



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio de la interacción de *Curcuma longa* y sus metabolitos con fármacos antiulcerosos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Alejandra Orona Ortiz

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química

Ciudad de México, Noviembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Estudio de la interacción de *Curcuma longa* y sus metabolitos con
fármacos antiulcerosos**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Alejandra Orona Ortiz

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química



Ciudad de México, noviembre 2019.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Enrique Hong Chong
Vocal	Dr. Mariano Martínez Vázquez
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña
Secretario	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Asesor	Dr. Andrés Navarrete Castro
Sustentante	M. en C. Alejandra Orona Ortiz

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 126, Conjunto E, Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado durante la realización de este trabajo (número de becario 257718).

Este trabajo fue financiado gracias a los proyectos PAIP 5000-9143 y DGAPA-UNAM PAPIIT IN213418.

Agradezco la amable donación de la raíz de *Curcuma longa* por los Laboratorios MIXIM, S. A. de C. V.

A la Dra. Ma. Josefa Bernad por la donación de la mucina de estómago porcina (tipo III) con la cual se realizó la evaluación de la mucoadhesión.

Al Dr. Andrés Navarrete y a mi comité tutor, la Dra. Rachel Mata Essayag y la Dra. Aracely E. Chávez Piña, por su valioso asesoramiento durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Medina Torres por el apoyo durante los experimentos reológicos para determinar la mucoadhesión de los tratamientos.

Al Dr. José Luis Balderas por el apoyo técnico otorgado.

Al personal de la USAI, que me apoyó durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 126, por sus consejos, observaciones y momentos gratos.

A mi familia y amigos por sus consejos y apoyo.

A mi madre, por brindarme todas las herramientas necesarias para lograr todos mis propósitos en la vida y su amor incondicional.

Dedicatoria:

A mi madre.

Gracias por tus enseñanzas de vida
y por ser el ángel que siempre cuida mis pasos.

RESUMEN

El estudio de las interacciones farmacológicas es de suma importancia, ya que el uso concomitante de varios tratamientos en la terapéutica es común. Las interacciones pueden ser benéficas incrementando los efectos terapéuticos con dosis menores, lo cual permite reducir la toxicidad de los fármacos empleados, así como minimizar o retardar la inducción de la tolerancia a los mismos. Sin embargo, en algunas ocasiones la interacción entre varios tratamientos podría ser desfavorable o incluso perjudicial para la salud. En el presente trabajo se consideró el estudio de las interacciones farmacológicas entre la curcumina, (principal metabolito secundario de *Curcuma longa*), el extracto acetónico de esta planta y los fármacos antiulcerosos ranitidina y subsalicilato de bismuto, considerando el gran consumo de la raíz de cúrcuma y su importancia como uno de los remedios tradicionales utilizados a nivel mundial para el tratamiento de úlcera péptica. Se ha reportado que tanto la raíz, los extractos y los curcuminoides aislados ayudan al tratamiento y recuperación de este padecimiento. En la actualidad se desconoce el tipo de interacciones que podrían ocurrir con el uso concomitante de esta raíz, o sus metabolitos, y fármacos utilizados para el tratamiento de la úlcera péptica. Además, en este estudio se evaluó la interacción de las combinaciones múltiples entre los curcuminoides, comparadas contra el extracto de *C. longa*, para definir si la proporción de los metabolitos es importante para mantener la potencia y eficacia del extracto. Para evaluar la gastroprotección de todos los tratamientos se utilizó el modelo de úlcera gástrica inducida con etanol en ratas Wistar. El análisis de todas las interacciones desarrolladas en este trabajo, se llevó a cabo empleando la ecuación del índice de combinación-isoblograma desarrollada por Chou y Talalay en 1976.

En este trabajo se demostró la actividad gastroprotectora (dosis-dependiente) del extracto de *C. longa* y los curcuminoides, siendo más potentes que los fármacos ranitidina y subsalicilato de bismuto. El resultado del análisis de las combinaciones binarias curcumina-ranitidina y extracto-ranitidina (1:1) sugieren una interacción de tipo subaditiva cuando la curcumina o el extracto se administra antes que la ranitidina. Sin embargo, cuando la administración se invierte, el resultado de la interacción es aditiva. El estudio reológico demostró mucoadhesión por parte del extracto y los tres curcuminoides principales. Esta mucoadhesión, podría estar involucrada en el mecanismo antagonista del extracto y la curcumina sobre el efecto de la ranitidina. Además, la mucoadhesión presentada podría sugerir un mecanismo de gastroprotección adicional para la *Curcuma longa* y los curcuminoides. Por otro lado, la administración del extracto o curcumina con subsalicilato de bismuto resultó ser de tipo aditiva, en las condiciones evaluadas. Mediante el análisis de los espectros de infrarrojo de la mezcla, no se encontró la formación de nuevos grupos funcionales, lo que sugiere que no hubo reacción entre la curcumina y el fármaco, por lo que la aditividad de los efectos de los tratamientos es meramente farmacológico y no químico.

Por otro lado, el extracto presentó mayor actividad gastroprotectora, que los curcuminoides individuales, sus combinaciones binarias (1:1) o la combinación triple (1:1:1) en la cual las proporciones del extracto fueron cambiadas. Esto sugiere un efecto sinérgico entre los metabolitos presentes en el extracto, además de que las proporciones de los curcuminoides son importantes para mantener su potencia.

ABSTRACT

Studying of pharmacologic interactions is important because the administration of different treatments is fairly common. These interactions could be beneficial, increasing the therapeutic effects with less dosification which leads to reduce toxicity of these drugs. However, sometimes interactions could be unfavorable or even harmful. In this work we considered the study of pharmacological interactions between curcumin (main metabolite of *Curcuma longa*), the acetic extract of this plant and the antiulcer drugs ranitidine and bismuth subsalicylate, considering the wide consumption of this root around the world and its importance as one of the herbal remedies most used to treat peptic ulcer.

It has been reported that the root, the extracts and the isolated curcuminoids help in the treatment and healing of this illness. Nowadays, it is unknown the interactions that could show with the administration of this root, or its metabolites and antiulcer drugs. In addition, in this study we evaluated the interactions of multiple combinations between the curcuminoids, compared against the *C. longa* extract, to establish if the proportion of the metabolites is important to keep the effectiveness of the extract. The gastroprotection of all treatments was evaluated by the ethanol-induced gastric damage using Wistar rats. The analysis of the interactions was carried out by the combination index-isobologram equation, developed by Chou and Talalay in 1976.

This work demonstrated the gastroprotective activity (dose-dependent) of the *C. longa* extract and the curcuminoids. These were more potent than the ranitidine and the bismuth subsalicylate. The analysis of binary combinations curcumin-ranitidine or the extract-ranitidine (1:1) suggest a subadditive interaction, when curcumin or the extract are administered before the ranitidine. However, when the administration is inverted, the interaction in both cases is additive. The rheological study showed mucoadhesion for the extract and the three main curcuminoids. This mucoadhesion could be involved in the subadditive mechanism of the extract and the curcumin against ranitidine. In addition, this mucoadhesion suggests another gastroprotective mechanism for *Curcuma longa* and curcuminoids additional to their antioxidant and anti-inflammatory activities. On the other hand, the administration of the extract or curcumin with bismuth subsalicylate was additive, under the conditions tested. The infrared analysis did not show new signals or new functional groups that suggested a chemical interaction between the compounds. So that, the additivity of the effects of the treatments is pharmacologic.

The extract showed better gastroprotective activity than the single curcuminoids, their binary combinations or the triple combination (1:1:1) in which the extract proportions were changed. This suggests a synergistic effect between the extract metabolites, also, that curcuminoids proportions are important to keep the extract potency.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.MARCO TEÓRICO.....	2
1.1. <i>Curcuma longa</i>	2
1.2.Fitoquímica de <i>Curcuma longa</i>	5
1.3.Estudios sobre la bioactividad de los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina).....	11
1.4.Mecanismo de acción molecular de la curcumina.....	16
1.5.Relación entre estructura y actividad antioxidante de la curcumina y sus análogos.....	19
1.6.Anatomía y fisiología del estómago.....	23
1.7.Fisiopatología de la úlcera péptica gástrica y duodenal.....	25
1.8.Regulación neuroendócrina de la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales.....	28
1.9.Fármacos gastroprotectores y antiulcerosos.....	31
1.10.Análisis isobolográfico.....	33
1.11.Ecuación del índice de combinación (IC)-isoblograma (método Chou-Talalay).....	36
1.12.Cálculo del Índice de la Reducción de la Dosis (DRI).....	38
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
3.HIPÓTESIS.....	39
4.OBJETIVO.....	40
4.1.Objetivos secundarios.....	40
5.METODOLOGÍA.....	41
5.1.Procedimientos generales.....	41
5.2.Material vegetal y fármacos.....	41
5.3.Aislamiento y purificación de los curcuminoides.....	41
5.4.Composición relativa de curcuminoides del extracto de <i>C. longa</i>	42
5.5.Preparación de las suspensiones.....	42
5.6.Animales de experimentación.....	43
5.7.Modelo de úlcera gástrica inducida con etanol en rata.....	43
5.8.Determinación del efecto gastroprotector.....	43

5.9. Análisis isoblográfico normalizado.....	44
5.10. Análisis de las combinaciones múltiples aplicando la ecuación del índice de combinación (CI)-isoblograma (método Chou-Talalay).....	44
5.11. Cálculo del Índice de la Reducción de la Dosis (DRI).....	46
5.12. Evaluación de la mucoadhesión.....	46
5.13. Análisis histológico.....	47
5.14. Análisis estadístico.....	47
6. RESULTADOS.....	48
6.1 Aislamiento e identificación de curcuminoides.....	48
6.2. Composición relativa de curcuminoides en el extracto de <i>C. longa</i>	49
6.3. Efecto del disolvente y proceso de extracción en la composición relativa de curcuminoides en el extracto.....	52
6.4. Determinación de la Dosis mediana (<i>Dm</i>) y el efecto gastroprotector del extracto, la curcumina y los fármacos antiulcerosos.....	54
6.5. Evaluación de las interacciones farmacológicas.....	55
6.5.1. <u>Combinaciones de ranitidina con curcumina y el extracto</u>	55
6.5.2. <u>Combinaciones de subsalicilato de bismuto con curcumina y el extracto</u>	57
6.6. Determinación de la Dosis mediana (<i>Dm</i>) y efecto gastroprotector del extracto y los curcuminoides individuales.....	58
6.7. Evaluación de la interacción entre los curcuminoides.....	59
6.7.1. <u>Evaluación del extracto de <i>C. longa</i></u>	59
6.7.2. <u>Curcumina-Desmetoxicurcumina-Bis-desmetoxicurcumina (1:1:1)</u>	60
6.7.3. <u>Combinación Curcumina-Desmetoxicurcumina y Curcumina-Bis-desmetoxicurcumina (1:1)</u>	61
6.8. Análisis histológico del tratamiento con los curcuminoides y el extracto...	63
7. DISCUSIÓN.....	66
8. CONCLUSIONES.....	79
Perspectivas.....	80
Referencias.....	81
ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de la inflorescencia de <i>Curcuma longa</i>	4
Figura 2. Raíz o rizoma de <i>Curcuma longa</i> completa y en polvo.....	4
Figura 3. Biosíntesis de curcuminoides.....	5
Figura 4. Curcuminoides principales del tipo difenilheptanoides de la especie <i>Curcuma longa</i>	6
Figura 5. Curcuminoides principales del tipo difenilpentanoides de la especie <i>Curcuma longa</i>	7
Figura 6. Derivados del ácido cinámico aislados de <i>C. longa</i>	7
Figura 7. Monoterpenos principales aislados de <i>C. longa</i>	8
Figura 8. Sesquiterpenos tipo bisabolano aislados de <i>C. longa</i>	9
Figura 9. Sesquiterpenos tipo curcumano, elemmano, germacrano y guayano aislados de <i>C. longa</i>	10
Figura 10. Compuestos misceláneos aislados de <i>C. longa</i>	10
Figura 11. Mecanismos moleculares de acción de la curcumina y efectos celulares.....	18
Figura 12: Estructuras en equilibrio de la curcumina.....	19
Figura 13: Estructuras resonantes estabilizantes del radical curcumina en la forma dicetona.....	20
Figura 14: Estructuras resonantes estabilizantes del radical curcumina en la forma ceto-enol.....	21
Figura 15: Anatomía y descripción gráfica de las partes del estómago.....	23
Figura 16. Organización de la pared estomacal y glándula gástrica.....	24
Figura 17: Principales factores que estimulan la secreción de ácido clorhídrico en una célula parietal.....	27
Figura 18. Regulación neuroendócrina de la secreción de ácido clorhídrico.....	28
Figura 19: Esquema de una célula parietal no estimulada.....	29
Figura 20. Isoblograma lineal para fármacos con radio de potencia constante.....	34
Figura 21. Isobolas de aditividad para un efecto igual al 50% de dos agonistas completos con radio de la potencia variable.....	35
Figura 22. Gráfica del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (Fa) y determinación de sinergismo, aditividad o subaditividad.....	37

Figura 23. Gráfica del índice de reducción de la dosis (DRI) vs la fracción afectada (Fa).....	38
Figura 24. Estructura de los tres curcuminoides aislados e identificados.....	48
Figura 25. Cromatograma del extracto de <i>C. longa</i> , obtenido por extracción en Soxhlet con acetona.....	49
Figura 26. Espectro de masas del pico observado a 7.0-7.3 min.....	50
Figura 27. Espectro de masas del pico observado a 7.4-7.7 min.....	50
Figura 28. Espectro de masas del pico observado a 7.7-8.1 min.....	50
Figura 29. Cromatogramas comparativos de los diferentes extractos.....	52
Figura 30. Curvas de ajuste de la <i>Ecuación del Efecto-mediana</i> para el cálculo de <i>Dm</i> de la curcumina, el extracto y fármacos antiulcerosos.....	54
Figura 31. Isoblograma normalizado de la combinación extracto-ranitidina y curcumina-ranitidina	56
Figura 32. Curva del índice de combinación (<i>IC</i>) vs la fracción afectada (<i>fa</i>) de las combinaciones extracto-ranitidina y curcumina-ranitidina.....	56
Figura 33. Isoblograma normalizado de la combinación extracto-s. de bismuto y curcumina-s de bismuto.....	57
Figura 34. Curva del índice de combinación (<i>IC</i>) vs la fracción afectada (<i>fa</i>) de las combinaciones extracto-s. de bismuto y curcumina-s. de bismuto.....	58
Figura 35. Curvas de ajuste de la <i>Ecuación del Efecto-mediana</i> para el cálculo de <i>Dm</i> de los curcuminoides y el extracto.....	58
Figura 36. Curva del índice de combinación (<i>IC</i>) vs la fracción afectada (<i>fa</i>) del extracto de <i>C. longa</i>	60
Figura 37. Gráfica del índice de reducción de la dosis (<i>DRI</i>) para Los curcuminoides en el extracto.....	60
Figura 38. Curva de ajuste de la <i>Ecuación del Efecto-mediana</i> para el cálculo de <i>Dm</i> de la combinación triple.....	61
Figura 39. Curva del índice de combinación (<i>IC</i>) vs la fracción afectada (<i>fa</i>) de CUR-DMC-BDMC (1:1:1).....	61
Figura 40. Curva de ajuste de la <i>Ecuación del Efecto-mediana</i> para el cálculo de <i>Dm</i> de la combinación CUR-DMC y CUR-BDMC.....	62

Figura 41. Isoblograma normalizado de la combinación Curcumina-DMC y Curcumina-BDMC.....	62
Figura 42. Curva del índice de combinación (<i>IC</i>) vs la fracción afectada (<i>fa</i>) de CUR-DMC y CUR-BDMC.....	63
Figura 43. Cortes histológicos de la cavidad gástrica (aumento 10x) de los tratamientos con los tres curcuminoides.....	64
Figura 44. Cortes histológicos de la cavidad gástrica (aumento 10x) de los tratamientos con el extracto y la combinación triple.....	65
Figura 45. Cromatograma de la combinación curcumina-ranitidina y espectros de masas de los picos observados.....	68
Figure 46. Gráficos de la prueba de cizalla simple para las diferentes suspensiones.....	70
Figura 47. Gráficos comparativos de G' y G'' de mucina sola dispersa, y cada una de las mezclas de curcuminoides con mucina.....	71
Figura 48. Sinergismo de los parámetros de sinergismo reológico $\Delta G'$ y $\Delta G''$ de los diferentes sistemas a distintas frecuencias angulares.....	72
Figura 49. Isoblograma normalizado de la combinación ranitidina-extracto y ranitidina-curcumina (orden inverso de administración).....	72
Figura 50. Espectro de absorción en infrarrojo de la mezcla curcumina-s. de bismuto.....	74

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. Nombres comunes de <i>Curcuma longa</i> en diferentes idiomas.....	2
Cuadro 2. Especies importantes de <i>Curcuma</i> relacionadas.....	3
Cuadro 3: Estudios sobre la bioactividad de los curcuminoides.....	12
Cuadro 4: Estudios sobre los efectos en el sistema digestivo y gastroprotectores de los curcuminoides.....	14
Cuadro 5. Blancos moleculares de la curcumina en estudios celulares.....	17
Tabla 1. Diseño experimental de las combinaciones binarias (1:1).....	46
Tabla 2. Diseño experimental para la combinación triple CUR-DMC-BDMC (1:1:1).....	46
Tabla 3. Proporciones relativas de los tres principales curcuminoides en el extracto de <i>C. longa</i> , obtenido por extracción en Soxhlet con acetona.....	51
Tabla 4. Proporción relativa de los tres curcuminoides (%) utilizando diferentes métodos de extracción.....	53
Tabla 5. Dosis mediana (Dm) y valor de m (pendiente) para curcumina, el extracto y los fármacos antiulcerosos.....	55
Tabla 6. Dosis mediana (Dm) y valor de m (pendiente) para los curcuminoides y el extracto.....	59

INTRODUCCIÓN

La combinación de varios fármacos es una estrategia comúnmente usada en la clínica para incrementar los efectos terapéuticos con dosis menores, lo cual permite reducir la toxicidad de los fármacos empleados, así como minimizar o retardar la inducción de la resistencia a los mismos. Cuando dos o más compuestos ejercen un mismo efecto y se encuentran presentes simultáneamente en el organismo o medio, es importante detectar y caracterizar cualquier tipo de interacción que potencie o inhiba el efecto que los fármacos por sí solos presentan.

El estudio de las interacciones farmacológicas es de suma importancia, ya que en la mayoría de los casos se desconoce si el uso concomitante de varios tratamientos favorece la disminución de los signos y síntomas de una enfermedad o retarda la cura de la misma. En algunos casos estas interacciones pueden ser incluso perjudiciales para la salud.

La úlcera péptica es una de las tres principales causas de hemorragia del tubo digestivo y su etiología es variada. La perforación se presenta en 2% a 10% de los casos y la mortalidad general reportada es alrededor de 10%, sin embargo, este porcentaje se eleva en ancianos hasta 30%. El manejo de las complicaciones de la úlcera péptica genera gastos importantes a los servicios de salud, ya que en la mayoría de estos casos, se utilizan recursos de terapia intensiva, apoyo nutricional o incluso intervención quirúrgica. En el 2013 en México las úlceras, gastritis y duodenitis se encontraron en el 4° lugar de morbilidad con 1'561,717 casos (DGE, 2013).

Curcuma longa ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional hindú desde hace miles de años para tratar diversos padecimientos, tales como infecciones oculares, lepra, ictericia, infertilidad, problemas estomacales, entre otros. En la actualidad se ha reportado que tanto la raíz, los extractos y los curcuminoides aislados ayudan a la recuperación y tratamiento de úlceras pépticas.

En el presente trabajo se consideró el estudio de las interacciones farmacológicas entre los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina), principales metabolitos secundarios de *Curcuma longa* y fármacos con actividad antiulcerosa, debido al gran consumo de la raíz de cúrcuma y a su importancia como uno de los remedios herbolarios más utilizados a nivel mundial para el tratamiento de úlcera péptica.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Curcuma longa*.

La raíz de la cúrcuma es utilizada como condimento en la cocina internacional, como cosmético y como remedio herbolario. Es consumida principalmente en los países de Asia y Medio Oriente debido a su gran uso en la gastronomía de la región, es el ingrediente principal del curry además de brindarle el color amarillo característico. El consumo promedio en los países asiáticos se encuentra entre 200-1000 mg/día ó 160-440 g/persona/año (Benzie & Wachtel-Galor, 2011).

Durante milenios se ha empleado en la medicina tradicional asiática (Ayurvédica y China) para el tratamiento de artritis reumatoide, uveítis crónica, conjuntivitis, cáncer de piel, varicela, heridas cutáneas, infecciones urinarias, como antiparasitario y para padecimientos hepáticos. Además, se ha utilizado para mejorar padecimientos gastrointestinales como flatulencias, colon irritable, cólicos abdominales, dispepsia, saciedad postprandial, pérdida de apetito, entre otros, debido a sus efectos colerético, carminativo, antimicrobiano, antiparasitario y antiinflamatorio (Ravindran, *et al.*, 2007; Benzie & Wachtel-Galor, 2011; Gupta, *et al.*, 2013).

En la actualidad se tiene evidencia científica de sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antimicrobianas y anticancerígenas. Existen numerosas líneas de investigación que avalan la actividad antiinflamatoria de la planta (Benzie & Wachtel-Galor, 2011). Una propiedad interesante es su capacidad de sanar tejidos dañados como en el caso de las úlceras gástricas y duodenales.

El género *Curcuma* incluye alrededor de 110 especies distribuidas en el Sur y Sureste de Asia (Ravindran, *et al.*, 2007). Está ampliamente distribuida en los trópicos y se le conoce con diferentes nombres alrededor del mundo (Cuadro 1).

IDIOMA	NOMBRE COMÚN
<i>Bengali</i>	Haldi, pitras
<i>Cantonés</i>	Wong kewng, yuetkau
<i>Chino</i>	Chiang husang, kiang husang, yuchin
<i>Inglés</i>	Turmeric, Indian saffron
<i>Francés</i>	Curcuma , Saffron de India, sochet des Indes
<i>Alemán</i>	Glbwurz, kurkuma
<i>Italiano</i>	Curcuma
<i>Portugués</i>	Acafrao da india
<i>Español</i>	Cúrcuma

Cuadro 1. Nombres comunes de *Curcuma longa* en diferentes idiomas (Ravindran, *et al.*, 2007).

India es el mayor productor de cúrcuma en el mundo y consume cerca del 80% de lo que se cultiva. Este país cosecha alrededor de 650,000 toneladas anuales procedentes de 1'610,000 hectáreas de siembra (Ravindran, *et al.*, 2007). Se ha considerado que la cúrcuma de mejor calidad es la que procede de éste país (Benzie& Wachtel-Galor, 2011).

Existen al menos 133 especies de *Curcuma* de importancia industrial, algunas de ellas se enlistan en el Cuadro 2 (Benzie& Wachtel-Galor, 2011):

ESPECIES IMPORTANTES RELACIONADAS
<i>Curcuma amada</i> (jengibre mango)
<i>Curcuma angustifolia</i> (jengibre alto escondido)
<i>Curcuma aromatica</i>
<i>Curcuma caesia</i>
<i>Curcuma domestica</i> (Emperador abigarrado)
<i>Curcuma longa</i> (Cúrcuma)
<i>Curcuma sylvatica</i>
<i>Curcuma zedoaria</i> (Cúrcuma blanca zedoary)

Cuadro 2. Especies importantes de *Curcuma* (Benzie& Wachtel-Galor, 2011).

