.9	2.000

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 51 Factores controlados durante el desarrollo del método analítico y su codificación

Concentración curcumina	Composición fase móvil	Volumen de inyección	Velocidad de flujo fase móvil	Columnas	Codificación				
					Curcu	FM	Vol. Inyección	VelFM	Columna
Curcumina	FM	Vol. Inyección	VelFM	Columna					
µg/mL	v/v ATC (0.1%)	µL	mL/min	Nombre					
3.072	50	20	1	Vydac C18,10µ-4.6x250mm	1	-1	-1	-1	Vydac
3.072	50	20	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	1	-1	-1	-1	Simmetry
3.072	50	20	1	Xbridge C18, 5µm,4.6x250mm	1	-1	-1	-1	Xbridge
2.304	50	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	0.38461538	-1	1	-1	Simmetry
2.304	52	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	0.38461538	0	1	-1	Simmetry
2.304	54	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	0.38461538	1	1	-1	Simmetry
0.576	50	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	-1	-1	1	-1	Xbridge
0.576	52	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	-1	0	1	-1	Xbridge
0.576	54	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	-1	1	1	-1	Xbridge
2.304	52	50	1	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	0.38461538	0	1	-1	Simmetry
2.304	52	50	1.3	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	0.38461538	0	1	0.2	Simmetry
2.304	52	50	1.5	Simmetry C18, 5µm,4.6x250mm	0.38461538	0	1	1	Simmetry
0.576	52	50	1.2	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	-1	0	1	-0.2	Xbridge
0.576	52	50	1.1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	-1	0	1	-0.6	Xbridge
0.576	52	50	1	XBridge C18, 5µm,4.6x250mm	-1	0	1	-1	Xbridge

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 52 Resultados de absorbancia de la disolución de curcumina Sigma Aldrich de la Condición 1

Tiempo (min)	Acetatos	Fosfatos	HCL
	Abs	Abs	Abs
5	0.0031	0.0117	0.0115
15	0.0078	0.0147	0.0174
30	0.0088	0.0240	0.0113
60	0.0140	0.0214	0.0173
90	0.0186	0.0302	0.0182
150	0.0238	0.0346	0.0189
200	0.0278	0.0430	0.0207

Tabla 53 Resultados de absorbancia de la disolución de curcumina Sigma Aldrich. Condición 2

Tiempo (min)	Acetatos	Fosfatos	HCL
	Abs	Abs	Abs
30	0.0202	0.0148	0.0176
60	0.0302	0.0246	0.0337
90	0.0450	0.0356	0.0498
120	0.0561	0.0444	0.0608
180	0.0735	0.0599	0.0799
240	0.0910	0.0759	0.0964
280	0.1012	0.0878	0.1057

Tabla 54 Factores controlados durante el desarrollo del método de disolución, su codificación y la respuesta correspondiente

pH	Tween 80	Velocidad de agitación	Fuerza de compresión	Codificación				Respuesta
				pH	Tween	Velocidad de agitación	Fuerza de compresión	k
	%	rpm	Ton.					mg/cm ² /min
1.3	1.5	75	0.7	-1	1	1	-1	0.0044
4.45	1.5	75	0.7	0.125	1	1	-1	0.0052
6.6	1.5	75	0.7	0.8928	1	1	-1	0.005
1.3	0.5	50	1	-1	-1	-1	1	0.0032
4.49	0.5	50	1	0.1392	-1	-1	1	0.0027
6.9	0.5	50	1	1	-1	-1	1	0.0039

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 55 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca en condiciones: 50 rpm, 1 Ton, Tween 80 al 0.5%

Tiempo (min)	Área			Concentración (mg/mL)			Volumen (mL)	Cantidad Disuelta (mg)			Área (cm ²)	Cantidad Disuelta/Área (mg/cm ²)		
	HCl	Acetatos	Fosfatos	HCl	Acetatos	Fosfatos		HCl	Acetatos	Fosfatos		HCl	Acetatos	Fosfatos
30	15610	16330	19287	0.000056	0.000058	0.000069	900	0.0503	0.0526	0.0619	0.5	0.1006	0.1051	0.1237
60	31145	20380	30437	0.000110	0.000073	0.000108	895	0.0986	0.0649	0.0964	0.5	0.1972	0.1299	0.1928
90	28587	40007	37007	0.000101	0.000141	0.000131	890	0.0901	0.1256	0.1163	0.5	0.1802	0.2512	0.2325
120	52690	51027	70250	0.000185	0.000180	0.000247	885	0.1641	0.1590	0.2184	0.5	0.3282	0.3179	0.4368
150	72205	56777	79082	0.000254	0.000200	0.000278	880	0.2232	0.1757	0.2443	0.5	0.4463	0.3515	0.4886
180	101492	77310	114577	0.000356	0.000271	0.000402	875	0.3114	0.2375	0.3514	0.5	0.6228	0.4750	0.7028
210	112490	102310	137335	0.000394	0.000359	0.000481	870	0.3430	0.3121	0.4185	0.5	0.6861	0.6242	0.8371
240	134052	126675	153027	0.000470	0.000444	0.000536	865	0.4062	0.3839	0.4636	0.5	0.8124	0.7679	0.9271
310	151960	124492	190125	0.000532	0.000436	0.000665	860	0.4577	0.3752	0.5723	0.5	0.9153	0.7503	1.1446