La cúrcuma (Figura 1) es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia *Zingiberaceae*, la cual es nativa del sur de Asia, crece entre los 20°-30° C en ambientes húmedos y lluviosos, principalmente en las selvas tropicales. La planta individual puede crecer hasta un metro de altura, posee grandes hojas oblongas, la raíz, de donde se extrae la cúrcuma, es tuberosa con piel rugosa y segmentada, mide entre 2.5-7.0 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro con pequeñas ramificaciones (Benzie& Wachtel-Galor, 2011). La cúrcuma también tiene un valor ornamental debido a sus llamativas inflorescencias terminales, posee tres sépalos de 0.8-1.2 cm de largo fusionados, son de color blanco, los tres pétalos amarillos brillantes se funden en una corola en forma de tubo de hasta 3 cm de largo, las flores se encuentran envueltas en brácteas largas y muy coloridas (Ravindran, *et al.*, 2007).



Figura 1. Fotografía de la inflorescencia de *Curcuma longa* (A). Esquema de las partes de la planta (B): hoja (1), rizoma o raíz (2), flor (3), brácteas (4) (Ravindran, *et al.*, 2007).

La raíz o rizoma (Figura 2) es una de las partes más importantes de la planta, ya que de ella se extraen los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina), a estos metabolitos se atribuyen la mayor parte de los efectos farmacológicos de la cúrcuma y se han considerado como los principios activos.

La raíz consiste en una parte central llamada “rizoma madre” o bulbo, el cual tiene forma de pera y de ahí brotan raíces secundarias que pueden ser desde 2 a 5, estas ramificaciones primarias dan lugar a otras secundarias y terciarias (Ravindran, *et al.*, 2007). Debajo de la piel café, escamosa y segmentada la apariencia del rizoma es amarilla-dorada.



Figura 2. Raíz o rizoma de *Curcuma longa* completa y en polvo.

1.2. Fitoquímica de *Curcuma longa*.

Los compuestos del metabolismo secundario del género *Curcuma* han sido bien estudiados, dentro de los principales componentes aislados tenemos difenilheptanoides (curcuminoides), monoterpenos y sesquiterpenos.

Existe evidencia de que los curcuminoides son unos de los principales componentes a los cuales se atribuyen los efectos benéficos de la planta. Se han aislado gran variedad de estos compuestos en las distintas especies de *Curcuma*, sin embargo no se encuentran presentes en todas. Los curcuminoides químicamente hablando son difenilheptanoides, están formados por dos anillos fenólicos unidos por una cadena de siete carbonos. La biosíntesis (Figura 3) de los curcuminoides comienza con un intermediario dicétido formado por una policétidosintasa, seguida de una reacción de condensación por una chalconasintasa, posteriormente se llevan a cabo cierto número de reacciones que permiten la formación de una gran variedad de estos compuestos (Ravindran, *et al.*, 2007).

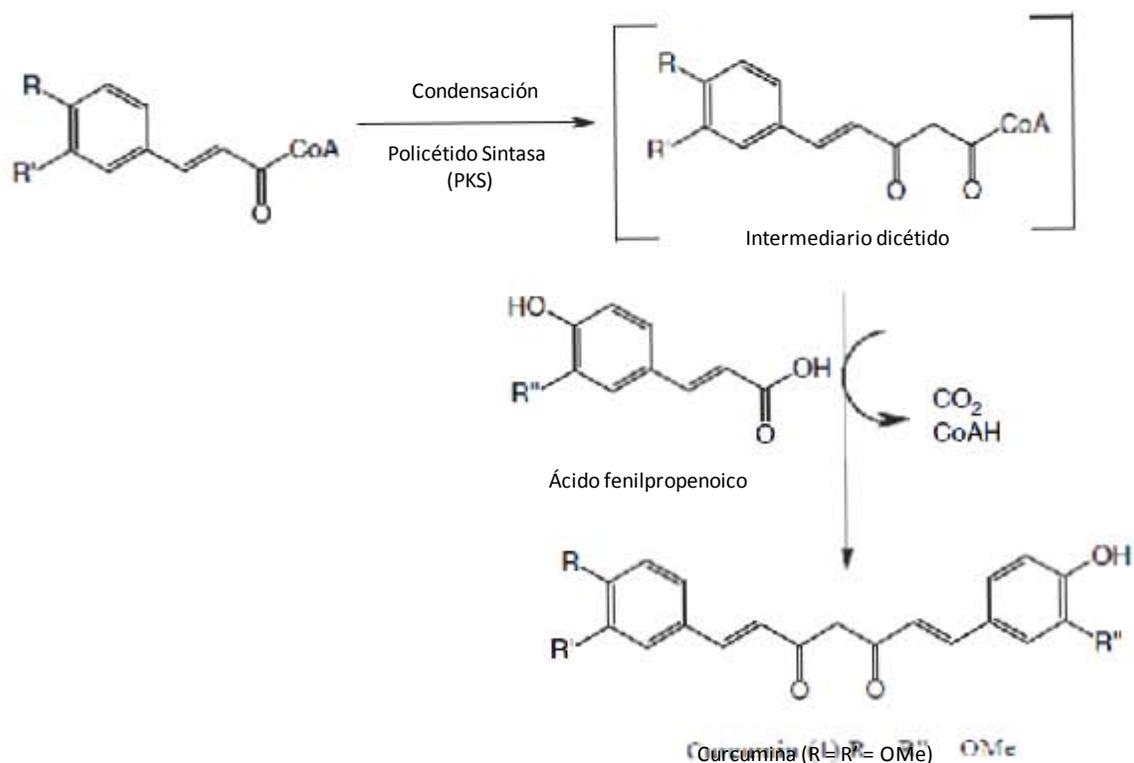
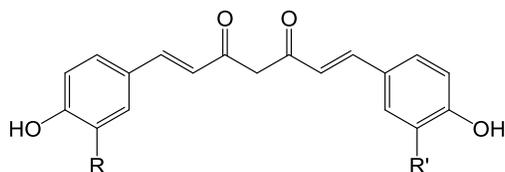
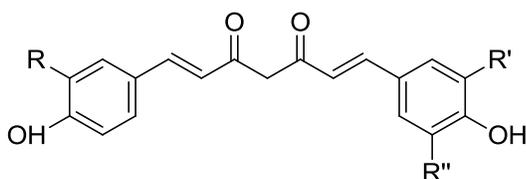


Figura 3. Biosíntesis de curcuminoides (Ravindran, *et al.*, 2007).

La curcumina (CUR), desmetoxicurcumina (DMC) y bis-desmetoxicurcumina (BDMC) (Figura 4) son curcuminoides que se encuentran distribuidos en gran número de especies. La ciclación de la cadena de siete carbonos forma la ciclocurcumina y sólo ha sido encontrada en la especie *C. longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

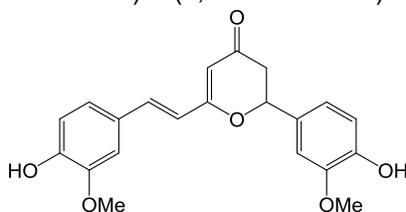


Curcumina: R = R' = OMe
 Desmetoxicurcumina: R = OMe; R' = H
 Bis-desmetoxicurcumina: R = R' = H

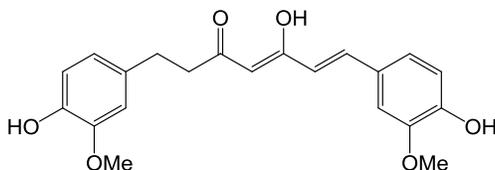


R = OMe; R' = OH; R'' = H

(1*E*,6*E*)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-(3,4-dihidroxiifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona



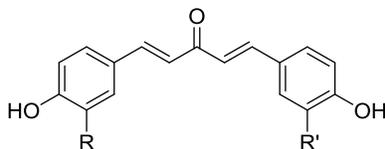
Ciclocurcumina



Dihidrocurcumina

Figura 4. Curcuminoides principales del tipo difenilheptanoides de la especie *Curcuma longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

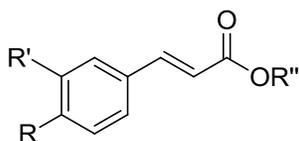
Además de los difenilheptanoides, se han aislado sólo dos compuestos con estructura de difenilpentanoides de *C. longa*, los cuales poseen una cadena hidrocarbonada de cinco miembros entre los dos anillos fenólicos (Figura 5).



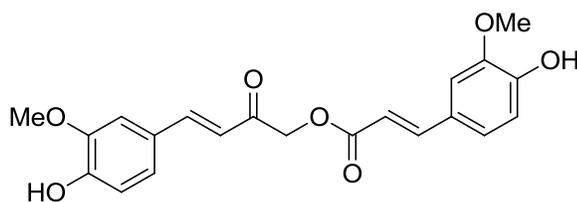
(1*E*, 4*E*)-1,5-Bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona: R = R' = OMe
 (1*E*, 4*E*)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-(4-hidroxifenil)-1,4-pentadien-3-ona: R = H; R' = OMe

Figura 5. Curcuminoides principales del tipo difenilpentanoides de la especie *Curcuma longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

Dentro de esta misma especie se han encontrado derivados del ácido cinámico, así como gran variedad de monoterpenos y sesquiterpenos (Figuras 6, 7, 8, 9 y 10).



Ácido cafeico: R = R' = OH; R'' = H
 Ácido cinámico: R = R' = R'' = H
 Ácido *p*-coumarico: R = OH; R' = R'' = H



Calebina A

Figura 6. Derivados del ácido cinámico aislados de *C. longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

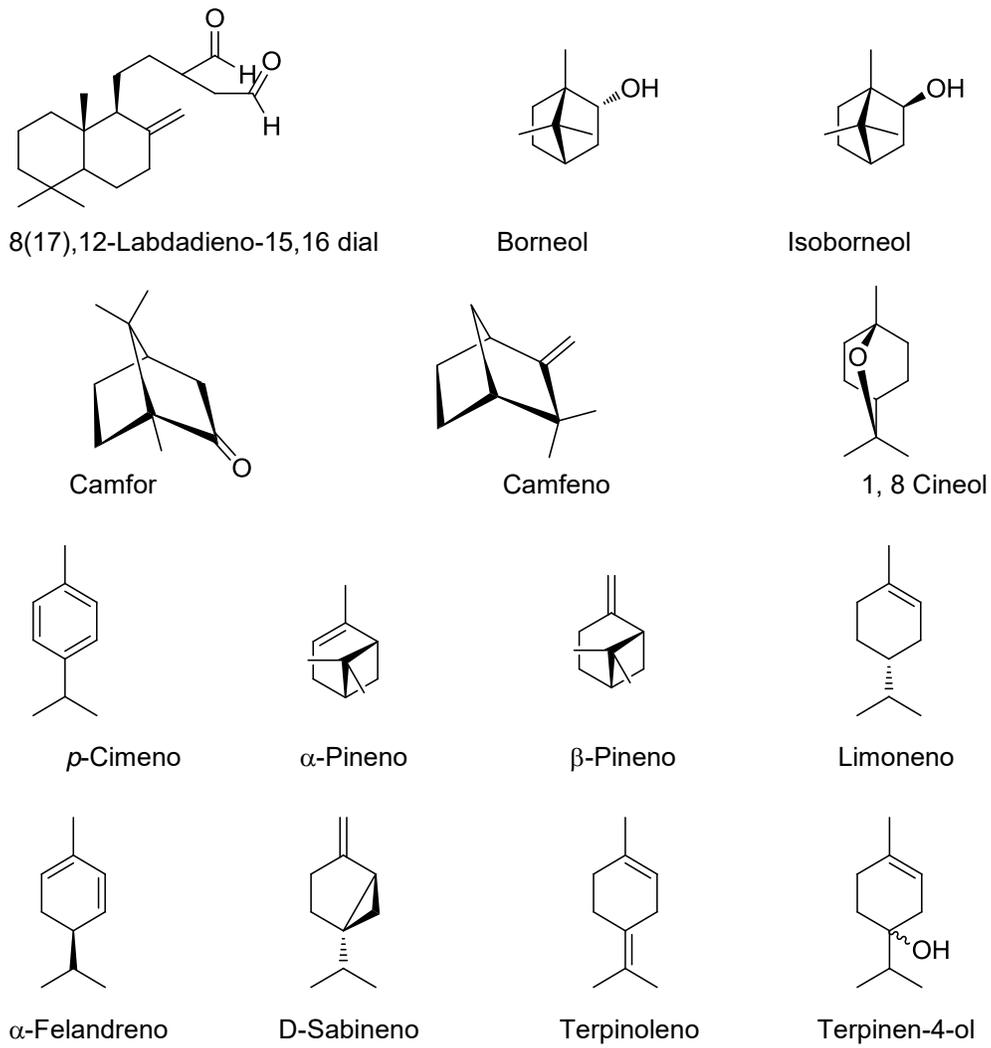


Figura 7. Monoterpenos principales aislados de *C. longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

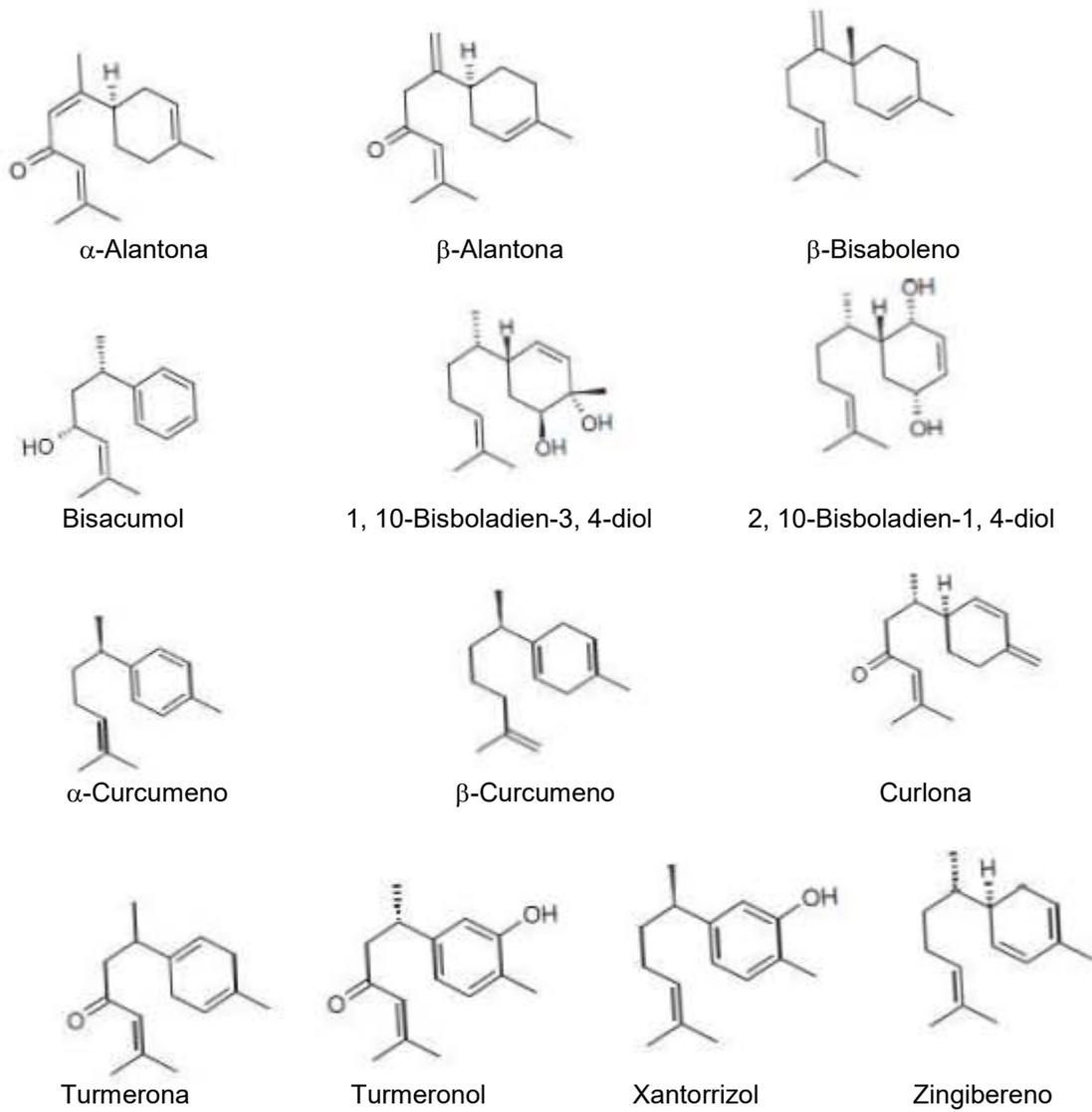


Figura 8. Sesquiterpenos tipo bisabolano aislados de *C. longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

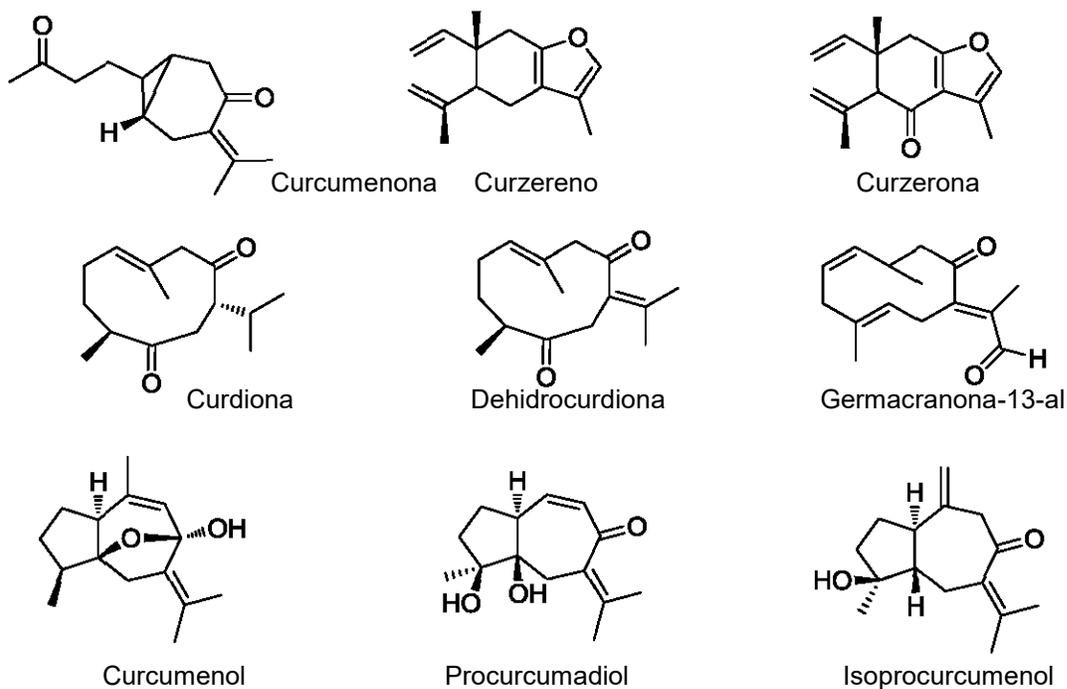


Figura 9. Sesquiterpenos tipo curcumano, elemano, germacrano y guayano aislados de *C. longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

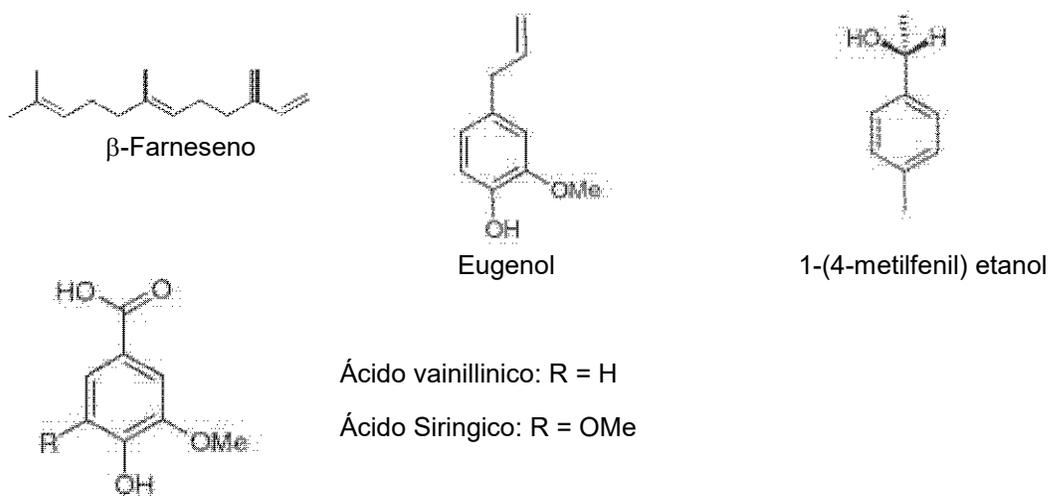


Figura 10. Compuestos misceláneos aislados de *C. longa* (Ravindran, *et al.*, 2007).

1.3. Estudios sobre la bioactividad de los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina).

La curcumina (77%) es el componente principal del rizoma de esta planta junto con la desmetoxicurcumina (17%) y bis-desmetoxicurcumina, a los cuales se les ha atribuido las propiedades antiinflamatorias de la planta (Epstein, *et al.*, 2010). A la curcumina también se le ha encontrado un efecto sobre la inhibición del crecimiento celular y anticancerígeno (el mecanismo de acción se encuentra relacionado con su efecto antiinflamatorio) (Jurenka, 2009; Epstein, *et al.*, 2010).

Con base en estudios en animales y cultivos celulares, se ha observado que la curcumina posee potencial terapéutico en enfermedades como colon irritable, úlcera péptica, pancreatitis, artritis y uveítis crónica. Sin embargo, la curcumina posee una depuración plasmática rápida y una baja absorción por vía oral, debido a lo cual sus efectos sistémicos y sus aplicaciones son limitados, aun así, esto no excluye su acción local en el sistema gastrointestinal (Ammon&Wahl, 1990; Jurenka, 2009).

En el Cuadro 3 se muestran algunos estudios sobre la bioactividad de los curcuminoides y su mecanismo de acción.

Referencia (Autor(es), año)	Bioactividad encontrada	Mecanismo de acción	Modelo utilizado	Extracto o compuesto evaluado
(Shang, <i>et al.</i> , 2010)	Antioxidante	Eliminación de los radicales libres (relación estructura-actividad)	Cultivo celular (sangre humana)	Curcumina
(Lin, <i>et al.</i> , 2000)	Anticarcinogenico Antiinflamatoria	-Inhibidor de COX/Lipoxigenasa, Xantina-deshidrogenasa/ oxidasa, iNOS -Inhibe PKC, Receptor tirosin-cinasa EGF, I κ B cinasa -Inhibe NF κ B y la expresión de c-jun, c-fos, c-myc y iNOS	Cultivos celulares. Modelo tumoral en epidermis de ratón.	Curcumina
(Sandur, <i>et al.</i> , 2007)	Antioxidante Inhibición de la proliferación celular	-Supresión de TNF-inducido por NF κ B (sugiere actividad de los grupos metoxilo en los anillos fenólicos) -No se encontró relación con niveles de ROS	Cultivos celulares	Curcumina, bis-desmetoxicurcumina, desmetoxicurcumina, tetrahidrocurcumina
(Midudhula&Mundra, 2010)	Antioxidante	-Oxidación de la curcumina por radical sulfato (mecanismo molecular propuesto)	Medio acetoneitrilo:agua	Curcumina
(Kim, <i>et al.</i> , 2007)	Antiinflamación	-Bloquea la activación de TNF- α y N κ B -Modula STAT 3, p38 y JNK en células endoteliales	Cultivo celular	Curcumina
(De Paz-Campos, <i>et al.</i> , 2012)	Antinocicepción	-Involucra la participación de los canales de K dependientes de ATP	Modelo de Formalina en Ratas	Curcumina
(Davis & Ross, 2008)	Inhibición de la proliferación celular	-Modulación de la expresión de los miRNAs	Microarreglos	Curcumina
(Díaz-Triste, <i>et al.</i> , 2014)	Gastroprotección	-Activación de la vía NO/cGMP/KATP, incrementando los niveles de óxido nítrico.	Modelo de daño gástrico con indometacina Medición de niveles de NO <i>in vitro</i>	Curcumina

Cuadro 3: Estudios sobre la bioactividad de los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina)

Los extractos de varias especies de *Curcuma* han mostrado un efecto gastroprotector en modelos de úlcera inducida en ratas. Estos extractos favorecen la recuperación de la estructura de la mucosa gástrica dañada, disminuyendo la producción de ácido y favoreciendo la expresión de enzimas como la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y la superóxidodismutasa (Kim, *et al*, 2005; Rahim, *et. al.*, 2014; Rouhollahi, *et al.*, 2014).

Se ha propuesto que tanto la curcumina como los demás curcuminoides son los metabolitos activos de la planta en el tratamiento de la úlcera gástrica y duodenal (Jurenka, 2009; Thavorn, *et al.*, 2014). Recientemente se ha encontrado que la curcumina posee un efecto antimicrobiano *in vivo* contra *Helicobacter pylori* (una de las principales causas del desarrollo de la úlcera péptica); dentro de los resultados del estudio destaca el hecho de que esta bacteria fue erradicada en los ratones infectados, así como sus heridas se mostraron totalmente recuperadas. Este hecho provee una prueba de la eficacia de la curcumina en el tratamiento de úlcera péptica inducida por *H. pylori*, así como una alternativa terapéutica (De, *et al.*, 2009).

También se ha observado que la curcumina acelera el proceso de recuperación de la úlcera gástrica inducida con indometacina por restitución de las fibras de colágeno y estimulación de la angiogénesis (Sharma, *et al.*, 2012).

Además de la curcumina se ha demostrado que los otros curcuminoides poseen actividad gastroprotectora. El efecto de la bis-desmetoxicurcumina se comparó con el de la curcumina para validar su aplicación clínica como remedio popular para la úlcera péptica, mostrando que la bis-desmetoxicurcumina inhibe la producción de la Óxido Nítrico-sintasa inducible (iNOS) sin alterar las cantidades de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en líneas celulares de macrófagos de ratón, mientras que la curcumina inhibe con mayor potencia la producción de iNOS, así como de TNF- α . Además, ambos curcuminoides poseen una potencia similar en la eliminación de óxido nítrico generado. En la administración intraduodenal, la bis-desmetoxicurcumina mostró una inhibición de la secreción gástrica mayor que la curcumina. La bis-desmetoxicurcumina también mostró una eficacia curativa y regenerativa de la úlcera inducida similar a la curcumina (Mahattanadul, *et al.*, 2009).

En el Cuadro 4 se muestran algunos estudios sobre la actividad gastroprotectora y algunos efectos encontrados sobre el sistema gastrointestinal de la curcumina y los curcuminoides, así como su mecanismo de acción.

Referencia (Autor(es), año)	Efecto encontrado	Modelo utilizado	Mecanismo de acción reportado	Extracto o compuesto evaluado
(Tourkey& Karolin, 2009)	Protección durante fase crónica ulcerosa	Ayuno por 3 días. Ratas.	-Disminución de la hiper-secreción ácida, peróxidos, mielo-peroxidasa, IL-6 e incidencia apoptótica.	Curcumina
(De, <i>et al.</i> 2009)	Inhibición del crecimiento de <i>H. pylori</i>	Cultivos <i>in vitro</i> Ratones infectados	-Inhibidor no competitivo de la shikimato-deshidrogenasa	Curcumina
(Ukil, <i>et al.</i> , 2009)	Disminución del daño en mucosa por colitis	Colitis inducida por ácido trinitrobenzen-sulfónico. (Modelo para IBD) Ratones.	-Disminuye la infiltración de neutrófilos (disminuye actividad de mielo-peroxidasa) y peroxidación lipídica (disminuye la actividad del malonaldehído), así como la actividad de la serin-proteasa. -Disminuye niveles de NO y peróxido	Curcumina
(Sharma, <i>et al.</i> , 2012)	Antiulcerosa Angiogénesis Restitución de las fibras de colágeno	Ulceración por Indometacina	-Induce colagenización y angiogénesis activando la vía MMP-2 (matriz metaloproteinas-2), VEGF y transformando los niveles de (TGF- β) y mRNA	Curcumina
(Swarnakar, <i>et al.</i> , 2005)	Antiulcerosa y cicatrizante	Ulceración por Indometacina Ratas	-Regulación de la MMP-2 y 9 -Previene el agotamiento de glutatión, la peroxidación lipídica y la oxidación proteínica	Curcumina
(Camacho-Baquero, <i>et al.</i> , 2007)	Disminución de la Colitis	Colitis crónica ulcerosa (ácido trinitrobenzen-sulfónico) Ratas	-Disminuye actividad de la mielo-peroxidasa (MPO) y TNF- α -Induce la regulación de la expresión de COX-2 e iNOS -Reduce la activación de la MAPK p38 -No cambia la actividad de la JNK	Curcumina
(Thompson & Ernst, 2002)	Carminativo Mejora la digestión Antiespasmódico	Review	-Incrementa la formación de bilis y secreción, provoca contracción de la vesícula biliar	Aceite esencial Curcumina

Cuadro 4: Estudios sobre los efectos en el sistema digestivo y gastroprotectores de los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina).

Referencia (Autor(es), año)	Efecto encontrado	Modelo utilizado	Mecanismo de acción reportado	Extracto o compuesto evaluado
(Martelli, <i>et al.</i> , 2007)	Disminución de la colitis	Colitis crónica ulcerosa (ácido trinitrobencen-sulfónico) (Ratones)	-Agonismo de los receptores vainilloides TRPV1	Curcumina
(Mahattanadul, <i>et al.</i> , 2009)	Antiulceroso	Úlcera crónica con ácido acético	-La bis-desmetoxicurcumina inhibe iNOS en macrófagos de ratón, sin mostrar efecto sobre TNF- α , mientras que la curcumina actúa sobre los dos -Ambos curcuminoides recogen el NO producido -Bis-desmetoxicurcumina disminuye la excreción de ácido gástrico	Curcumina Bis-desmetoxicurcumina
(Chattopadhyay, <i>et al.</i> , 2006)	Antioxidante	Úlcera gástrica por indometacina Ratas	-Remueve las especies H ₂ O ₂ , ·OH -Previene la inactivación de la peroxidasa por indometacina	Curcumina
(Kim, <i>et al.</i> , 2005)	Antiulceroso	Piloro-ligado (Rata y cultivos celulares)	-Bloqueo de los receptores de histamina H ₂ (extracto de acetato de etilo y etanol) -Curcumina no inhibe los receptores H ₂	Extracto acetato de etilo, n-butanol, etanol y agua de <i>C. longa</i> Curcumina
(Rahim, <i>et al.</i> , 2014)	Antiulceroso	Úlcera gástrica inducida con etanol (Ratas)	-Incremento de la secreción de moco, Prostaglandina E2 y superóxido-dismutasa -Disminución de malonilaldehído	Extracto etanólico de las hojas de <i>Curcumaxanthorrhiza</i>
(Rouhollahi, <i>et al.</i> , 2014)	Antiulceroso	Úlcera gástrica inducida con etanol (Ratas)	-Aumento de la mucosa gástrica y disminución de la secreción de ácido -Elevación de la actividad de la superóxido-dismutasa y el NO -Disminución del nivel de malonaldehído -La inmuno-histoquímica reveló una regulación a la baja de la proteína Bax y una regulación a la alta de la proteína Hsp70	Extracto hexánico de <i>Curcumapurpurascens</i>

Cuadro 4 (continuación): Estudios sobre los efectos en el sistema digestivo y gastroprotectores de los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina).

1.4. Mecanismo de acción molecular de la curcumina.

La mayoría de los efectos de los curcuminoides se encuentran relacionados con su actividad antiinflamatoria y antioxidante (Figura 11). Este grupo de compuestos posee una base estructural similar (difenilheptanoides) con características físicas y químicas en común. Los anillos fenólicos se encuentran sustituidos por diferentes grupos dando lugar a una gran variedad de curcuminoides (Ravindran, *et al.*, 2007; Hatcher, *et al.*, 2008; Epstein, *et al.*, 2010).

No se ha encontrado una correlación explícita entre la curcumina y sus análogos con sus efectos biológicos. La eficacia de los curcuminoides varía dependiendo del tipo celular, función, sistema y organismo utilizado en el modelo de estudio. En algunos casos se ha propuesto un efecto sinergista entre la mezcla de estos compuestos, ya que individualmente ninguno alcanza una potencia máxima (Epstein, *et al.*, 2010).

La seguridad y tolerabilidad de la curcumina ha sido bien establecida, ya que dosis orales por encima de 12 g/día no muestran toxicidad en humanos. Sin embargo, la biodisponibilidad de la curcumina por vía oral es baja, acompañado de una absorción intestinal baja, eliminación rápida y una baja solubilidad en el medio acuoso (Ammon & Wahl, 1990). Su eliminación consiste principalmente en derivados glucuronidados y sulfatados por la vía hepática (Epstein, *et al.*, 2010). Uno de los principales metabolitos estudiados es la tetrahidrocurcumina, el cual carece de la hidrofobicidad característica de la curcumina, éste compuesto no aparece de forma natural en las especies de *Curcuma* y posee un efecto antiinflamatorio menor que la curcumina en términos de inhibición del Factor Nuclear κ -B (NF κ B), sin embargo, presenta una potencia antioxidante mayor (Sandur, *et al.*, 2007; Epstein, *et al.*, 2010).

Después de la ingesta oral, algunos investigadores reportan que las concentraciones en suero son indetectables en dosis menores a 4 g, sin embargo, algunos conjugados del metabolismo de la curcumina han sido detectados en plasma en concentraciones mayores a la curcumina (Vareed, *et al.*, 2008). Algunos otros estudios demuestran la presencia de curcumina en el tejido colorrectal a dosis orales de 3-6 g, por lo que se sugiere que el tracto gastrointestinal es un blanco terapéutico importante (Epstein, *et al.*, 2010).

En cuanto al mecanismo de acción, se ha encontrado que el NFκ-B es uno de los principales blancos modulados por curcumina, sin embargo existen muchos otros factores y moléculas de señalización que responden a este compuesto (Cuadro 5).

Actividad Biológica	Blanco molecular	Línea celular utilizada en el estudio
<i>Antiinflamación</i>	↓ NFκB	Leucemia mieloide, linfoma B No-Hodgkin (BNHL), riñón embrional, macrófagos de ratón
	↓ COX-2	Endotelio microvascular intestinal, epitelio de colon, microglia, macrófagos de ratón
	↓ IL-1β, IL-6, IL-8	Epitelio esofágico, cáncer de cuello y cabeza, macrófagos de ratón
	↓ TNF-α	Macrófagos de ratón
	↓ Molécula de adhesión intercelular-1	Endotelio del hibridoma de la vena epitelial umbilical (HUEVC)
<i>Antioxidante</i>	↓ p300 acetil-transferasa	Músculo liso de tráquea, cáncer cervical, linfoma de linfoblastos T, linfoma de Burkkit
	↑ PPARγ	Cáncer de colon, células estrelladas hepáticas de rata
	↓ NO sintasa	Macrófagos de ratón
	↑ Glutación	Linfocitos
	↑ Hem oxigenasa-1	Hibridoma HUEVC, epitelio renal porcino
	↑ Superóxidodismutasa	Linfocitos
<i>Pro-apoptótica</i>	↓ Especies reactivas de oxígeno	Leucemia promielocítica
	↓ Bcl-2	BNHL, cáncer de colon
	↓Survivin	Cáncer de colon
	↓Akt	Leucemia T
	↓ c-myc	BNHL
	↓Ornitinadescarboxilasa	PML
	↑ Bax	Cáncer de colon
	↑ Caspasas	PLM, cáncer de colon
	↑ c-Jun, N-terminal cinasa	Linfocitos T (↓), cáncer de seno (↓), HEK (↓), cáncer de colon (↑)

Cuadro 5. Blancos moleculares de la curcumina en estudios celulares (Epstein, *et al.*, 2010).

Actividad Biológica	Blanco molecular	Línea celular utilizada en el estudio
Anticáncer	↓ Ciclina D1	Cáncer de colon
	↓ Matriz metalo-proteinasa	HUEVC, melanoma, fibrosarcoma, cáncer de seno, mononucleocitos sanguíneos, epitelio intestinal
	↓ Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)	Carcinoma hepatocelular
	↓ Traductor de Señal y Activador de la Transcripción (STAT)	Mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin
	↓ Factor inducible a hipoxia-1 α	Carcinoma hepatocelular
	↓ Proteín-cinasa C (PKC)	Fibroblastos embrionales de ratón
	↓ Factor de Crecimiento de Respuesta Temprana (egr-1)	BNHL, HUEVC, fibroblastos de pulmón
	↓ Proteína Activadora-1	HEK, microglia
	↑ p38, Proteín-cinasa Activada por Mitógeno (MAPK) ↓ p53	Endotelio microvascular intestinal (↓), neutrófilos (↑) BNHL (↓), cáncer de colon (↓), timocitos (↓), leucemia mieloide (↓), cáncer de seno (↑)

Cuadro 5 (continuación). Blancos moleculares de la curcumina en estudios celulares (Epstein, *et al.*, 2010).

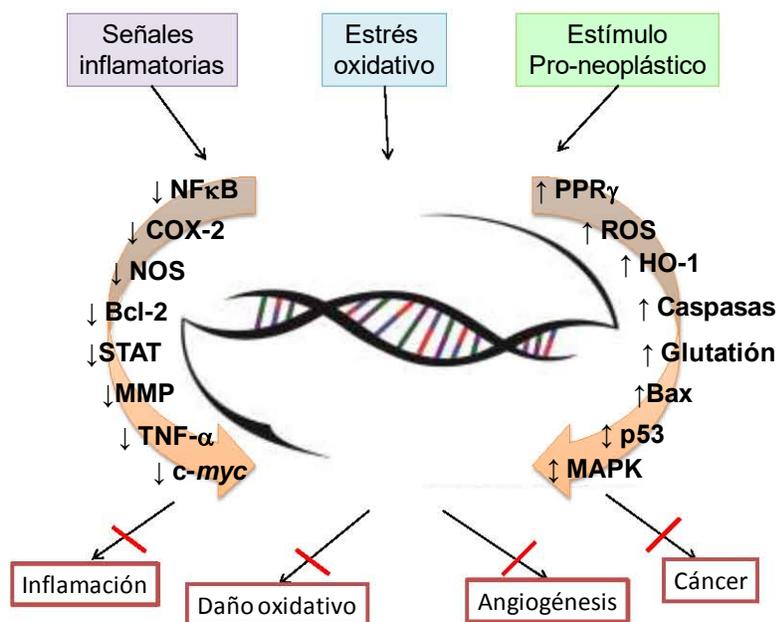


Figura 11. Mecanismos moleculares de acción de la curcumina y efectos celulares (Epstein, *et al.*, 2010).

1.5. Relación entre estructura y actividad antioxidante de la curcumina y sus análogos.

Se ha descrito como el principal mecanismo de acción de la curcumina y los curcuminoides la eliminación de radicales libres, que inducen carcinogénesis y procesos bioquímicos involucrados en la respuesta inflamatoria. Se han realizado varios estudios para determinar el sitio más reactivo de la molécula con los radicales libres (Barzegar, 2012). Es importante tener presente que la estructura molecular de la curcumina exhibe un equilibrio ceto-enol en solución (Figura 12).

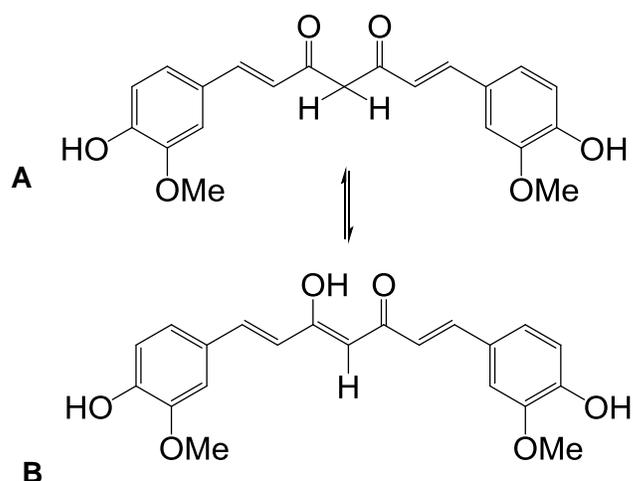


Figura 12. Estructuras en equilibrio de la curcumina:
A) Dicetonacurcumina, B) Ceto-enolcurcumina (Barzegar, 2012).

Debido a que la curcumina y los curcuminoides poseen una estructura con varios dobles enlaces conjugados, presentan varios sitios de estabilización del radical dependiendo de la forma dicetona o ceto-enol (Figuras 13 y 14).

Se ha reportado que la eficiencia para inhibir la peroxidación lipídica varía de 82% en la curcumina a 24% en la desmetoxicurcumina, por lo que, se ha sugerido que el grupo $-OH$ en los anillos fenólicos es esencial para la actividad antioxidante y la eliminación de radicales libres. En algunos estudios se han reportado energías similares para remover los hidrógenos tanto de los grupos $-OH$ fenólicos como del $-CH_2$ de la estructura

dicetona, sin embargo los grupos -OH fenólicos son más lábiles (Priyadarsiniet *al.*, 2003; Barzegar, 2012).

La curcumina es capaz de perder ambos hidrógenos de los grupos -OH fenólicos consecutivamente, lo que aumenta su capacidad de reducir dos moléculas de radicales libres. Sin embargo, la pérdida de un hidrógeno en el -CH_2 central de la dicetona dificulta la pérdida de otro hidrógeno en la molécula. En el caso de radicales peroxilados ($\text{ROO}\cdot$) éstos reaccionan fácilmente con los -OH fenólicos, por lo que se ha determinado que éstos grupos funcionales son importantes para la actividad reductora de radicales libres que tiene la molécula (Barzegar, 2012).

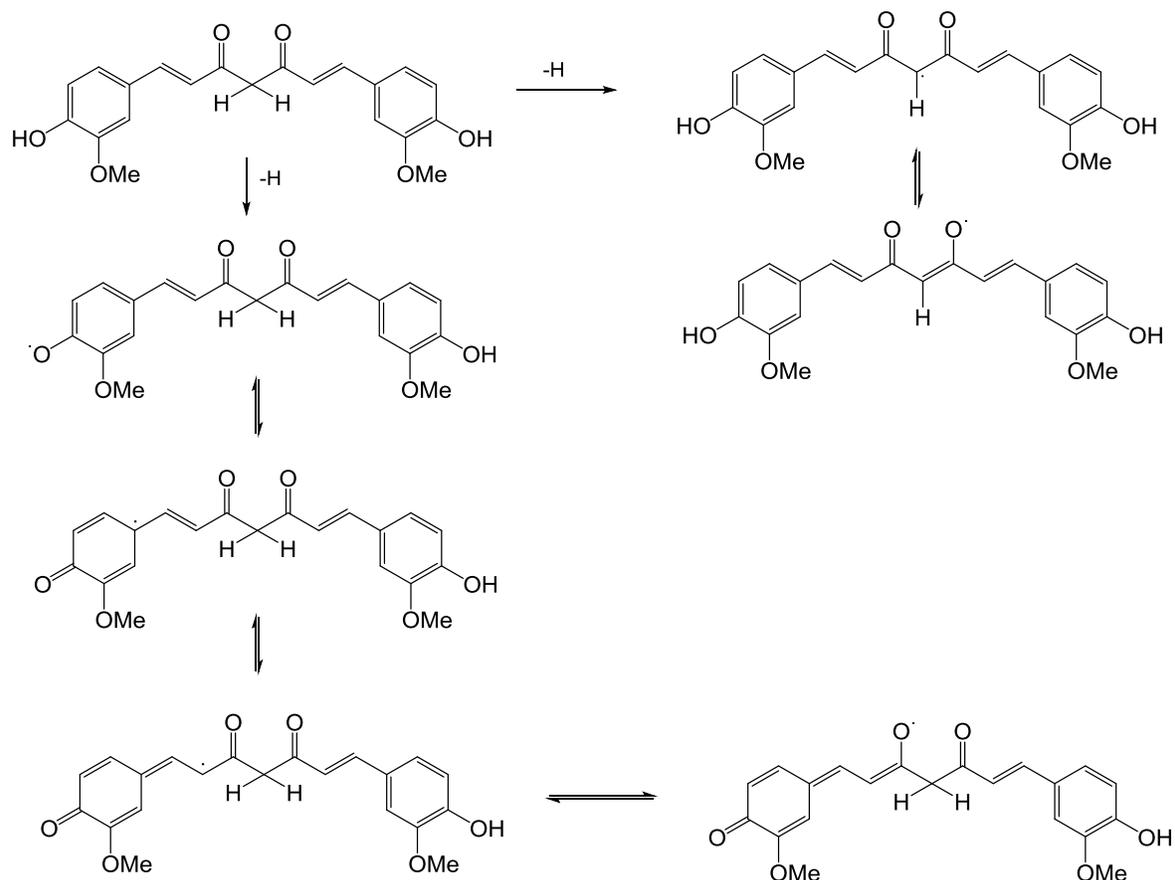


Figura 13. Estructuras resonantes estabilizantes del radical curcumina en la forma dicetona.

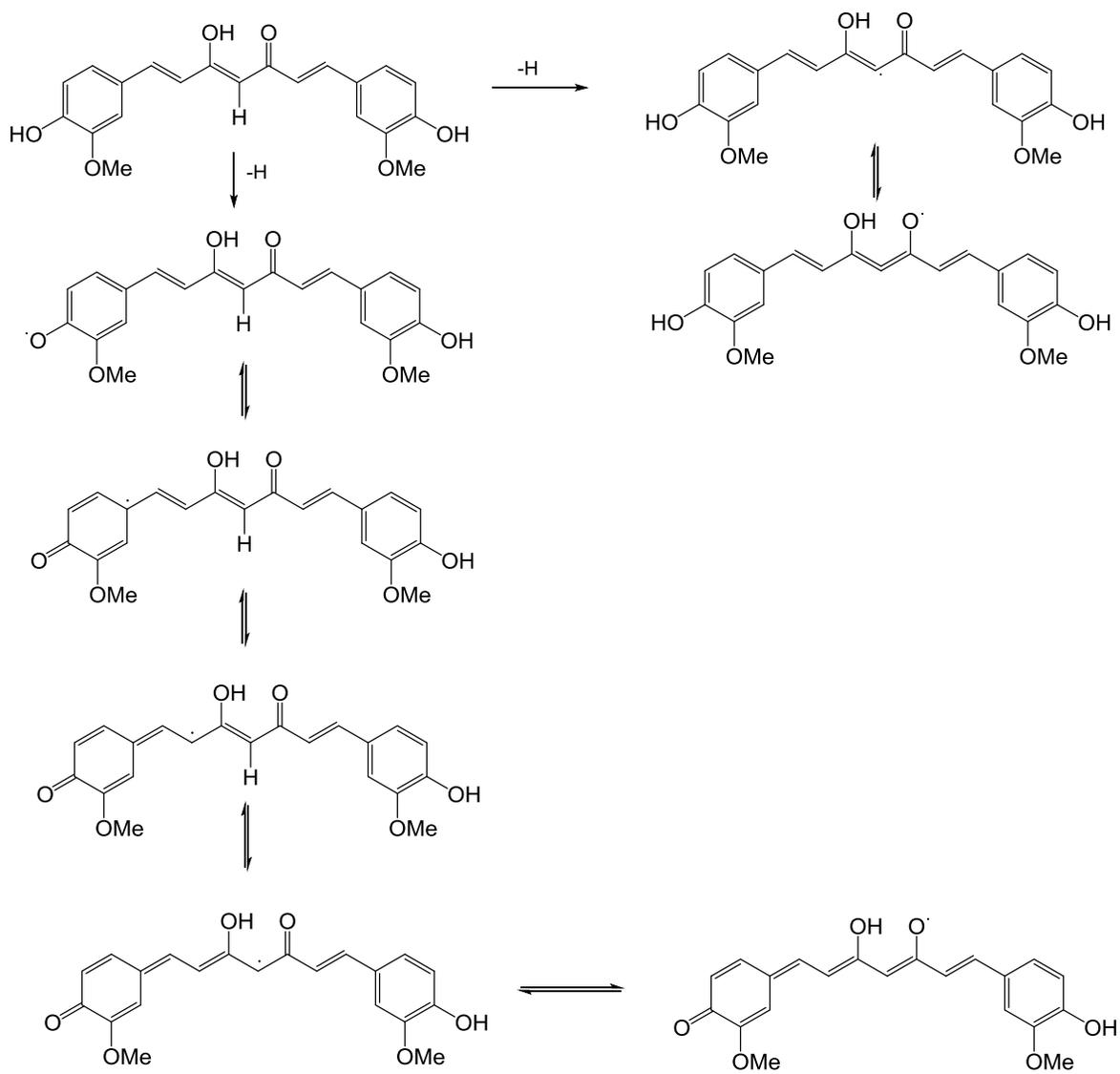


Figura 14. Estructuras resonantes estabilizantes del radical curcumina en la forma ceto-enol.