Tabla 56 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca en condiciones: 75 rpm, 0.7 Ton, Tween 80 al 1.5%

Tiempo (min)	Área				Concentración (mg/mL)				Volumen (mL)	Cantidad Disuelta (mg)				Área (cm ²)	Cantidad Disuelta/Área (mg/cm ²)			
	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4		Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4		Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4
90	51939	51429	58261	51521	0.00018	0.00018	0.00020	0.00018	900	0.1645	0.1629	0.1844	0.1632	0.5	0.3290	0.3258	0.3688	0.3264
120	78674	65692	76124	67115	0.00028	0.00023	0.00027	0.00024	895	0.2472	0.2066	0.2392	0.2110	0.5	0.4944	0.4132	0.4784	0.4221
150	97390	93645	100985	98148	0.00034	0.00033	0.00035	0.00034	890	0.3040	0.2923	0.3152	0.3063	0.5	0.6080	0.5847	0.6303	0.6127
180	119566	112243	122356	118156	0.00042	0.00039	0.00043	0.00041	885	0.3708	0.3482	0.3795	0.3665	0.5	0.7417	0.6964	0.7589	0.7329
210	140139	132501	147018	137313	0.00049	0.00046	0.00051	0.00048	880	0.4320	0.4085	0.4531	0.4233	0.5	0.8639	0.8170	0.9062	0.8466

Desarrollo de un método para la caracterización del perfil de disolución de productos con curcumina

Tabla 57 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca caracterización Buffer Fosfatos

Tiempo (min)	Área						Concentración (mg/mL)						Volumen(mL)
	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	
90	59951	57092		55493	56899	51479	0.00021	0.00020	0.00000	0.00020	0.00020	0.00018	900
120	78963	76144	72700	73043		68812	0.00028	0.00027	0.00026	0.00026	0.00000	0.00024	895
150	95286	88650	90222	91824	91729	87665	0.00033	0.00031	0.00032	0.00032	0.00032	0.00031	890
180	107426	102248	107464	106990	109055	100451	0.00038	0.00036	0.00038	0.00038	0.00038	0.00035	885
210	122786	117769	125489	128377	127437	116288	0.00043	0.00041	0.00044	0.00045	0.00045	0.00041	880

Tiempo (min)	Cantidad Disuelta (mg)						Área (cm ²)	Cantidad Disuelta/Área (mg/cm ²)						Promedio	Desv.Est	%CV
	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6		Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6			
90	0.1897	0.1807	0.0012	0.1757	0.1801	0.1631	0.5	0.3794	0.3614		0.3514	0.3602	0.3261	0.3557	0.0194	5.4582
120	0.2481	0.2393	0.2285	0.2296	0.0012	0.2163	0.5	0.4962	0.4785	0.4570	0.4592		0.4327	0.4647	0.0240	5.1554
150	0.2974	0.2768	0.2817	0.2867	0.2864	0.2737	0.5	0.5949	0.5536	0.5634	0.5734	0.5728	0.5475	0.5676	0.0169	2.9705
180	0.3333	0.3173	0.3334	0.3320	0.3383	0.3117	0.5	0.6666	0.6346	0.6668	0.6639	0.6767	0.6235	0.6553	0.0211	3.2250
210	0.3786	0.3632	0.3869	0.3958	0.3929	0.3587	0.5	0.7573	0.7264	0.7739	0.7916	0.7859	0.7173	0.7587	0.0310	4.0877

Tabla 58 Resultados y cálculos de la velocidad de disolución intrínseca caracterización Buffer HCl

Tiempo (min)	Área						Concentración (mg/mL)						Volumen(mL)
	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	
90	47234	48516	50952	51674	46282	44266	0.00017	0.00017	0.00018	0.00018	0.00016	0.00016	900
120	61455	63215	56895	65248	61746	56057	0.00022	0.00022	0.00020	0.00023	0.00022	0.00020	895
150	73854	76483	71563	80355	77215	70573	0.00026	0.00027	0.00025	0.00028	0.00027	0.00025	890
180	84789	88082	90026	93082	92465	85155	0.00030	0.00031	0.00032	0.00033	0.00032	0.00030	885
210	102215	101478		105037	105610	103945	0.00036	0.00036	0.00000	0.00037	0.00037	0.00036	880

Tiempo (min)	Cantidad Disuelta (mg)						Área (cm ²)	Cantidad Disuelta/Área (mg/cm ²)						Promedio	Desv.Est	%CV
	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6		Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6			
90	0.1497	0.1538	0.1614	0.1637	0.1467	0.1404	0.5	0.2994	0.3075	0.3228	0.3274	0.2935	0.2808	0.3052	0.0177	5.8131
120	0.1933	0.1989	0.1791	0.2052	0.1943	0.1765	0.5	0.3867	0.3977	0.3582	0.4104	0.3885	0.3529	0.3824	0.0225	5.8807
150	0.2308	0.2390	0.2237	0.2510	0.2413	0.2206	0.5	0.4616	0.4780	0.4474	0.5020	0.4825	0.4412	0.4688	0.0230	4.9093
180	0.2633	0.2735	0.2795	0.2890	0.2871	0.2645	0.5	0.5266	0.5470	0.5590	0.5779	0.5741	0.5289	0.5523	0.0220	3.9756
210	0.3154	0.3131	0.0012	0.3241	0.3258	0.3207	0.5	0.6308	0.6263		0.6481	0.6517	0.6414	0.6397	0.0109	1.7077