La forma ceto-enol de la curcumina es más estable que la forma dicetona, lo que favorece encontrar esta forma estructural en solución. La forma ceto-enol es perfectamente planar y permite la resonancia con ambos anillos bencénicos. En un estudio realizado por Shen y Ji en el 2007, se sugiere que el -OH del grupo enol es el hidrógeno más lábil (pK_a 8.38-8.54), siguiendo la desprotonación de la molécula con los -OH de los anillos fenólicos (pK_a 9.30-9.88 y pK_a 10.51-10.69).

Existe una gran variedad de curcuminoides con diferentes efectos y capacidad antioxidante. Shang y colaboradores en el 2010, compararon la capacidad antioxidante y para neutralizar radicales libres de la curcumina y estructuras análogas. Se encontró que los grupos hidroxilo y metoxilo en posición *orto* al 4-hidroxilo de los anillos bencénicos favorecen la neutralización de radicales libres, en cambio para los difenilpentanoides y aquellas estructuras con un anillo en la cadena hidrocarbonada, su actividad se ve disminuida. Sin embargo, la introducción de un anillo en la cadena de los compuestos evaluados, evita principalmente la hemólisis por peroxidación. La actividad de la bis-desmetoxicurcumina para neutralizar radicales libres fue significativamente baja (CI50 > 300 μ M), comparada con la curcumina (CI50= 29.9 μ M).

El estudio también revela que las estructuras con mayor actividad antihemolítica, antioxidante y neutralizadora de radicales libres son aquellas que poseen grupos *orto*-hidroxifenoxilo, ya que son más estables debido a su interacción intramolecular. Otras moléculas con grupos hidroxilo adyacentes en el anillo bencénico poseen una importante actividad antioxidante, como los flavonoles y los análogos del resveratrol (Shang, *et al.*, 2010).

1.6. Anatomía y fisiología del estómago.

El estómago se encuentra en la parte superior de la cavidad abdominal, es un ensanchamiento del tubo gástrico mide de 8-11 cm de diámetro. El jugo gástrico del estómago (2.5 L/día) favorece la descomposición de los alimentos y la liberación de algunos fármacos. El estómago se une con la porción inferior del esófago mediante el esfínter cardias, el cual impide el paso del ácido estomacal hacia la parte superior del tubo gástrico, en la parte inferior se conecta con el duodeno por el esfínter pilórico, el cual regula el vaciamiento hacia el intestino.

Este órgano se divide en tres partes principales, la parte superior llamada fondo, la porción media llamada cuerpo que es la porción mayor de forma alargada, de ahí prosigue el antro que se une con la porción pilórica terminando en el esfínter pilórico (Figura 15).

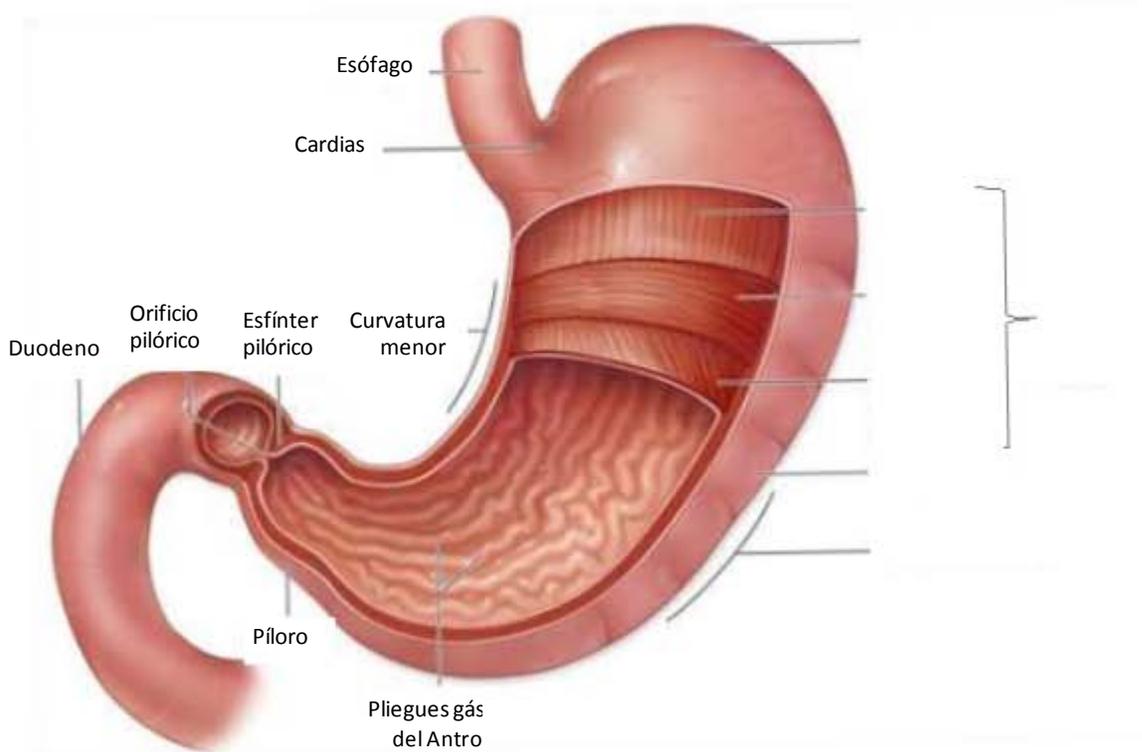


Figura 15: Anatomía y descripción gráfica de las partes del estómago.

El epitelio del estómago es de tipo columnar en todas las porciones, el cual secreta el jugo gástrico que se compone en su mayoría por ácido clorhídrico (HCl) liberado por las células oxínticas (células parietales), además de proenzimas como la prorenina y el pepsinógeno, elaboradas por las células pépticas. Además, las células del epitelio secretan un moco que las cubre y protege del daño que les pudiera ocasionar el medio en que se encuentran.

Sobre la superficie de la mucosa se observan poros que corresponden con una glándula gástrica. La organización celular de dichas glándulas permite la comunicación entre diferentes tipos celulares, así como la regulación de la excreción de los componentes del jugo gástrico, principalmente del ácido clorhídrico.

En la Figura 16 se muestran los diferentes tipos celulares y su función dentro de la glándula gástrica, así como la organización de la pared estomacal.

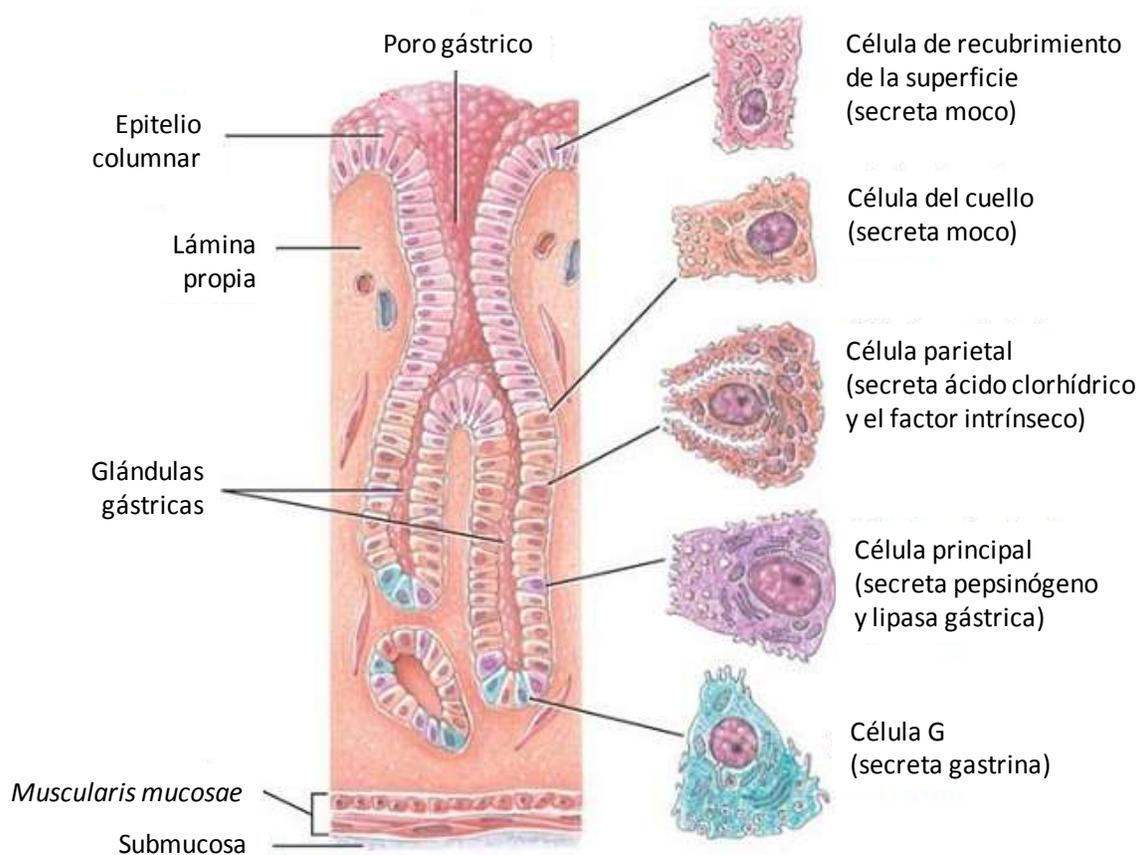


Figura 16. Organización de la pared estomacal y glándula gástrica.

1.7. Fisiopatología de la úlcera péptica.

La úlcera péptica es uno de los padecimientos más comunes, se estima que afecta al 10% de la población mundial, alrededor de 19-20% son duodenales y las demás son gástricas (Vimala y Gricilda-Shoba, 2014). Este padecimiento es una de las tres principales causas de hemorragia del tubo digestivo. La perforación se presenta en 2 al 10% de las úlceras pépticas, la mortalidad reportada es alrededor de 10%, sin embargo, este porcentaje se eleva considerablemente en ancianos (30%) (Secretaría de Salud, 2009). A nivel mundial ocurren 15,000 defunciones al año por úlcera péptica (Vimala y Gricilda-Shoba, 2014).

Se define como úlcera a una herida abierta en la piel o membrana mucosa que se caracteriza por inflamación, muerte y pérdida de tejido superficial (Vimala y Gricilda-Shoba, 2014). Éstas pueden existir prácticamente en cualquier parte, sin embargo, aquellas que se encuentran en la cavidad estomacal y duodeno reciben el nombre de “úlceras pépticas”, la cual es una lesión en la mucosa gastrointestinal (estómago o duodeno) que se extiende más allá de *la muscularis mucosae* y que permanece como consecuencia de la actividad de la secreción ácida del jugo gástrico. Los principales factores de riesgo son la edad avanzada, el uso de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), presencia de *Helicobacter pylori*, el estrés, la genética, así como el consumo de alcohol y tabaco (Secretaría de Salud, 2009).

El uso de AINE's causan un número significativo de úlceras gástricas y duodenales debido a la inhibición de prostaglandinas junto con la pérdida de los efectos protectores de las mismas. Se ha observado que en ausencia de AINE's y gastrinoma, la principal causa de úlceras pépticas es la infección por *Helicobacter pylori* (Mertz y Walsh, 1991).

A pesar de que la fisiopatología de las úlceras gástricas y duodenales es similar, existen ciertas diferencias en ambos grupos. Las úlceras duodenales son características de la infección por *H. pylori* y duodenitis. En la mayoría de los casos se ha asociado a una secreción deficiente de bicarbonato en la superficie de la mucosa o a un incremento moderado de la secreción de ácido, resultando en daño tisular, inflamación y metaplasia gástrica, la lesión puede ser colonizada por *H. pylori* impidiendo los procesos de protección o regeneración de la mucosa, dando como resultado una ulceración. Por otra parte, las úlceras gástricas ocurren principalmente por deficiencias en los mecanismos

defensivos del tejido de la mucosa gástrica, además de la presencia de factores que intervienen en la inflamación y el incremento moderado de ácido y pepsina (Mertz y Walsh, 1991).

Anteriormente se creía que la hipersecreción de ácido gástrico era una de las principales causas de este padecimiento, sin embargo, los estudios han demostrado que no existe una correlación entre la secreción de ácido y el desarrollo o recurrencia de úlceras pépticas, al mismo tiempo que no se ha demostrado un incremento en la acidez del bulbo duodenal en pacientes con úlcera duodenal, por lo que se ha mostrado mayor interés en el estudio de los mecanismos de protección. La secreción de bicarbonato crea un gradiente de pH cercano a la neutralidad (pH 6-7) que protege las células epiteliales del ambiente ácido del lumen (pH 1-2). La regulación de la secreción de bicarbonato es un proceso complejo y es estimulada por ácido, prostaglandina E2 (PGE₂), óxido nítrico (NO), péptido vasoactivo intestinal (VIP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), y agentes protectores de la mucosa. Los agentes que inhiben la secreción de bicarbonato son atropina, antagonistas muscarínicos, agonistas adrenérgicos alfa, indometacina, ácidos biliares y consumo de tabaco. Además del moco y el bicarbonato, existen otros mecanismos de defensa como la superficie hidrofóbica y el rápido recambio celular (Højgaard, *et al.*, 1996).

El ácido gástrico facilita la conversión del pepsinógeno en pepsina (enzima proteolítica), también facilita la absorción de hierro, calcio, vitamina B₁₂ y ciertos fármacos. La acidez estomacal, junto con el pepsinógeno y lipasas son una barrera biológica contra bacterias, virus y priones causantes de diversas enfermedades (Chu y Schubert, 2013). Los principales factores que actúan sobre las células parietales (Figura 17) para estimular la secreción de ácido clorhídrico son: gastrina, acetilcolina, histamina y grelina, mientras que el principal inhibidor es la somatostatina (Chu y Schubert, 2013).

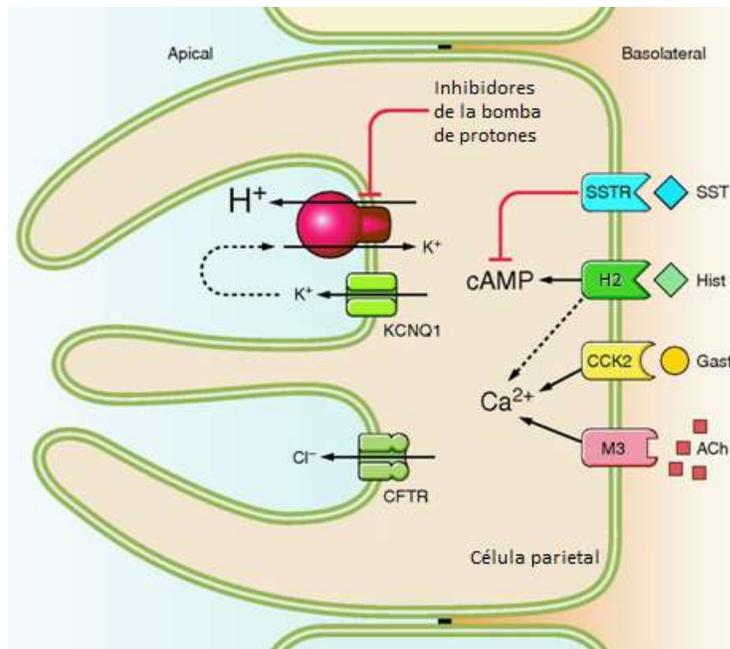


Figura 17: Principales factores que estimulan la secreción de ácido clorhídrico en una célula parietal: histamina (Hist), gastrina (Gast) y acetilcolina (ACh). La somatostatina (SST) es el inhibidor más importante al unirse a su receptor (SSTR). (H₂: receptor para histamina; CCK2: receptor para gastrina; M3: receptor para acetilcolina; CFTR: transportador de aniones Cl⁻; KCNQ1: canal de iones K⁺)

Helicobacter pylori puede inducir aumento o disminución de la secreción de HCl dependiendo del curso temporal y sitio de la infección. En el caso de la infección aguda y la infección crónica de la mucosa oxíntica (fondo y cuerpo del estómago) se produce hipoclorhidria, mientras que la infección crónica de la mucosa pilórica (antro) se encuentra asociada con hiperacidez (Chu y Schubert, 2013).

Uno de los modelos más comunes utilizado en ensayos preclínicos, es el daño gástrico inducido con etanol en roedores desarrollado por Robert y colaboradores en 1979. El mecanismo por el cual el etanol es un agente necrosante de la mucosa gástrica involucra la formación de especies reactivas de oxígeno, exfoliación de la superficie epitelial y daño microvascular (estásis vascular) (Tarnawski *et al.*, 1988; Kwiecień *et al.*, 2002).

1.8. Regulación neuroendócrina de la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales.

Histamina.

Las células enterocromafines similares (ECL) se encuentran cerca de las células parietales y secretan cantidades basales de histamina las cuales son incrementadas por la gastrina, grelina y la acetilcolina. Este tipo de células son las más abundantes en la mucosa oxíntica (65% en ratas y 30-50% en humanos). La histamina actúa sobre los receptores H₂ que se encuentran en las células parietales (Chu y Schubert, 2013), los cuales responden a concentraciones por debajo del umbral requerido para activar el receptor histamínico vascular (Figura 18).

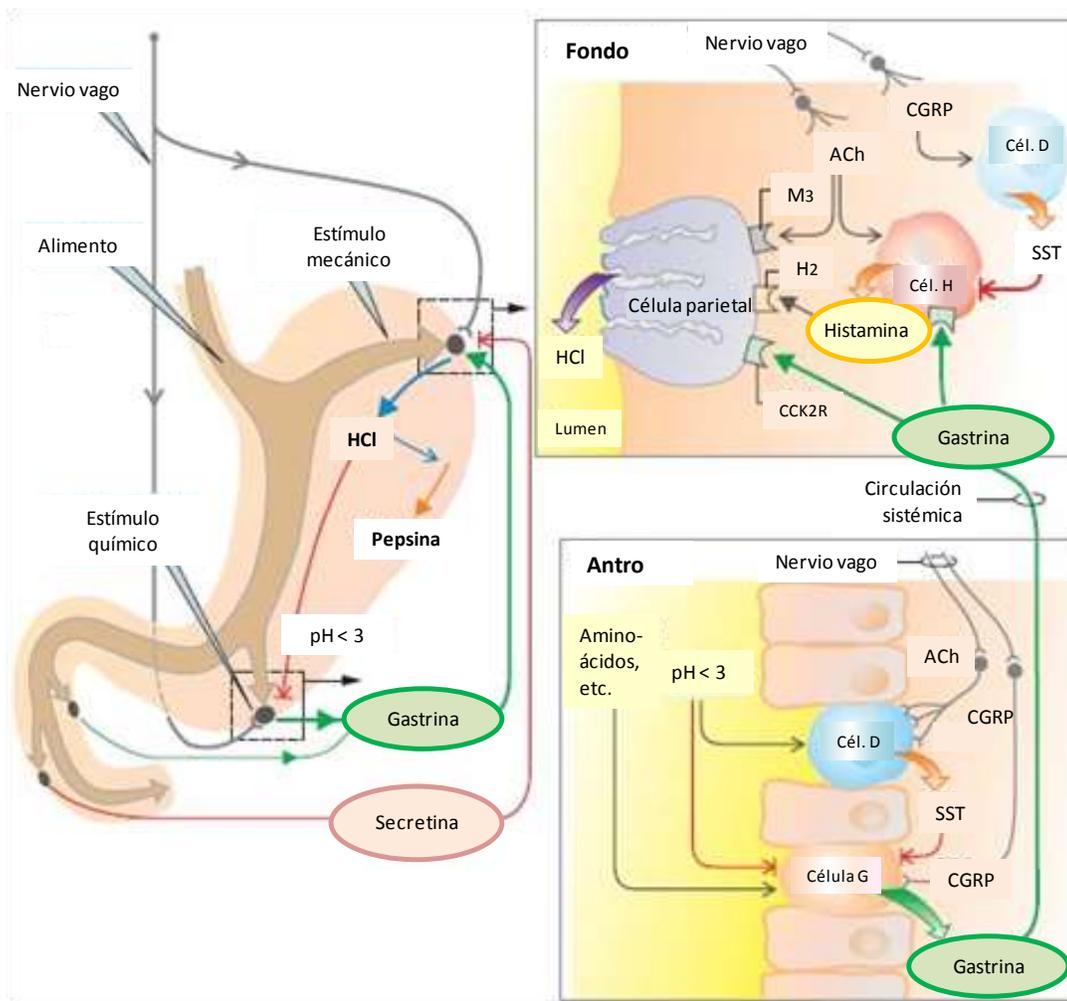


Figura 18. Regulación neuroendócrina de la secreción de ácido clorhídrico. (ACh: acetilcolina; CGRP: Péptido Relacionado con el Gen de Calcitonina; SST: somatostatina; M3: receptor para acetilcolina; H₂: receptor para histamina; CCK2R: receptor para gastrina).

La estimulación de la secreción ácida de las células parietales por histamina (Figura 17) involucra la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular y la activación de la Proteínacinasa dependiente de AMPc (PKA), lo que permite la liberación de protones al medio extracelular (Ding, *et al.*, 2008).

En las células parietales en reposo, la enzima que se encarga de la liberación de ácido al medio (H^+/K^+ ATPasa) se encuentra almacenada en compartimentos llamadas tubulovesículas (Figura 19), las cuales tienen una baja permeabilidad por iones K^+ . La estimulación de las células parietales provoca que las túbulovesículas se fusionen con la membrana apical y se exprese la H^+/K^+ ATPasa (Ding, *et al.*, 2008).

Las sustancias que inhiben la secreción de histamina incluyen prostaglandinas, el péptido YY, la galanina y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) (Chu y Schubert, 2013).

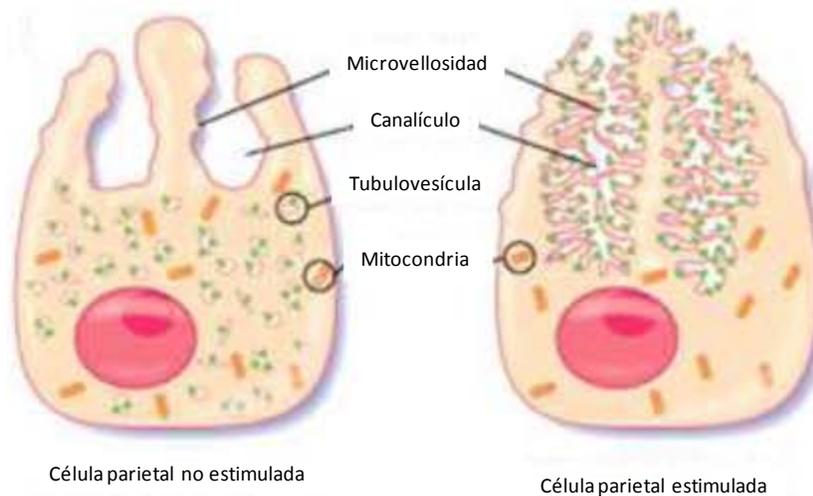


Figura 19: Esquema de una célula parietal no estimulada, mostrando las tubulovesículas y una célula parietal estimulada que presenta la bomba H^+/K^+ ATPasa en la superficie membranal.

Gastrina.

La gastrina es una hormona peptídica sintetizada en las células endócrinas de la mucosa del antro gástrico y duodeno, y se secreta dentro de la sangre portal por las células G (Figura 18). Los niveles de gastrina en ayuno se encuentran dentro del rango de 30-50 pmol/L, los cuales se incrementan en respuesta a alimentos como carnes, leche, aminoácidos y péptidos hasta 100-150 pmol/L (Chu y Schubert, 2013).

Su principal acción es la estimulación de la secreción del ácido gástrico. Los receptores para gastrina (CCK2R) se encuentran en la superficie de las células parietales y en las células ECL induciendo la liberación de histamina. La gastrina también favorece el crecimiento y la división celular (Chu y Schubert, 2013).

Existe una vía de auto-regulación local en el antro gástrico, ya que el ácido promueve la liberación de somatostatina, la cual inhibe la secreción de gastrina.

La hipergastrinemia provocada por inhibidores de la bomba de protones, gastrinoma y gastritis atrófica puede promover hiperplasia e hipertrofia en las células ECL, esta condición puede favorecer el desarrollo de cáncer gástrico. Es importante destacar que al reducir los niveles plasmáticos de gastrina a la normalidad o utilizar antagonistas de los receptores CCK2R, la hiperplasia e hipertrofia se detienen, e incluso se puede revertir (en algunos casos) el desarrollo de cáncer (Chu y Schubert, 2013).

El receptor CCK2R induce la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual juega un papel importante en la recuperación de las lesiones gástricas (Chueca, *et al.*, 2012).

Acetilcolina.

La acetilcolina (ACh) es secretada por las neuronas post-ganglionares del nervio vago y estimula los receptores muscarínicos M3 que se encuentran en la superficie de las células parietales y ECL, promoviendo la liberación de protones al medio gástrico (Figura 18). También estimula a los receptores M2 y M4 que inhiben la secreción de somatostatina (Chu y Schubert, 2013).

Grelina.

La grelina es liberada por las células Gr que se encuentran en la porción basal de las glándulas gástricas cercanas a las células ECL para facilitar la secreción de histamina inducida por grelina. Esta hormona también estimula la ingesta de alimento y el vaciamiento gástrico, por lo que sus concentraciones son altas durante el ayuno y disminuyen después de comer (Chu y Schubert, 2013).

La secreción de grelina está regulada a la alza por glucagón y norepinefrina, mientras que la infección por *H. pylori*, colesistoquinina, urocortina 1, glucosa, insulina, glutamina, somatostatina e interferón- γ disminuyen las concentraciones de la hormona (Chu y Schubert, 2013).

Somatostatina.

Es el principal inhibidor de la secreción de ácido, es liberada por las células D y células oxínticas, éstas últimas se encuentran anatómica y funcionalmente acopladas a las células ECL y parietales inhibiendo directamente sus secreciones. Las células D del antro están anatómica y funcionalmente acopladas a células G (Figura 18). El ácido gástrico aumenta los niveles de somatostatina, la cual inhibe la secreción de gastrina y grelina (Chu y Schubert, 2013).

La estimulación de las neuronas sensibles a CGRP (Péptido Relacionado con el Gen de Calcitonina) favorece la secreción de esta hormona. Se ha observado que la infección crónica por *H. pylori* disminuye la concentración de somatostatina en el antro y la infección aguda incrementa los niveles de la misma (Chu y Schubert, 2013).

Secretina.

Existe evidencia que la infección por *H. pylori* causa deficiencia de esta hormona, permitiendo el desarrollo de úlceras pépticas. La secretina es liberada por las células S de las criptas duodenales (Figura 18) en respuesta al ácido gástrico que entra en el duodeno, estimulando la producción de bicarbonato (Love, 2008).

1.9. Fármacos gastroprotectores y antiulcerosos.

Dentro de los fármacos más utilizados que se encuentran en la terapéutica para úlcera péptica encontramos las sustancias protectoras de la mucosa gástrica, los antagonistas de los receptores de histamina H₂ y los inhibidores de la bomba de protones, estos últimos enfocados en la disminución de la producción de ácido gástrico.

Sustancias protectoras de la mucosa gástrica.

Las propiedades protectoras de los compuestos de subcitrato de bismuto coloidal se conocen desde varias décadas atrás, el principal mecanismo de acción asociado con este tipo de fármacos es la propiedad de crear una barrera protectora que recubre la mucosa gástrica, permitiendo su recuperación (Konturek, *et al.*, 1988).

En un modelo de úlcera gástrica inducida con etanol, se ha encontrado que estos compuestos estimulan la producción de PGE₂, la cual es dosis dependiente (Hall y van den Hoven, 1987). Además, el subcitrato de bismuto coloidal acelera la recuperación de

ulceraciones crónicas, favoreciendo la acumulación y unión del EGF a su receptor en la zona dañada (Konturek, *et al.*, 1988).

Antagonistas de los receptores de histamina H₂.

Los antagonistas de los receptores H₂ como la cimetidina y la ranitidina, interfieren con la secreción gástrica inhibiendo competitivamente estos receptores en las células parietales de la mucosa gástrica, además de disminuir la secreción de pepsina (Tuskey y Peura, 2013). Estos fármacos ejercen una notable movilización de Prostaglandina I₂ (PGI₂) endógena, la cual es una sustancia de citoprotección adaptativa (Balint, 1998).

La absorción de estos fármacos se reduce con la administración concomitante de antiácidos. El uso de antagonistas H₂ puede suprimir la producción de ácido de un 37-68% durante 24 horas. Además de disminuir el riesgo de desarrollar ulceraciones asociadas con el uso de AINE's (Tuskey y Peura, 2013).

Se ha observado que la tolerancia a los antagonistas de los receptores de histamina se presenta después de 7 días de terapia. Sin embargo, una de las principales ventajas de estos fármacos es su flexibilidad en la dosificación debido a su seguridad (Tuskey y Peura, 2013).

Inhibidores de la bomba de protones (H⁺/K⁺ATPasa).

Los benzimidazoles (como el omeprazol) han demostrado ser potentes inhibidores de la bomba de protones disminuyendo la formación de ácido (Lorentzon, *et al.*, 1985).

El mecanismo de acción de estos fármacos es a través de la unión covalente a la enzima H⁺/K⁺ ATPasa. Es importante mencionar que estos compuestos son bases débiles, y se acumulan en el espacio acidificado del estómago, lo cual transforma a estas moléculas en un metabolito protonado activo que difunde hacia las cisteínas expuestas de la enzima, donde se une (Wallmark, *et al.*; 1984; Shin, *et al.*, 2009).

Los inhibidores de la bomba de protones poseen una mayor supresión de la secreción de HCl que los antagonistas de los receptores H₂. Sin embargo, el uso prolongado de estos fármacos se encuentra asociado con efectos adversos como neumonía o diarreas infecciosas (Barletta&Sclar, 2014), además de disminuir la secreción de somatostatina, favoreciendo así el incremento de la liberación de gastrina e induciendo hipergastrinemia (Chu y Schubert, 2013). Además de generar disbiosis, que se presenta como un

desbalance de las poblaciones microbianas benéficas en el tracto gastrointestinal, debido al cambio de pH (Wallace *et al.*, 2011).

1.10. Análisis isoblográfico.

El uso de varios fármacos es utilizado en la terapéutica de una enfermedad o en caso de tener varios padecimientos conjuntos. En el caso de los remedios herbolarios se sabe que existen diferentes metabolitos que ejercen un efecto en el organismo, debido a la gran variedad de blancos moleculares y mecanismos de acción que interactúan en conjunto para el tratamiento eficaz de algún padecimiento.

Las interacciones favorables entre fármacos tienen los siguientes objetivos (Chou, 2006):

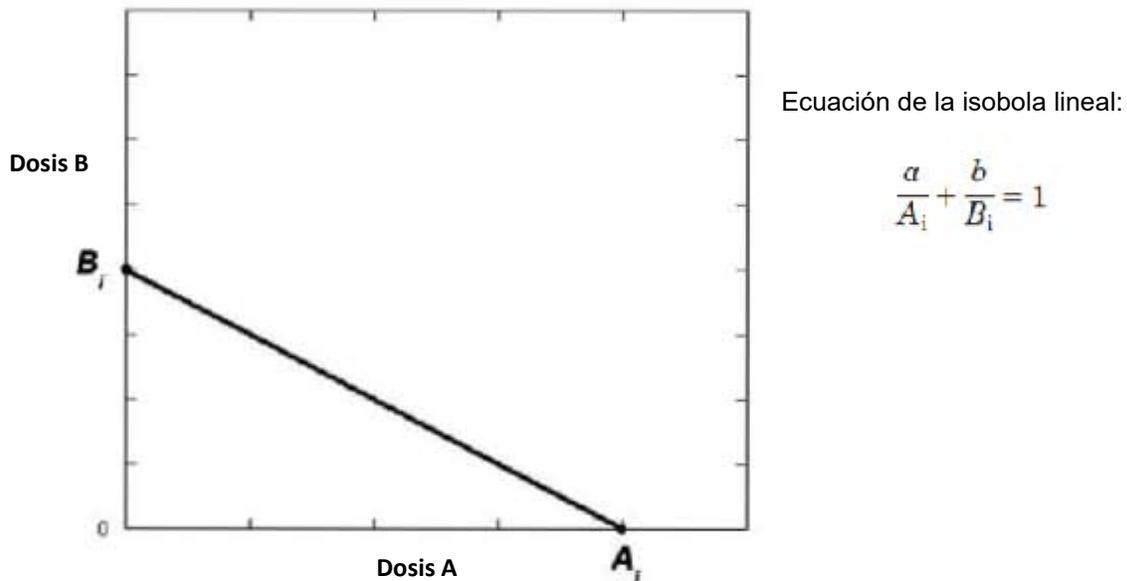
- Incrementar la eficacia del efecto terapéutico.
- Disminuir la dosis pero incrementando o manteniendo la eficacia, evitando efectos tóxicos.
- Minimizar o reducir el desarrollo de la resistencia farmacológica.
- Proporcionar sinergismo selectivo hacia cierto blanco.

Se pueden establecer tres tipos de relaciones entre fármacos: sinergismo (superaditividad), antagonismo (subaditividad) y aditividad. Las combinaciones que alcanzan un efecto predecible basado en las potencias individuales de cada fármaco poseen una relación de tipo aditiva; por definición, el sinergismo presenta un efecto mayor al aditivo, y el antagonismo un efecto menor (Tallarida, 2007).

Para realizar el estudio de las interacciones farmacológicas es necesario que las dos sustancias a probar tengan el mismo efecto farmacológico, esto significa que independientemente del (los) mecanismo(s) de acción, ambos compuestos, desencadenen la misma respuesta en la unidad experimental (Tallarida, 2007).

El isoblograma es una representación gráfica de las dosis efectivas equivalentes (DEX) de ambos fármacos, unidos por una recta (isobola) llamada también línea de aditividad. En la mayoría de los casos, la dosis efectiva utilizada para el análisis isoblográfico es la dosis efectiva 50 (DE50), pero se puede utilizar cualquier nivel de efecto. En este caso, se decidió utilizar la *dosis mediana (Dm)*, la cual se define como la dosis requerida para afectar el 50% del sistema. En la gráfica se colocan los puntos de las combinaciones de ambas sustancias que correspondería con un efecto igual al de los fármacos individuales. Cuando estos puntos obtenidos experimentalmente caen dentro de la línea de aditividad

se dice que la interacción es de tipo aditiva. Si los puntos experimentales se encuentran por debajo de la isobola, se dice que el tipo de interacción es superaditiva o sinergista; si por el contrario, los puntos se observan por encima, se dice que la interacción entre ambas sustancias es subaditiva (Tallarida, 2007). Para determinar si existe diferencia significativa estadística entre la distancia de los puntos a la isobola, se aplica una prueba de *t-student*. Cabe destacar que en el caso de fármacos con una potencia relativa constante las isobolas son de tipo lineal (Figura 20), sin embargo cuando la potencia es variable o el efecto máximo no es el mismo se observan isobolas no lineales en vez de una simple línea recta (Tallarida, 2006; Tallarida 2012). Por lo que es importante considerar el número de Hill de las curvas dosis-respuesta de cada uno de los fármacos individuales para determinar el tipo de isoblograma (Figura 21).



Donde:

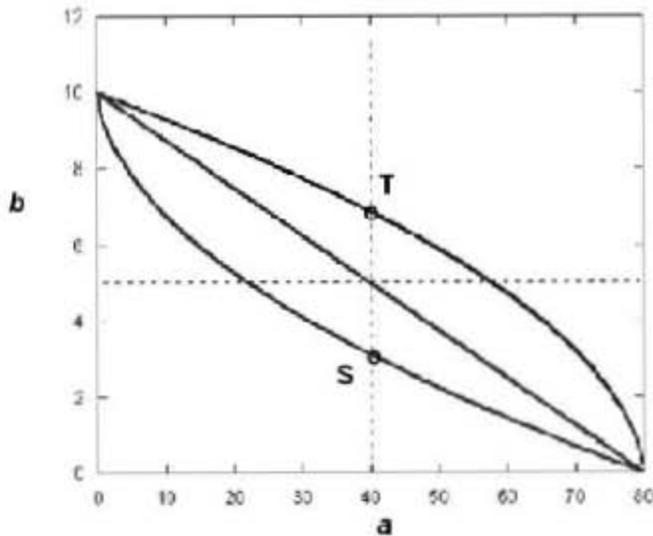
A_i = Dosis del fármaco A que produce un efecto determinado.

B_i = Dosis del fármaco B que produce un efecto determinado.

a = Fracción de la dosis de A en la combinación.

b = Fracción de la dosis de B en la combinación.

Figura 20. Isoblograma lineal para fármacos con radio de potencia constante (Tallarida, 2006).



Ecuaciones para isobolas no lineales simétricas por encima y debajo de la línea de aditividad:

$$b = Dm_2 \left(\frac{D_1 - a}{Dm_1} \right)^{m_1/m_2}$$

$$b = D_2 - \frac{Dm_2}{\left(\frac{Dm_1}{a} \right)^{m_1/m_2}}$$

Figura 21. Isobolas de aditividad para un efecto igual al 50% de dos agonistas completos con potencia variable (Tallarida 2006).

Donde:

m_1 = Número de Hill de la curva dosis-respuesta del fármaco A.

m_2 = Número de Hill de la curva dosis-respuesta del fármaco B.

Dm_1 = Dosis mediana del fármaco A.

Dm_2 = Dosis mediana del fármaco B.

D_1 y D_2 = Dosis del fármaco A y B en la combinación, respectivamente.

Los puntos experimentales por debajo de S se consideran interacciones superaditivas o sinergistas, los puntos por encima de T se consideran interacciones subaditivas. Los puntos que se encuentren dentro del área de ambas isobolas se consideran como una relación aditiva, sin interacción.

1.11. Ecuación del índice de combinación (IC)-isoblograma (método Chou-Talalay).

La ecuación del índice de combinación (IC)-isoblograma, conjunta las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch y Scatchard, la cual provee una definición cuantitativa del efecto aditivo (IC = 1), sinergismo (IC < 1) y subaditividad (IC > 1) en la combinación de fármacos (Chou, 2006). Las características de esta metodología son su definición cuantitativa, simplicidad y flexibilidad, así como su eficiencia y economía (Chou, 2010).

Este modelo considera las curvas dosis-efecto de cada compuesto y sus combinaciones en múltiples concentraciones diluidas utilizando la ecuación del efecto mediana.

$$\frac{fa}{fu} = \left(\frac{D}{Dm} \right)^m$$

Donde D es la dosis, Dm es la dosis efecto mediana (Dm), la cual corresponde a la dosis requerida para afectar el 50% del sistema, fa es la fracción afectada por la dosis D y fu es la fracción no afectada por la dosis D , por lo que $fu = 1 - fa$. El valor de "m" indica la forma de la gráfica siendo $m=1$ para una hipérbola, $m>1$ para una sigmoide y $m<1$ para una gráfica de tipo sigmoide-planar (Chou, 2006).

La determinación del índice de combinación (IC) para dos fármacos se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} = \frac{(D)_1}{(Dm)_1 \left[\frac{fa}{1-fa} \right]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2 \left[\frac{fa}{1-fa} \right]^{1/m_2}}$$

Donde los valores de IC <1; =1; >1 indican sinergismo, aditividad y subaditividad, respectivamente. En el denominador, D_x es la dosis de cada fármaco solo para lograr un porcentaje de efecto determinado; $(D)_1 + (D)_2$ simboliza la dosis de fármaco en combinación que ejerce el porcentaje de efecto determinado (Chou, 2006).

Así pues, la ecuación general para calcular el IC de varios fármacos en combinación sería:

$$n(IC)_x = \sum_{i=1}^n \frac{(D)_i}{(Dx)_i} = \sum_{i=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \left\{ \frac{[D]_i}{\sum_1^n [D]} \right\}}{(Dm)_i \left\{ \frac{(fa_x)_i}{[1 - (fa_x)_i]} \right\}^{1/m_i}}$$

Para lo cual ${}^n(IC)_x$ es el índice de combinación para n fármacos, al $x\%$ de efecto; $(Dx)_{1-n}$ es la suma de las dosis de los fármacos que ejercen el $x\%$ de efecto en combinación; $\{[D]_i/\sum_1^n [D]\}$ es la proporcionalidad de la dosis de cada uno de los fármacos en combinación; $(Dm)_i \{ (fa_x)_i / [1 - (fa_x)_i] \}^{1/m_i}$ es la dosis de cada fármaco individual que ejerce el $x\%$ de efecto (Figura 22) (Chou, 2006).

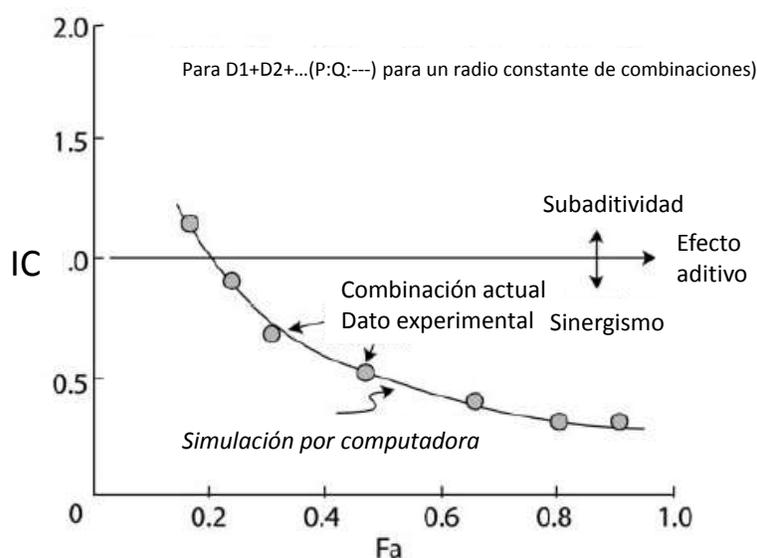


Figura 22. Gráfica del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (Fa) y determinación de sinergismo, aditividad o subaditividad (IC <1; =1; >1).

1.12. Cálculo del Índice de la Reducción de la Dosis (IRD).

El índice de reducción de la dosis (Chou, 2006), indica las veces que puede ser reducida la dosis de cada fármaco en una combinación de tipo superaditiva. El cálculo del IRD es importante, ya que permite disminuir efectos tóxicos inherentes a la dosis, sin reducir los efectos farmacológicos.

$$(IRD)_i = \frac{(Dm)_i \left[\frac{fa}{1-fa} \right]^{1/m_i}}{(D)_i}$$

Donde IRD es el índice de reducción de la dosis, D_m es la dosis del efecto mediana de cada fármaco individual, D corresponde a la dosis de la combinación de los fármacos que ejercen el $x\%$ de efecto, fa es la fracción afectada por la dosis D , m representa la sigmoicidad de la curva dosis-efecto ($m=1$ hipérbola; $m>1$ sigmoideal; $m<1$ sigmoideal negativa).

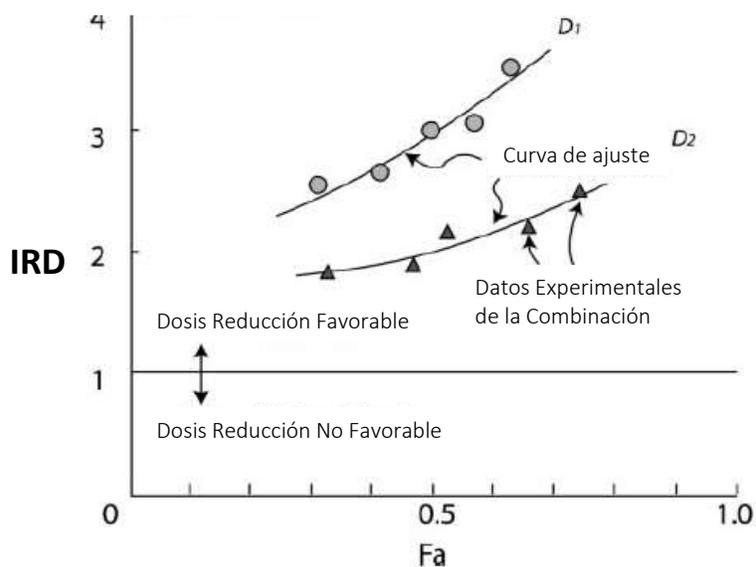


Figura 23. Gráfica del índice de reducción de la dosis (IRD) vs la fracción afectada (Fa); $IRD < 1$ Dosis Reducción no favorable, $IRD > 1$ Dosis Reducción favorable (Chou, 2006).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El padecimiento de úlcera péptica (gástrica y duodenal) es común dentro de la población a nivel mundial, dentro de los tratamientos para aliviar dicha enfermedad se encuentra el uso de diversos remedios herbolarios como la raíz de *Curcuma longa*. Esta planta es ampliamente utilizada a nivel mundial y en la actualidad se desconoce el tipo de interacciones que podrían ocurrir con el uso concomitante de la raíz y otros fármacos utilizados para el tratamiento de la úlcera péptica. Es por ello que en este trabajo se realizó un estudio sobre las interacciones de la curcumina, principal metabolito de la *Curcuma longa*, con los fármacos subsalicilato de bismuto y ranitidina, así como con el extracto acetónico de la raíz de cúrcuma. Además se realizó el estudio de la interacción entre los principales curcuminoides del extracto, para evaluar si la variación de las proporciones de estos metabolitos en el extracto tiene algún efecto sobre la gastroprotección. Se utilizó el modelo de úlcera gástrica inducida con etanol en ratas, analizando las combinaciones pareadas y múltiples de los curcuminoides y los fármacos antiulcerosos, aplicando la ecuación del índice de combinación (IC)-isobograma.

3. HIPÓTESIS

- La curcumina o el extracto de *Curcuma longa* en combinación con los fármacos antiulcerosos ranitidina y subsalicilato de bismuto presentarán una interacción farmacodinámica de tipo superaditiva (sinergista) de su efecto gastroprotector, en un modelo de daño gástrico inducido con etanol en rata Wistar. Adicionalmente, entre los tres principales curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina), se presentará una interacción de tipo superaditiva de su actividad gastroprotectora en el mismo modelo biológico.

4. OBJETIVO:

Determinar la interacción farmacodinámica gastroprotectora de la curcumina o el extracto de *Curcuma longa* con los fármacos antiulcerosos ranitidina y subsalicilato de bismuto, en el modelo de daño gástrico inducido con etanol. Así como la interacción entre los principales curcuminoides curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina, empleando el mismo modelo biológico.

4.1. Objetivos secundarios:

- Aislar y caracterizar a los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina) de la raíz seca de *Curcuma longa*.
- Determinar el efecto gastroprotector de los curcuminoides aislados de *Curcuma longa* y el extracto acetónico, en un modelo de úlcera gástrica inducida con etanol en rata y calcular la dosis mediana (*Dm*) de cada tratamiento.
- Determinar e identificar la composición relativa de los curcuminoides presentes en el extracto de *Curcuma longa* por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas.
- Determinar las interacciones físico-químicas entre la curcumina y los fármacos antiulcerosos (subsalicilato de bismuto y ranitidina) mediante análisis espectrométricos y espectrofotométricos.
- Evaluar la interacción de la curcumina o el extracto con los fármacos antiulcerosos (subsalicilato de bismuto y ranitidina) mediante el análisis de las combinaciones múltiples, aplicando la ecuación del índice de combinación (CI)-isoblograma.
- Evaluar la interacción de los curcuminoides principales en diferentes proporciones al extracto, mediante el análisis de las combinaciones múltiples, aplicando la ecuación del índice de combinación (CI)-isoblograma.

5. METODOLOGÍA.

5.1. Procedimientos generales.

La identificación de la curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina (Ravindran, *et al.*, 2007; Mahattanadula, *et al.*, 2009; Thavorn, *et al.*, 2014) se realizó por medio de Espectrometría de Masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de masas (EM) de los tres curcuminoides (energía de ionización 70eV), se obtuvieron mediante un espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5890. El modo de introducción de la muestra fue directa y la ionización por electro spray positivo (ESI+). Los espectros de RMN fueron obtenidos usando un espectrómetro Varian modelo Unity Plus 400 a 125 MHz (¹³C) y 400 MHz (¹H), usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los compuestos fueron disueltos en metanol deuterado (CD₃OD).

5.2. Material vegetal y fármacos.

La *Curcuma longa* fue amablemente donada por Laboratorios MIXIM S. A. de C. V., como raíz seca y molida que se utiliza como materia prima para la elaboración de productos comerciales. Los curcuminoides se aislaron en cantidades suficientes para la realización de las pruebas biológicas.

Los fármacos con actividad antiulcerosa: sales de bismuto (Hall & van den Hoven, 1987; Konturek *et al.*, 1998) y ranitidina (Tuskey y Peura, 2013) fueron obtenidos en Sigma-Aldrich®.

5.3. Aislamiento y purificación de los curcuminoides.

Tres kilogramos de raíz seca molida de *Curcuma longa* se colocaron en extracción por Soxhlet con acetona por 6 horas para obtener el extracto de la planta, del cual se aislaron los curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina) por cromatografía en columna de lecho abierto, fase normal con sílica gel 60 (0.063-0.200 mm, MERCK®). La elución de la columna se realizó con hexano, cloroformo:hexano (1:1), cloroformo:hexano (8:2), cloroformo, cloroformo:metanol (99.5:0.5), cloroformo:metanol (99:1), cloroformo:metanol (98:2), cloroformo:metanol (97:3), los curcuminoides comenzaron a separarse en las fracciones eluidas con cloroformo, el seguimiento de la separación se realizó mediante cromatografía en capa fina.

Para la purificación y cristalización de cada uno de los curcuminoides, se disolvieron las fracciones con alto contenido de cada compuesto en la mínima cantidad de metanol caliente (60° C) y agregando un volumen 10 veces mayor de hexano a -20° C, posteriormente se coloca a 4°C por 24 horas, los cristales formados se separan por filtración y se lavan con hexano frío (-20° C). La identificación de las moléculas se llevó a cabo por EM y RMN (ver anexos 1 al 9).

5.4. Composición relativa de curcuminoides del extracto de *C. longa*.

La identificación de los tres curcuminoides principales y la determinación de su proporción relativa, en el extracto de *C. longa*, se llevó a cabo mediante un análisis por Cromatografía de Líquidos de alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR/EM, Agilent® HPLC Serie 1200 / Agilent® ESI espectrómetro de masas Triple Quad LC/MS 6410), utilizando una columna Fase Reversa ZORBAX Extended-C18 (150 × 4.6 mm d.i.; 5 µm, Agilent®) a una temperatura de 25°C. El gradiente de elución comenzó con una proporción 50:50 de ácido fórmico 0.1% en agua: acetonitrilo, cambiando gradualmente a una proporción 5:95 en un tiempo de 22 min. La velocidad de flujo 0.5 mL/min. El tipo de ionización fue por Electro spray (ESI) negativo a una temperatura de 350° C, un flujo de 8 L/min y un voltaje capilar de 4 kV.

Antes de inyectar la muestra, se diluyeron 5 mg del extracto en metanol (0.9 mL) con ácido fórmico 0.1% (0.1 mL), posteriormente la muestra fue sonicada por 10 min y centrifugada a 22 000 g por 10 minutos. Para facilitar la inyección, 200 µL de la muestra ya procesada fueron diluidos en ácido fórmico acuoso (0.1%): acetonitrilo (80:20).

5.5. Preparación de las suspensiones.

Con el objetivo de facilitar la administración oral de los curcuminoides y del extracto, se prepararon suspensiones de cada uno de los tratamientos como se describe a continuación.

Se colocaron 100 mg de cada uno de los tratamientos con 0.25 mL de Tween 80, 0.25 mL de Span 20 y 1 mL de agua destilada, en agitación constante durante 30 min utilizando un homogeneizador (ULTRATURAX®) a 338.2 g. Posteriormente, se agregó agua destilada a una velocidad de 0.5 mL/min hasta completar un volumen final de 10 mL, manteniendo constante la agitación durante 90 min adicionales. El tamaño de partícula (~570 a 740 nm) fue medido con un Zetasizer ZEN ZS 3600 (Malvern Panalytical Co., UK). Las suspensiones fueron almacenadas a temperatura ambiente, alejadas de la luz.

5.6. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso entre 200 a 250 g obtenidas de Envigo México. Los animales se mantuvieron a una temperatura constante de 22 ± 2 °C y sometidas a ciclos de 12 horas de luz con libre acceso a comida y agua electropura® (no acidulada) (Velázquez-Moyado *et al.*, 2015).

Todos los experimentos en los que se involucró el uso de animales de laboratorio se realizaron siguiendo los lineamientos especificados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de Animales de Laboratorio) y de acuerdo a las reglas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio. Se sometió el protocolo de investigación para la aprobación y autorización bioética del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Química, obteniendo la aprobación con el oficio número CICUAL/147/16, 2016 (ver anexo 10).

5.7. Modelo de úlcera gástrica inducida con etanol en rata.

Las ratas se mantuvieron en un ayuno de 14 horas, en jaulas con piso de malla para evitar la ingesta de heces y/o aserrín. Posteriormente se administró con ayuda de una cánula metálica, un volumen de 1mL de etanol absoluto en la cavidad gástrica, al término de 2 horas se sacrificó la rata por asfixia en cámara de CO₂, para extraer el estómago el cual se abre por la curvatura mayor y se lava con solución salina; posteriormente es fijado con 10 mL *p*-formaldehído al 4% (Velázquez-Moyado, *et al.*, 2015). Se midió el área de daño en mm² de cada lesión con la ayuda de un microscopio digital Celestron 44302-A y el programa Image J (Rasband, 1997-2014).

5.8. Determinación del efecto gastroprotector.

Para evaluar el efecto gastroprotector, los tratamientos con los compuestos puros se administraron 30 minutos antes de inducir el daño gástrico con etanol como se describió anteriormente. En todos los experimentos se incluyó un lote control que es tratado con el vehículo empleado para administrar los compuestos y fármacos de prueba (Velázquez-Moyado, *et al.*, 2015).

Se empleó un mínimo de 6 animales por dosis de fármaco para la construcción de las curvas dosis-efecto y el cálculo de la dosis mediana (*Dm*), la cual se define como la dosis requerida para afectar el 50% del sistema.

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para verificar si existe diferencia significativa entre las dosis administradas y el control en cada uno de los fármacos empleados.

5.9. Análisis isoblográfico normalizado.

El análisis de las interacciones binarias se realizó empleando el isoblograma normalizado, el cual, como se mencionó en los antecedentes, es una representación gráfica de las dosis equivalentes de dos fármacos para un efecto determinado; en este estudio se evaluó la Dm para cada fármaco en la combinación. La normalización del isoblograma se llevó a cabo graficando la razón de la dosis empleada para cada fármaco entre su propia Dm en cada uno de los ejes (D_1/Dm_1 para el fármaco 1 y D_2/Dm_2 para el fármaco 2). Para ello, se calculó la aditividad matemáticamente con la siguiente ecuación:

$$\frac{(D)_1}{(Dm)_1} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2} = 1$$

Así mismo, el área de aditividad se calculó con las siguientes ecuaciones:

$$b = Dm_2 \left(\frac{D_1 - a}{Dm_1} \right)^{m_1/m_2} \quad \text{y} \quad b = D_2 - \frac{Dm_2}{\left(\frac{Dm_1}{a} \right)^{m_1/m_2}}$$

La Dm teórica (Dm_{TEO}) y Dm experimental (Dm_{EXP}) de las combinaciones binarias en el análisis isoblográfico fueron comparadas por medio de la prueba de Mann-Whitney, para establecer la diferencia estadística significativa.

5.10. Análisis de las combinaciones múltiples aplicando la ecuación del índice de combinación (IC)-isoblograma (método Chou-Talalay).

Se realizó el cálculo del índice de combinación para los tres metabolitos y fármacos utilizados en el estudio, empleando la fórmula descrita por Chou-Talalay (2006) para combinaciones múltiples.

$$n(IC)_x = \sum_{i=1}^n \frac{(D)_i}{(Dx)_i} = \sum_{i=1}^n \frac{(Dx)_{1-n} \left\{ \frac{[D]_i}{\sum_1^n [D]} \right\}}{(Dm)_i \left\{ \frac{(fa_x)_i}{[1 - (fa_x)_i]} \right\}^{1/m_i}}$$

Donde $n(IC)_x$ es el índice de combinación para n fármacos, al $x\%$ de efecto; $(Dx)_{1-n}$ es la suma de las dosis de los fármacos que ejercen el $x\%$ de efecto en combinación; $\{[D]_i/\sum_1^n [D]\}$ es la proporcionalidad de la dosis de cada uno de los fármacos en combinación; $(Dm)_i \{ (fa_x)_i / [1 - (fa_x)_i] \}^{1/m_i}$ es la dosis de cada fármaco individual que ejerce el

x% de efecto, para determinar si existe sinergismo($CI < 1$), aditividad ($CI = 1$) o subaditividad($CI > 1$) (Chou, 2006).

Las combinaciones probadas en proporción 1:1 con respecto a la dosis mediana calculada fueron:

- Extracto - Ranitidina
- Curcumina - Ranitidina
- Extracto - Subsalicilato de Bismuto
- Curcumina - Subsalicilato de Bismuto
- Curcumina - Desmetoxicurcumina
- Curcumina - Bis-desmetoxicurcumina
- Curcumina - Desmetoxicurcumina - Bis-desmetoxicurcumina (1:1:1)
- Extracto (3.7:1:10, CUR:DMC:BDMC)

La dosis mediana calculada para cada uno de los fármacos fue utilizada para preparar las combinaciones. En la Tabla 1 se muestra el diseño para las combinaciones binarias (1:1), así mismo en la Tabla 2, se muestra el diseño para la combinación triple 1:1:1, CUR-DMC-BDMC.

		Fármaco 1					
		0	$0.25x(Dm)_1$	$0.5x(Dm)_1$	$(Dm)_1$	$2x(Dm)_1$	$4x(Dm)_1$
Fármaco 2	0	Control					
		$(fa)_0$	$(fa)_1$	$(fa)_1$	$(fa)_1$	$(fa)_1$	$(fa)_1$
	$0.25x(Dm)_2$	$(fa)_2$	$(fa)_{1,2}$				
	$0.5x(Dm)_2$	$(fa)_2$		$(fa)_{1,2}$			
	$(Dm)_2$	$(fa)_2$			$(fa)_{1,2}$		
	$2x(Dm)_2$	$(fa)_2$				$(fa)_{1,2}$	
	$4x(Dm)_2$	$(fa)_2$					$(fa)_{1,2}$

Tabla 1. Diseño experimental de las combinaciones binarias (1:1). Dm = dosis mediana del fármaco 1 o 2 en la combinación; fa = fracción afectada por el tratamiento.

Fármaco 1	Fármaco 2	Fármaco 3	
0	0	0	Control
0.25x(Dm) ₁	0.25x(Dm) ₂	0.25x(Dm) ₃	(fa) _{1,2,3}
0.5x(Dm) ₁	0.5x(Dm) ₂	0.5x(Dm) ₃	(fa) _{1,2,3}
(Dm) ₁	(Dm) ₂	(Dm) ₃	(fa) _{1,2,3}
2x(Dm) ₁	2x(Dm) ₂	2x(Dm) ₃	(fa) _{1,2,3}
4x(Dm) ₁	4x(Dm) ₂	4x(Dm) ₃	(fa) _{1,2,3}

Tabla 2. Diseño experimental para la combinación triple CUR-DMC-BDMC (1:1:1). Dm = dosis mediana del fármaco 1 o 2 en la combinación; fa = fracción afectada por el tratamiento

5.11. Cálculo del Índice de la Reducción de la Dosis (IRD).

Se realizó el cálculo del índice de reducción de la dosis, según el método matemático propuesto por Chou (2006):

$$(IRD)_i = \frac{(Dm)_i \left[\frac{fa}{1-fa} \right]^{1/m_i}}{(D)_i}$$

Donde IRD es el índice de reducción de la dosis, Dm es la dosis del efecto mediana de cada fármaco individual, D corresponde a la dosis de la combinación de los fármacos que ejercen el x% de efecto, fa es la fracción afectada por la dosis D , m representa la sigmoicidad de la curva dosis-efecto.

5.12. Evaluación de la mucoadhesión.

La evaluación de la mucoadhesión de las suspensiones de los curcuminoides y del extracto se realizó empleando un método reológico, reportado por Hägerström *et al.* (2000). Esta metodología se basa en la diferencia entre el módulo elástico (G') y el viscoso (G'') de las muestras. Los parámetros de sinergismo ($\Delta G'$ y $\Delta G''$) se determinaron por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G' = G'_{mix} - (G'_{sus} + G'_{muc})$$

$$\Delta G'' = G''_{mix} - (G''_{sus} + G''_{muc})$$

Dónde G'_{sus} y G''_{sus} representan el módulo elástico y viscoso de la suspensión individual, G'_{muc} y G''_{muc} son el módulo elástico y viscoso de la mucina, G'_{mix} y G''_{mix} representan los parámetros de la mezcla de mucina con cada una de las suspensiones.

Los valores de $\Delta G'$ y $\Delta G''$ positivos indican una interacción entre los componentes de la muestra y por lo tanto de mucoadhesión. Los parámetros de sinergismo reológico fueron comparados por debajo del punto de inflexión a 2.5, 5 y 10 rad/s.

La mucina empleada fue de estómago porcino (tipo III) Sigma Aldrich® (donada por la Dra. Josefa Bernad), la cual se dispersó con agitación magnética suave durante 14 h a temperatura ambiente en un medio gástrico simulado (solución acuosa de HCL, pH 1.6). La dispersión de mucina se mezcló con cada una de las suspensiones para producir una concentración final de 5% (p/p) de mucina y 3% (p/p) de suspensión. La mezcla se mantuvo con agitación magnética por 30 min previos a su evaluación. Cada una de las suspensiones individuales se evaluó en el medio gástrico simulado, así como la dispersión de mucina sola. Todas las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro de esfuerzo controlado TA Instruments Discovery HR3® con una geometría de cilindros concéntricos (21,96 mm de diámetro exterior, 20,38 mm de diámetro interno, 59,90 mm de altura y 500 μm de espacio). Los componentes individuales y las mezclas de sistema de mucina se caracterizaron bajo flujo de cizallamiento constante en el rango de 1 a 1000 s^{-1} , y bajo flujo oscilatorio en el régimen visco-elástico lineal a $37.0 \pm 1^\circ \text{C}$ (baño de agua circulante Cole Parmer Polystat y Peltier AR-G2).

5.13. Análisis histológico.

Una porción representativa de cada uno de los estómagos tratados fueron almacenados a 4°C en paraformaldehído (4%, pH 7.4) para su posterior análisis microscópico. El tejido fue deshidratado con baños de alcoholes, disminuyendo sucesivamente su polaridad (formaldehído 10%, etanol 80, 96, 100%, xilol:parafina 50:50), hasta embeber en parafina. Se cortaron secciones de 5 μm , las cuales fueron montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina-eosina para su examinación microscópica (Olympus BX51 acoplado a una cámara de alta resolución Olympus Q-Color 5).

5.14. Análisis estadístico.

La diferencia estadística entre la Dm teórica (Dm_{TEO}) y la Dm experimental (Dm_{EXP}) fue establecida con base en el resultado de la prueba Mann-Whitney, $p < 0.05$. La diferencia estadística entre los tratamientos y el control ulcerado, fue determinada por un análisis de varianza (ANADEVA) seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett.

6. RESULTADOS.

6.1 Aislamiento e identificación de curcuminoides.

A partir de 1.5 kg de raíz seca molida de *Curcuma longa*, se lograron aislar e identificar 6.68 g de curcumina, 321.23 mg de desmetoxicurcumina y 448.89 mg de bis-desmetoxicurcumina (Figura 24).

El ión molecular de los espectros de masas de la curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina muestran una m/z de 368, 338 y 308 respectivamente, lo que concuerda con su masa molecular. El fragmento mayoritario del espectro de la curcumina mostró una m/z de 177, el cual corresponde con la mitad de la molécula (ver anexo 3). En el caso de la desmetoxicurcumina, los fragmentos más abundantes fueron m/z 177 (mitad de la molécula con metoxilo) y m/z 147 (mitad de la molécula sin metoxilo) (ver anexo 6), así pues, para la bis-desmetoxicurcumina el fragmento mayoritario corresponde con la mitad de la molécula (m/z 147) (ver anexo 9). Los datos observados en los espectros de masas de las tres moléculas coinciden con lo reportado en la literatura (Cao, *et al.*, 2014).

A continuación se describen los desplazamientos y constantes de acoplamiento correspondientes a los espectros de RMN de los tres curcuminoides.

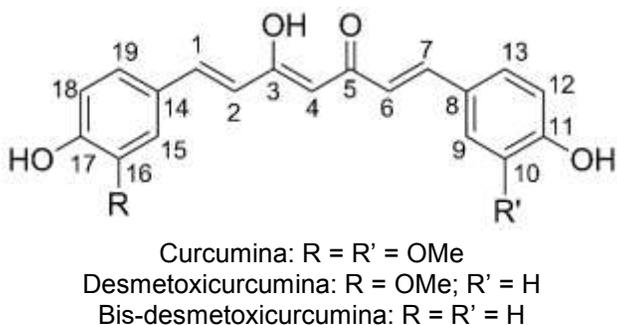


Figura 24. Estructura de los tres curcuminoides aislados e identificados.

Curcumina (Ver anexo 1 y 2): ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , δ): 7.6 (d, $J=15.8$ Hz, H-1/7); 7.24 (s, H-9/15); 7.14 (d, $J=8.3$ Hz, H-13/19); 6.85 (d, $J=8.2$ Hz, H-12/18); 6.66 (d, $J=15.8$ Hz, H-2/6); 5.99 (s, H-4 *forma ceto-enol*); 4.59 (s, H-4 *forma diceto*); 3.94 (s, OMe-10/6), ^{13}C NMR (125 Hz, CD_3OD , δ): 182.53 (C-3); 182.58 (C-5); 148.24 (C-11/17); 147.18 (C-10/16); 139.88 (C-1/7); 126.35 (C-8/14); 121.86 (C-13/19); 120.02 (C-2/6); 114.33 (C-12/18); 109.51 (C-9/15); 99.73 (C-4); 54.22 (OMe-10/6).

Desmetoxicurcumina (Ver anexo 4 y 5): ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.59 (dt, $J=15.9$, 2.5 Hz, H-1/7); 7.50 (td, $J=5.6$, 2.7 H-9/13); 7.23 (d, $J=4.7$ Hz, H-15); 7.13 (dd, $J=8.2$, 2.5 Hz, H-19); 6.84 (dd, $J=8.5$, 2.2 Hz, H-10/12/18); 6.63 (m, H-2/6); 5.97 (m, H-4 *forma ceto-enol*); 4.59 (s, H-4 *forma diceto*); 3.93 (d, $J=2.5$ Hz OMe-18), ^{13}C NMR (125 Hz, CD_3OD , δ): 184.68 (C-3/5); 161.09 (C-16); 150.47 (C-17); 149.92 (C-11); 142 (C-1/7); 131.14 (C-9/13); 128.60-128.01 (C-8/14); 124.1 (C-19); 122.26-122.0 (C-2/6); 116.7 (C-12/10/18); 111.75 (C-15); 101.95 (C-4); 56.46 (OMe-18).

Bis-desmetoxicurcumina (Ver anexo 7 y 8): ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ): 7.60 (d, $J=15.9$ Hz, H-1/7); 7.52 (m, H-9/13/15/19); 6.82 (m, H-10/12/16/18); 6.62 (d, $J=15.8$ Hz, H-2/6); 5.97 (s, H-4 *forma ceto-enol*), ^{13}C NMR (125 Hz, CD_3OD , δ): 184.8 (C-3/5); 161.05 (C-11/17); 141.85 (C-1/7); 131.13 (C-8/14); 128.01 (C-2/6); 121.98 (C-12/10/16/18); 116.89 (C-9/13/15/19); 101.73 (C-4).

6.2. Composición relativa de curcuminoides en el extracto de *C. longa*.

Para realizar el análisis de la interacción de los curcuminoides presentes en el extracto, fue preciso conocer las cantidades relativas de dichos compuestos. Mediante el análisis CLAR/EM se logró identificar la presencia de los tres curcuminoides principales en el extracto (Figuras 25 a 28). Las proporciones relativas se muestran en la Tabla 3, considerando las áreas bajo la curva del cromatograma (tres repeticiones):

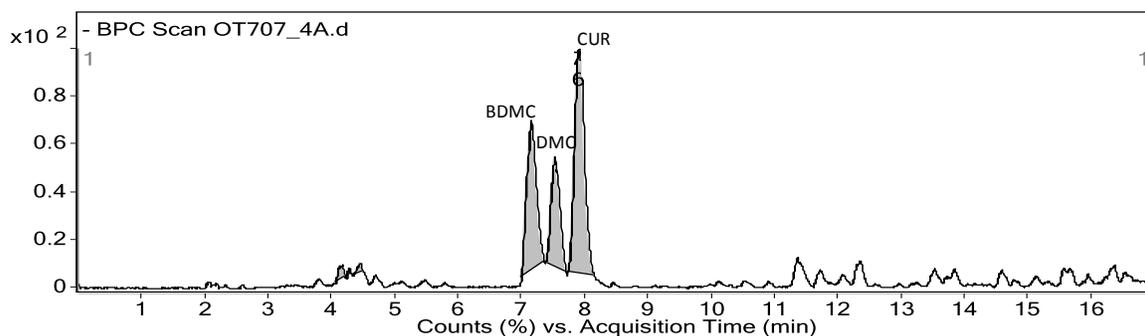


Figura 25. Cromatograma del extracto de *C. longa*, obtenido por extracción en Soxhlet con acetona, para determinar la composición relativa de los curcuminoides (BDMC: bis-desmetoxicurcumina; DMC: desmetoxicurcumina; CUR: curcumina).

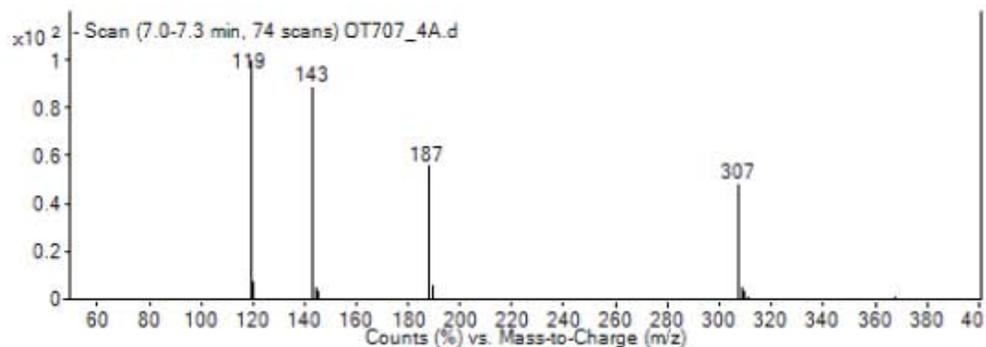


Figura 26. Espectro de masas del pico observado a 7.0-7.3 min, en el cual el pico base corresponde con la masa molecular de la bis-desmetoxicurcumina m/z 307 (M-H). Modo de ionización, ESI negativo.

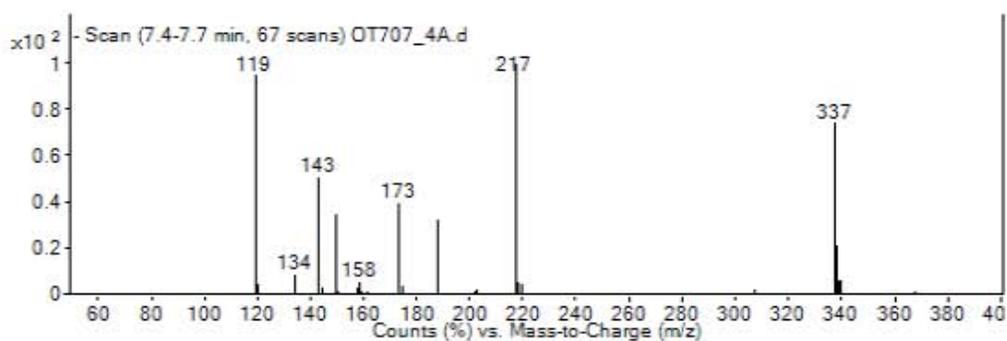


Figura 27. Espectro de masas del pico observado a 7.4-7.7 min, en el cual el pico base corresponde con la masa molecular de la desmetoxicurcumina m/z 337 (M-H). Modo de ionización, ESI negativo.

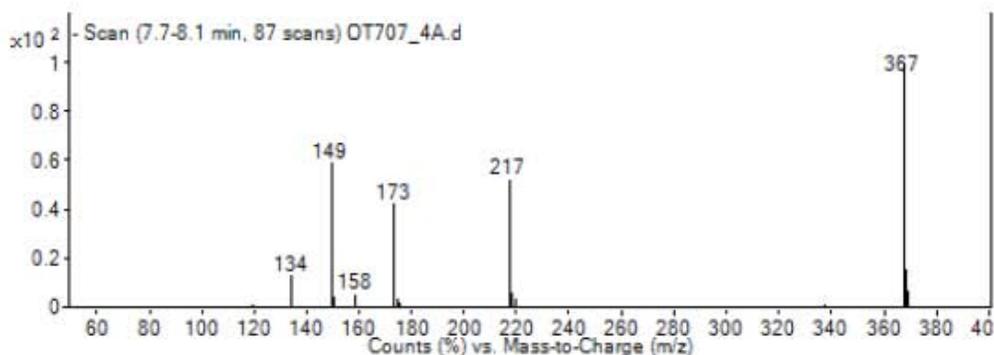


Figura 28. Espectro de masas del pico observado a 7.7-8.1 min, en el cual el pico base corresponde con la masa molecular de la curcumina m/z 367 (M-H). Modo de ionización, ESI negativo.

Tabla 3. Proporciones relativas de los tres principales curcuminoides en el extracto de *C. longa*, obtenido por extracción en Soxhlet con acetona. *El tipo de ionización fue ESI negativo (M-H)⁻.

Curcuminoide	Tiempo de retención (min)	Ion molecular (m/z)*	Área relativa (%)
Bis-desmetoxicurcumina (BDMC)	7.1	307	32.3±0.57
Desmetoxicurcumina (DMC)	7.5	337	21.4±0.86
Curcumina (CUR)	7.9	367	46.3±0.98

Los porcentajes calculados para cada uno de los curcuminoides expresados en fracción de la dosis del extracto son 0.463 para curcumina, 0.214 para desmetoxicurcumina y 0.323 para bis-desmetoxicurcumina. Esta fracción (p) puede ser calculada con respecto a las dosis con la siguiente expresión matemática, donde D_1 , D_2 y D_3 son las dosis individuales para cada uno de los curcuminoides en la dosis total del extracto.

$$p = \frac{D_1}{D_1 + D_2 + D_3}$$

Esta fracción (p) fue usada para calcular la proporción de la dosis mediana (P_{Dm}) para cada curcuminoide dentro del extracto:

$$P_{Dm} = \frac{Dm}{p}$$

Donde Dm es la dosis mediana de cada curcuminoide individual y p es la fracción de este curcuminoide dentro del extracto.

La proporción P_{Dm} calculada para cada curcuminoide fue 0.4653 para curcumina, 0.1271 para desmetoxicurcumina y 1.2936 para bis-desmetoxicurcumina. Cada una de las proporciones (P_{Dm}) fue dividida por el valor menor, en este caso 0.1271. Por lo que las proporciones de los curcuminoides en el extracto fueron 3.7:1:10 (CUR:DMC:BDMC), de acuerdo a cada una de las *dosis medianas* de los curcuminoides.

6.3. Efecto del disolvente y proceso de extracción en la composición relativa de curcuminoides en el extracto.

Se realizó un análisis comparativo de la composición relativa de diferentes extractos de *C. longa*. Los cuales se prepararon por sonicación en contacto con el disolvente (metanol, etanol o acetona) por 30 min, y se analizaron con el procedimiento anteriormente descrito (Figura 29). Los porcentajes relativos de cada curcuminoides en cada uno de los métodos de extracción empleados se muestran en la Tabla 4.

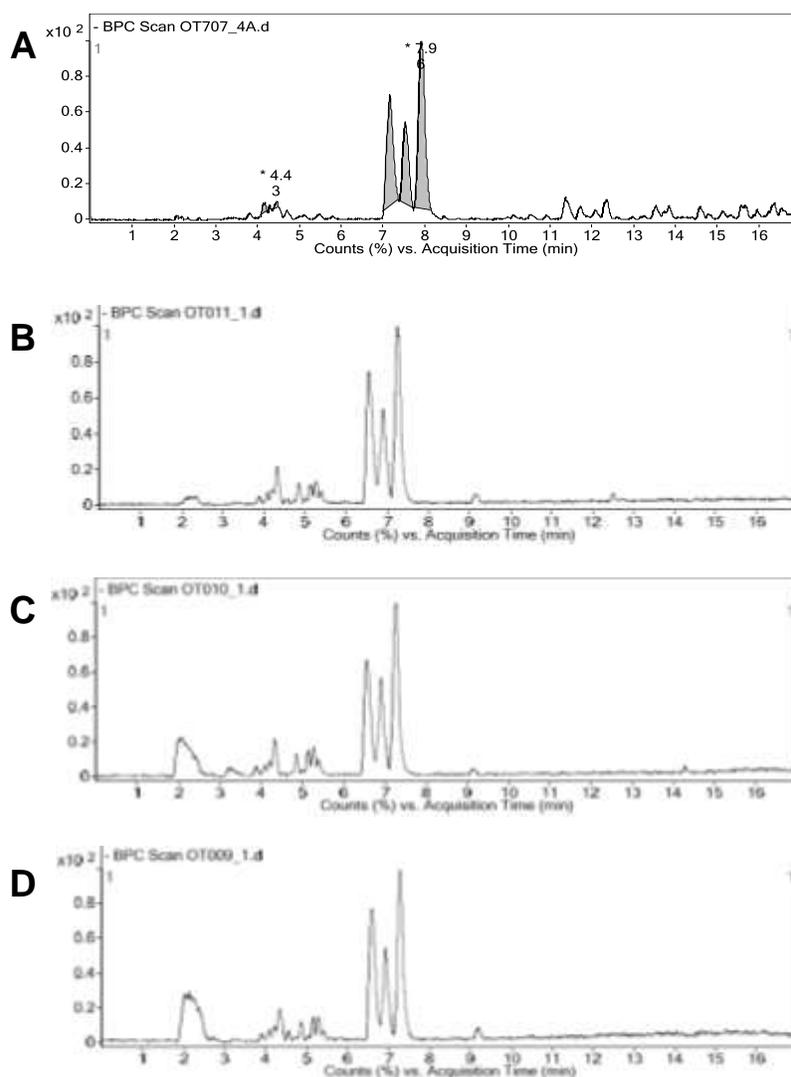


Figura 29. Cromatogramas comparativos de los diferentes extractos. **A:** acetónico por Soxhlet; **B:** acetónico por sonicación; **C:** metanólico por sonicación; **D:** etanólico por sonicación.

Tabla 4. Proporción relativa de los tres curcuminoides (%) utilizando diferentes métodos de extracción.

Curcuminoide	T.r. (min)		Ión molec. (m/z)	Proporción con respecto a curcuminoides totales (%)			
				Ext. Acetona Soxhlet	Ext. Acetona Sonicación	Ext. Metanólico Sonicación	Ext. Etanólico Sonicación
BDMC	7.1	6.6	307	32.3 ± 0.57 %	31.3 ± 0.99 %	30.4 ± 1.03 %	33.9 ± 0.87 %
DMC	7.5	6.9	337	21.4 ± 0.86 %	21.8 ± 0.70 %	22.7 ± 0.82 %	23.2 ± 0.42 %
CUR	7.9	7.3	367	46.3 ± 0.98 %	43.5 ± 0.87 %	44.5 ± 0.70 %	46.4 ± 0.89 %

BDMC= bis-desmetoxicurcumina, DMC= desmetoxicurcumina, CUR= curcumina. T.r.= tiempo de retención. Ión molec= ión molecular. Ext= extracto.

6.4. Determinación de la Dosis mediana (D_m) y el efecto gastroprotector del extracto, la curcumina y los fármacos antiulcerosos.

El cálculo de la D_m y valor de m , se determinó mediante el ajuste de la curva dosis-respuesta a la *Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas*, descrita por Chou (2006):

$$\log\left(\frac{fa}{fu}\right) = m\log(D) - m\log(D_m)$$

Donde fa es la fracción afectada por el tratamiento, fu es la fracción no afectada es decir $(1-fa)$, m es la pendiente de la gráfica, D es la dosis del fármaco para obtener fa y D_m es la dosis mediana. Todos los tratamientos (curcumina, extracto y fármacos antiulcerosos) presentaron un efecto gastroprotector contra las lesiones ocasionadas por etanol absoluto (Figura 30). Los datos calculados de las D_m para cada tratamiento se muestran en la Tabla 5.

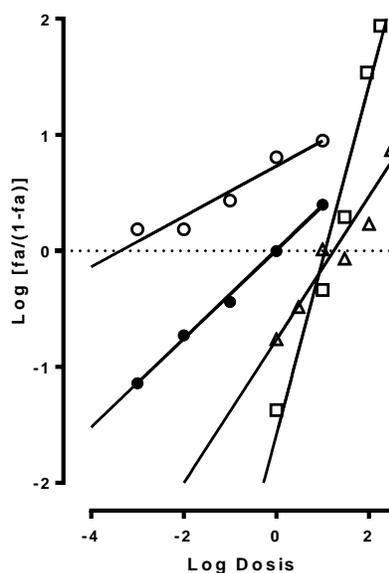


Figura 30. Curvas de ajuste de la *Ecuación del Efecto-mediana* para el cálculo de D_m de los diferentes tratamientos: extracto (O), curcumina (●), ranitidina (Δ) y subsalicilato de bismuto (□) (Chou, 2006). Cada punto representa la mediana de 6 repeticiones.

Tabla 5. Dosis mediana (D_m) y valor de m (pendiente) para cada tratamiento, utilizando el ajuste de la Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas (Chou, 2006).

Fármaco	D_m (mg/kg)	m
Extracto	0.004	0.21
Curcumina	0.996	0.38
Ranitidina	17.4	0.61
S. Bismuto	11.5	1.49

6.5. Evaluación de las interacciones farmacológicas.

6.5.1. Combinaciones de ranitidina con curcumina o el extracto.

La D_m calculada para las combinaciones curcumina-ranitidina y extracto-ranitidina (31.79 mg/kg y 31.11 mg/kg, respectivamente) es mayor que la D_m de los fármacos individuales (curcumina: 0.99 mg/kg; extracto: 0.004 mg/kg; ranitidina: 17.4 mg/kg); cuando la curcumina y el extracto son administrados antes que la ranitidina.

El análisis isoblográfico (Figura 31) muestra una interacción de tipo subaditiva para ambas combinaciones, debido a que las D_m experimentales son mayores que las D_m teóricas, mostrando diferencia significativa. Este resultado es congruente con el análisis realizado calculando el índice de combinación (Figura 32).

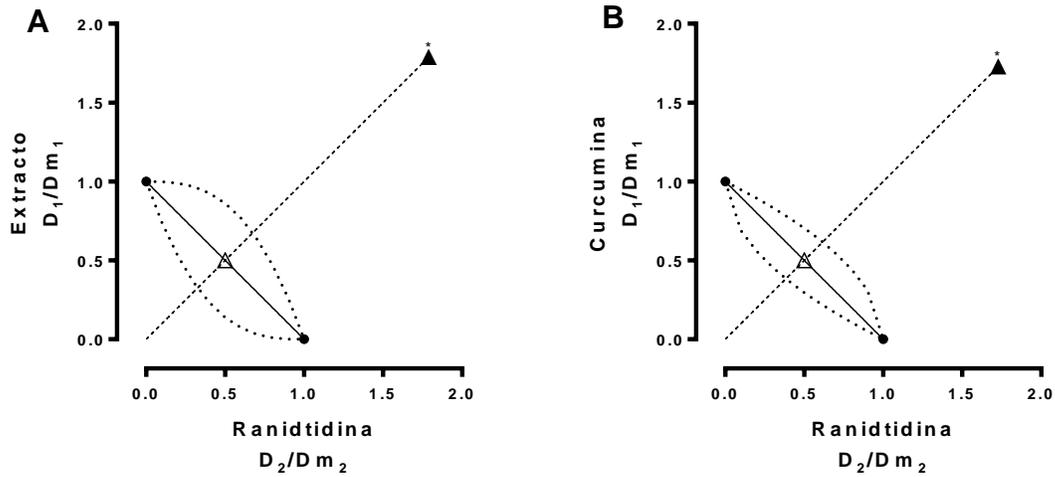


Figura 31. Isoblograma normalizado de la combinación extracto-ranitidina (A) y curcumina-ranitidina (B). Los puntos de la *Dm experimental* (\blacktriangle) (31.11 mg/kg y 31.79 mg/kg, respectivamente) fueron comparados contra la *Dm teórica* (\triangle) (8.79 mg/kg y 9.19 mg/kg, respectivamente). * Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) aplicando una prueba Mann-Whitney. Las líneas punteadas delimitan la zona de aditividad.

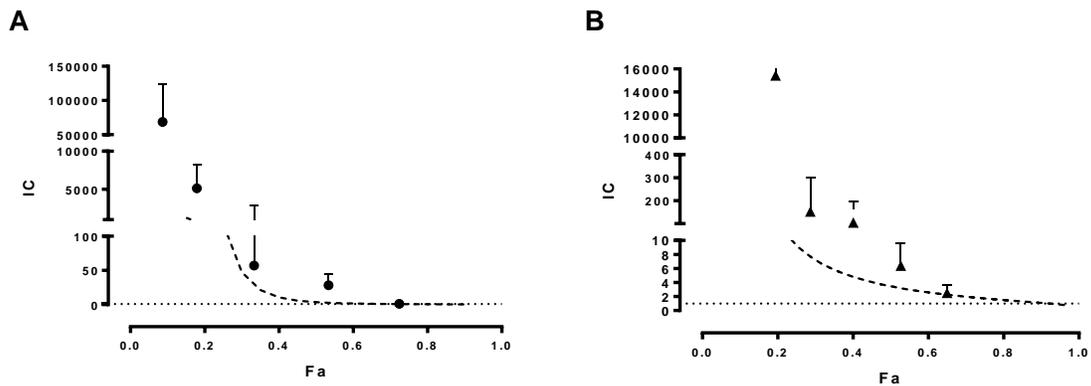


Figura 32. Curva del índice de combinación (IC) vs. la fracción afectada (fa) de las combinaciones extracto-ranitidina (A) y curcumina-ranitidina (B) en una proporción 1:1. La línea discontinua (--) representa el comportamiento teórico de la combinación. Los valores de IC indican subaditividad, aditividad o superaditividad cuando $IC > 1$, $IC = 1$ o $IC < 1$, respectivamente. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 a 6 repeticiones.

6.5.2. Combinaciones de subsalicilato de bismuto con curcumina o el extracto.

El valor de la Dm para la combinación curcumina-s. de bismuto fue de 8.02 mg/kg, mientras que para la combinación del extracto con s. de bismuto fue de 6.35 mg/kg. El análisis isoblográfico (Figura 33) indica una interacción de tipo aditiva para ambas combinaciones a la *Dosis mediana* evaluada, ya que la $Dm_{experimental}$ (8.02 mg/kg y 6.35 mg/kg, respectivamente) cae dentro del área de aditividad. Así mismo en la curva del IC vs fa (Figura 34) se observa una interacción de tipo aditiva para $fa > 0.5$, lo cual concuerda con lo observado en el isoblograma.

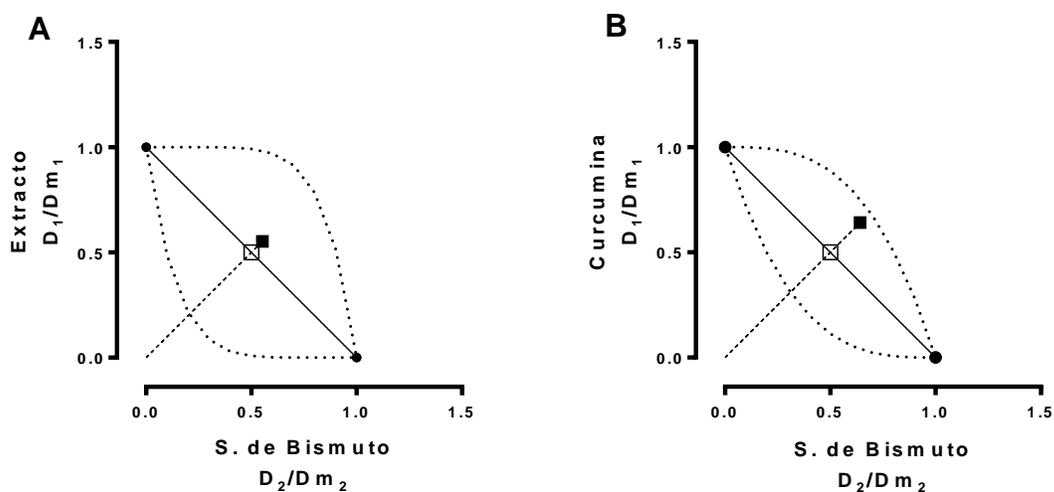


Figura 33. Isoblograma normalizado de la combinación extracto-s. de bismuto (A) y curcumina-s. de bismuto (B). Los puntos de la $Dm_{experimental}$ (\blacktriangle) (6.35 mg/kg y 8.02 mg/kg, respectivamente) fueron comparados contra la $Dm_{teórica}$ (\triangle) (5.75 mg/kg y 6.24 mg/kg, respectivamente).* Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) aplicando una prueba Mann-Whitney. Las líneas punteadas delimitan la zona de aditividad.

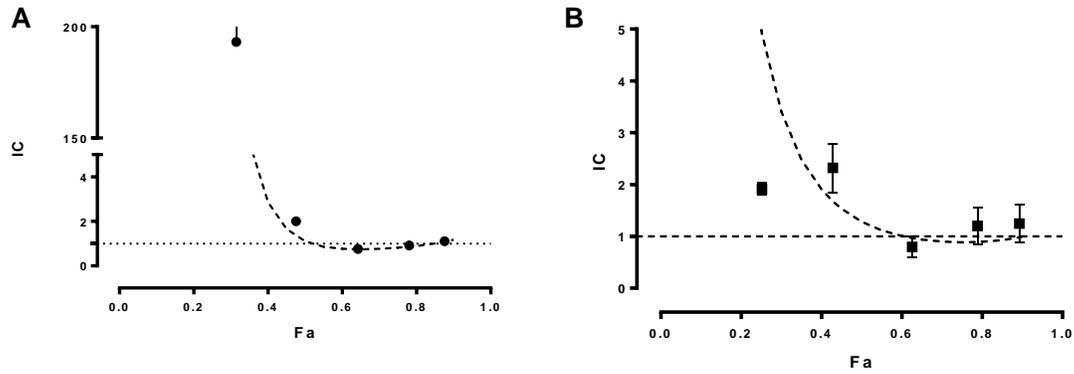


Figura 34. Curva del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (fa) de las combinaciones extracto-s. de bismuto (A) y curcumina-s. de bismuto (B) en una proporción 1:1. La línea discontinua (--) representa el comportamiento teórico de la combinación. Los valores de IC indican subaditividad, aditividad o superaditividad cuando $IC > 1$, $IC = 1$ o $IC < 1$, respectivamente. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 a 6 repeticiones.

6.6. Determinación de la Dosis mediana (Dm) y efecto gastroprotector del extracto y los curcuminoides individuales.

El cálculo de la Dm para el extracto y cada uno de los curcuminoides se llevó a cabo aplicando la *Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas*, descrita anteriormente (Chou, 2006). Todos los tratamientos presentaron un efecto gastroprotector dosis dependiente contra las lesiones ocasionadas por etanol absoluto (Figura 35). Los datos calculados para la Dm de cada tratamiento se muestran en la Tabla 6.

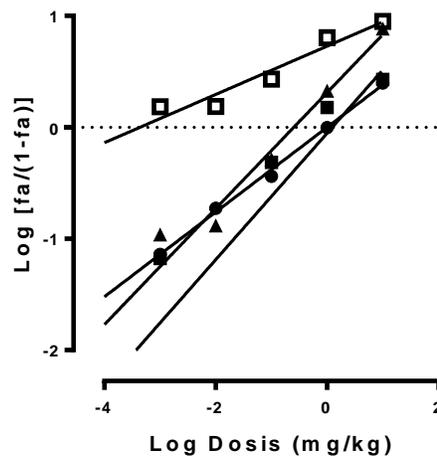


Figura 35. Curvas de ajuste de la *Ecuación del Efecto-mediana* para el cálculo de Dm de los diferentes tratamientos: extracto (\square), curcumina (\bullet), desmetoxicurcumina (\blacksquare) y bis-desmetoxicurcumina (\blacktriangle) (Chou, 2006). Cada punto representa la media de 4 a 6 repeticiones.

Fármaco	D_m (mg/kg)	m
Extracto	0.004	0.21
Curcumina	0.996	0.38
Desmetoxicurcumina	1.68	0.83
Bis-desmetoxicurcumina	0.25	0.52

Tabla 6. Dosis mediana (D_m) y valor de m (pendiente) para cada tratamiento, utilizando el ajuste de la Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas (Chou, 2006).

6.7. Evaluación de la interacción entre los curcuminoides.

6.7.1. Evaluación del extracto de *C. longa*.

La D_m calculada para el extracto (0.004 mg/kg) fue menor que para los curcuminoides individuales (curcumina: 0.99 mg/kg; desmetoxicurcumina 1.68 mg/kg; bis-desmetoxicurcumina: 0.25 mg/kg). De acuerdo con el análisis de combinaciones múltiples llevado a cabo mediante el cálculo del CI , los curcuminoides presentes en el extracto en una proporción 3.7:1:10 (para curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina; ver la sección Materiales y métodos) con respecto a sus D_m calculadas individuales, presentaron una interacción de tipo superaditiva para todas las fracciones afectadas (Figura 36). Se calculó el índice de reducción de la dosis para cada uno de los curcuminoides en el extracto (Figura 37).

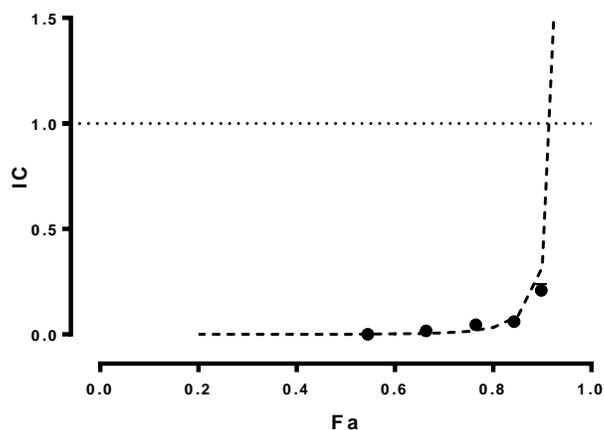


Figura 36. Curva del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (fa) del extracto de *C. longa*. La línea discontinua (--) representa el comportamiento teórico. Los valores de IC indican subaditividad, aditividad o superaditividad cuando $IC > 1$, $IC = 1$ o $IC < 1$, respectivamente. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 a 6 repeticiones.

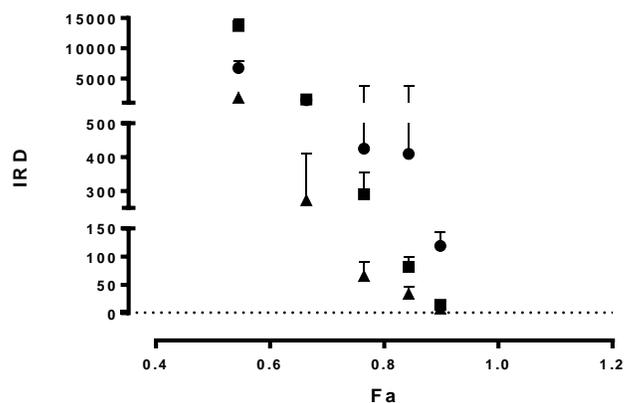


Figura 37. Gráfica del índice de reducción de la dosis (IRD) calculada para la curcumina (●), DMC (■) y BDMC (▲) en el Extracto de *C. longa*. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 a 6 repeticiones.

6.7.2. Combinación Curcumina-Desmetoxicurcumina-Bis-desmetoxicurcumina (1:1:1).

Se evaluó la interacción de los tres curcuminoides en una proporción 1:1:1 con respecto a su Dm individual, para determinar si la variación de las proporciones influye en el efecto gastroprotector del extracto. La Dm calculada (2.54 mg/kg) de la combinación triple (1:1:1)

fue mayor que para el extracto (0.004 mg/kg), incluso que la de los curcuminoides individuales (Figura 38).

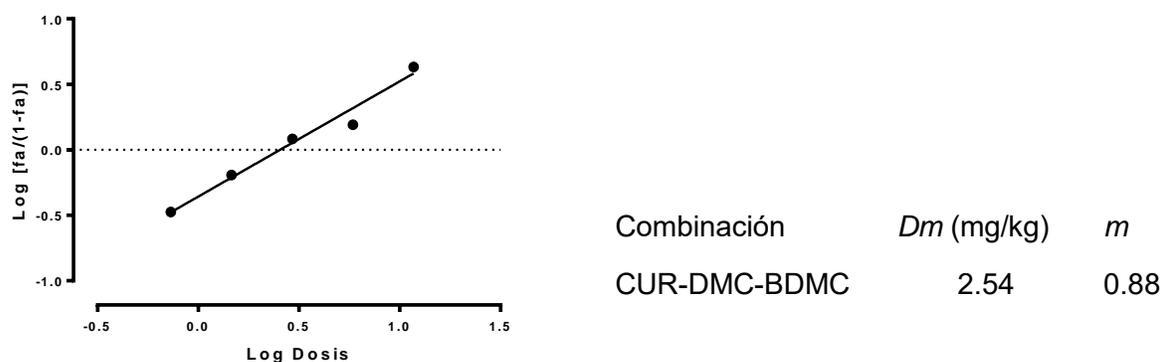


Figura 38. Curva de ajuste de la *Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas* para el cálculo de D_m de la combinación triple CUR-DMC-BDMC. Cada punto representa la media de 4 a 6 repeticiones.

La curva del índice de combinación (Figura 39) indica que la combinación triple (1:1:1) presenta una interacción de tipo subaditiva para $fa < 0.8$.

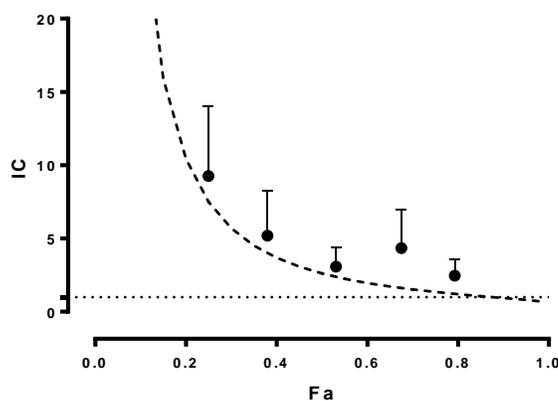


Figura 39. Curva del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (fa) de CUR-DMC-BDMC (1:1:1). La línea discontinua (--) representa el comportamiento teórico de la combinación. Los valores de IC indican subaditividad, aditividad o superaditividad cuando $IC > 1$, $IC = 1$ o $IC < 1$, respectivamente. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 a 6 repeticiones.

6.7.3. Combinación Curcumina-Desmetoxicurcumina y Curcumina-Bis-desmetoxicurcumina (1:1).

Con el objetivo de determinar la sinergia que existe entre los tres curcuminoides dentro del extracto, se evaluaron las combinaciones binarias curcumina-desmetoxicurcumina y

curcumina-bis-desmetoxicurcumina, ambas a una proporción 1:1 con respecto a sus D_m individuales, encontrando que las D_m calculadas para ambas combinaciones son mayores que para el extracto o los curcuminoides individuales (Figura 40). En ambos casos el análisis tanto isoblográfico (Figura 41) como el cálculo de CI (Figura 42), sugiere una interacción de tipo subaditiva.

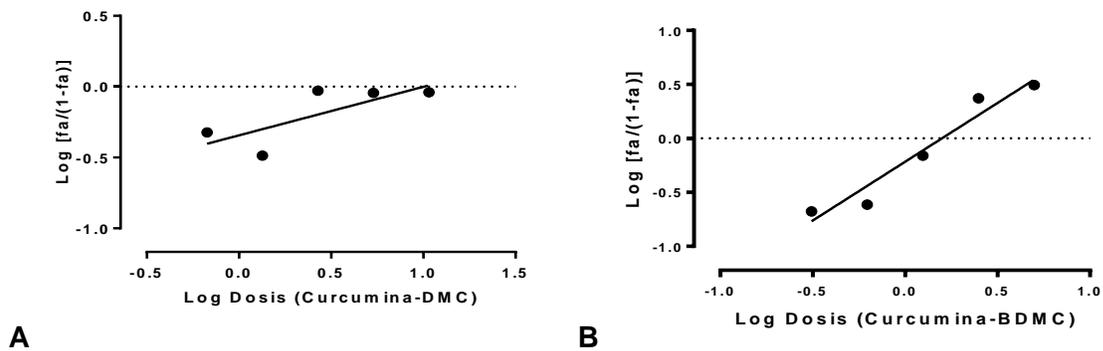


Figura 40. **A:** Curva de ajuste de la Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas para el cálculo de D_m de la combinación CUR-DMC (D_m : 10.05mg/kg). **B:** Curva de ajuste de la Ecuación del Efecto-mediana de la Ley de Acción de Masas para el cálculo de D_m de la combinación CUR-BDMC (D_m : 1.58 mg/kg). Cada punto representa la media de 4 a 6 repeticiones.

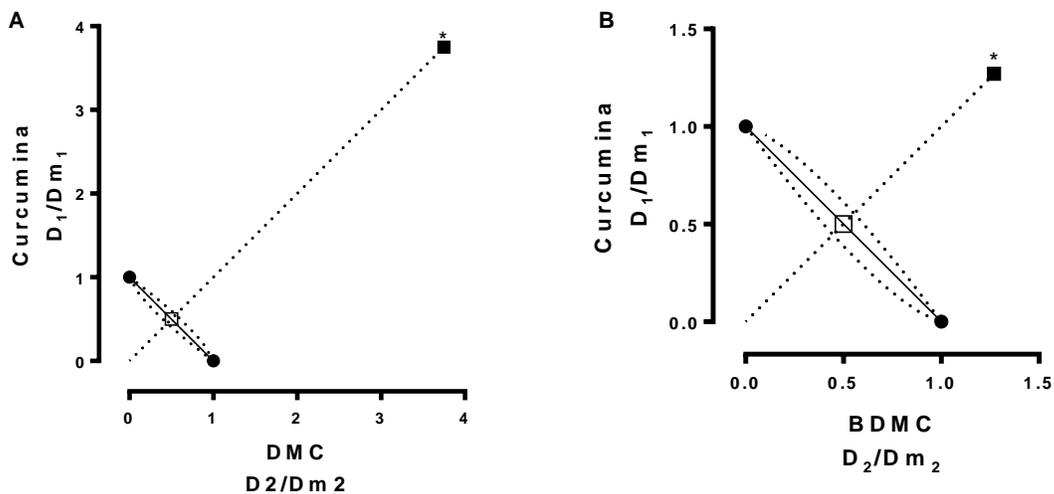


Figura 41. **A:** Isoblograma normalizado de la combinación Curcumina-DMC (1:1). La D_m experimental (10.05 mg/kg) calculada para la combinación (■) fue comparada contra la D_m teórica (1.34 mg/kg) (□). **B:** Isoblograma normalizado de la combinación Curcumina-BDMC (1:1). La D_m experimental (1.58 mg/kg) calculada para la combinación (■) fue comparada contra la D_m teórica (0.62 mg/kg) (□). *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) aplicando una prueba Mann-Whitney.

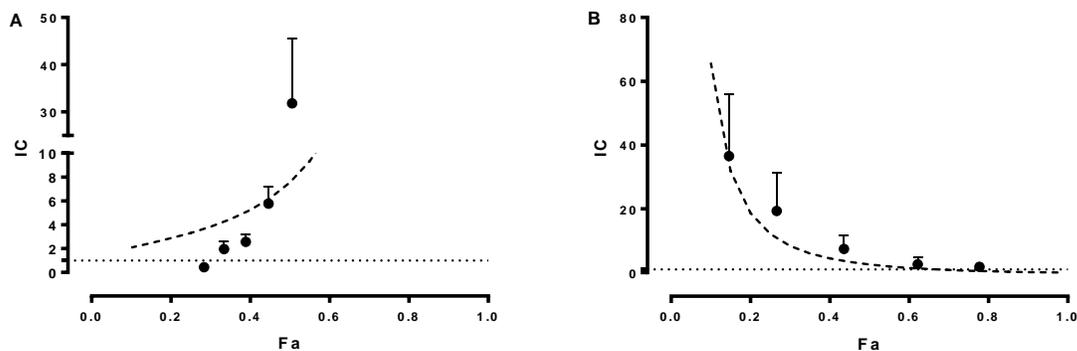


Figura 42. **A:** Curva del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (fa) de CUR-DMC en una proporción 1:1. **B:** Curva del índice de combinación (IC) vs la fracción afectada (fa) de CUR-BDMC en una proporción 1:1. La línea discontinua (--) representa el comportamiento teórico de la combinación. Los valores de IC indican subaditividad, aditividad o superaditividad cuando $IC > 1$, $IC = 1$ o $IC < 1$, respectivamente. Cada punto representa la media \pm EEM de 4 a 6 repeticiones.

6.8. Análisis histológico del tratamiento con los curcuminoides y el extracto.

En la Figura 43 se muestran los cortes representativos de los estómagos tratados con curcumina, desmetoxicurcumina y bis-desmetoxicurcumina, previo a la inducción del daño con etanol.

Así mismo, en la Figura 44 se observan los cortes representativos del tratamiento con el extracto y la combinación triple 1:1:1 (CUR-DMC-BDMC), comparados contra un control no ulcerado y un estómago que presenta necrosis y desprendimiento de la mucosa.

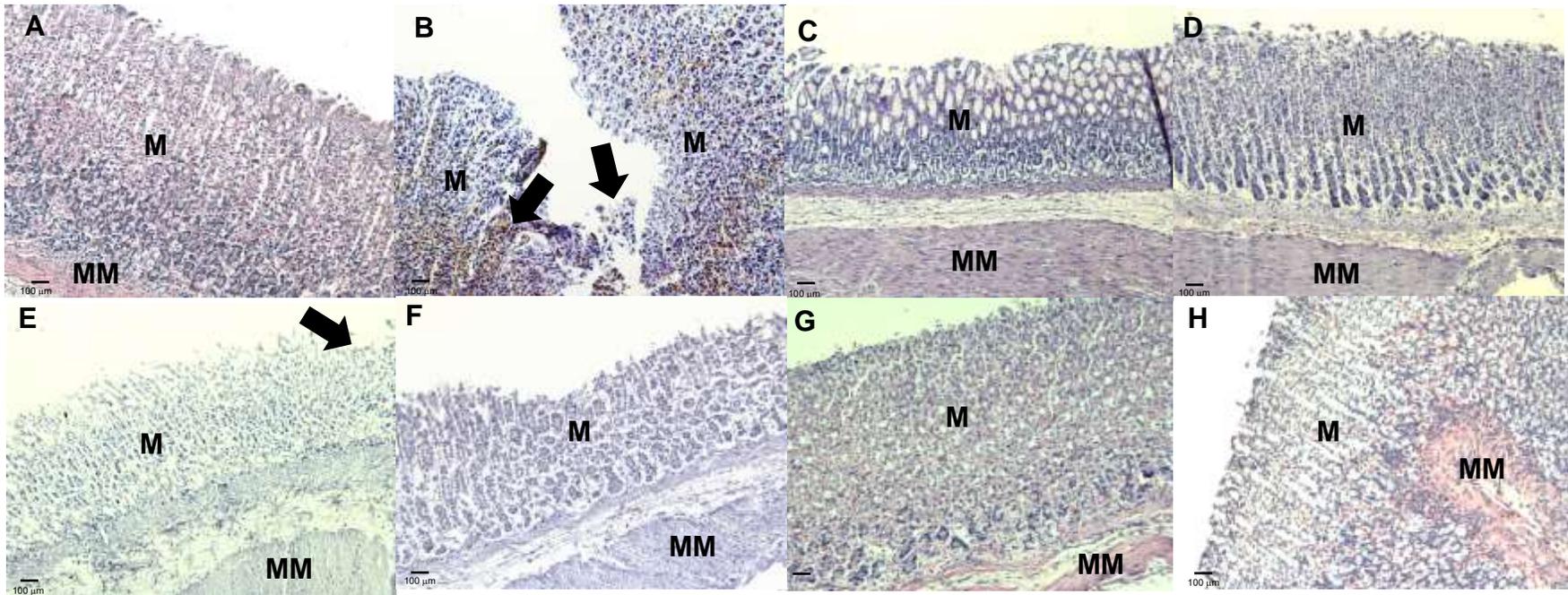


Figura 43. Cortes histológicos de la cavidad gástrica (aumento 10x). En la fila superior se muestra la integridad de la mucosa de un estómago control no ulcerado (A), el daño a la mucosa de un estómago ulcerado (B), comparados con los estómagos tratados con curcumina a la dosis de 1mg/kg y 10 mg/kg (C y D, respectivamente). En la fila inferior se encuentran los estómagos tratados con demetoxicurcumina 1mg/kg y 10 mg/kg (E y F, respectivamente), y bis-desmetoxicurcumina a 1mg/kg y 10 mg/kg (G y H, respectivamente). MM= *muscularis mucosae*. Las flechas indican necrosis y pérdida de la mucosa.

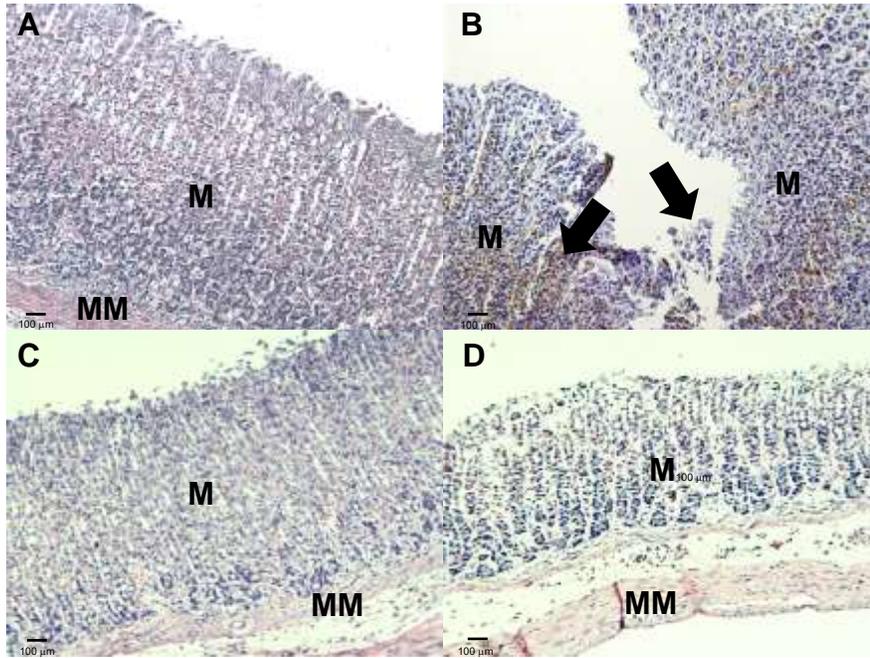


Figura 44. Cortes histológicos de la cavidad gástrica (aumento 10x) de un estómago control no ulcerado (**A**) versus un estómago ulcerado (**B**). Las imágenes **C** y **D** muestran una porción de los estómagos tratados con el extracto (10 mg/kg) y la combinación triple 1:1:1 (CUR-DMC-BDMC, 11.68 mg/kg), respectivamente. M= *mucosae* (mucosa), MM= *muscularis mucosae*. Las flechas indican necrosis y pérdida de la mucosa.

7. DISCUSIÓN.

El análisis por CLAR/EM de la composición relativa de los curcuminoides presentes en el extracto de *Curcuma longa* se mantiene constante independientemente de utilizar etanol, acetona o metanol para su extracción (Figura 29). Así mismo, en el caso de la extracción por Soxhlet con acetona y por sonicación, ambos extractos resultaron contener proporciones similares de curcuminoides (Tabla 4). Este resultado es de suma importancia, ya que se puede optimizar la obtención del extracto reduciendo tiempo y costos.

Como se muestra en la Figura 30, tanto el extracto, la curcumina y los fármacos, ranitidina y subsalicilato de bismuto, presentaron un efecto gastroprotector dosis dependiente que previno el daño inducido con etanol en ratas.

El mecanismo por el cual el etanol es un agente necrosante de la mucosa gástrica involucra la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden ser neutralizadas por los curcuminoides, debido a su importante actividad antioxidante descrita anteriormente (Kwiecień et al., 2002). Así pues, se sugiere que el mecanismo antiinflamatorio y antioxidante del extracto y la curcumina está involucrado en el efecto gastroprotector presentado en este estudio (Epstein et al. 2010).

Por otro lado, se sabe que la ranitidina es un antagonista de los receptores de histamina H_2 , y su actividad se encuentra relacionada con la disminución de la actividad gástrica (Tuskey y Peura, 2013). En el caso del subsalicilato de bismuto, su principal mecanismo de acción es crear una barrera protectora sobre la mucosa gástrica, así como favorecer la secreción de bicarbonato y moco (Tanaka et al., 1997; Bagchi et al., 1998).

Los resultados de este estudio muestran que el extracto y la curcumina son los agentes gastroprotectores más potentes en el modelo de inducción de daño con etanol, en comparación con la ranitidina y el subsalicilato de bismuto.

Como se mencionó anteriormente, el efecto gastroprotector de la curcumina involucra diferentes mecanismos de acción, principalmente como antioxidante y antiinflamatorio, ya que regula mediadores importantes como la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) (REF). Kim y colaboradores (2005) reportaron que el extracto de acetato de etilo de *C. longa* disminuye la liberación de ácido gástrico, debido a un efecto antagonista de los receptores de histamina H_2 , un efecto similar al de la ranitidina. Sin embargo, en este mismo estudio se

reportó que la curcumina no posee dicho efecto antagonista de los receptores de histamina (Kim et al., 2005). Por lo que, el estudio de la interacción entre el extracto de cúrcuma, así como de su principal metabolito, curcumina, en coadministración con ranitidina es de suma importancia, para establecer si existe una interacción favorable o no.

El análisis de las interacciones se llevó a cabo mediante el cálculo del índice de combinación y la construcción de los isobogramas correspondientes. En ambos análisis se pudo evidenciar un efecto subaditivo cuando el extracto o la curcumina son administrados alrededor de 5 min antes que la ranitidina en una combinación 1:1 con respecto a su dosis mediana (Figuras 31 y 32). El análisis isobolográfico demuestra que la $DmEXP$ para la combinación con el extracto o la curcumina (31.11 y 31.79 mg/kg, respectivamente) fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en las Figuras 31A y 31B al valor teórico ($DmTEO$: 8.70 y 9.19 mg/kg).

Para evaluar si existió alguna interacción química entre ambas moléculas en las condiciones del estómago, se realizó un análisis utilizando CLAR/EM, la presencia de señales distintas a la curcumina o ranitidina en el cromatograma sugerirían una reacción entre ambas moléculas. Los espectros de masas se emplearon para la identificación de los compuestos en la mezcla.

Los compuestos curcumina y ranitidina se colocaron en contacto a cantidades iguales (3mg), en una solución acuosa de ácido clorhídrico [0.1M], pH 1 por dos horas. Al finalizar el periodo de contacto se realizó una dilución de la muestra 1:10 en metanol, para facilitar la solubilidad de la curcumina y la inyección en el equipo. Las condiciones del análisis fueron iguales a las descritas anteriormente para el extracto.

El cromatograma de la muestra y los espectros de masas, se muestran en la Figura 45.

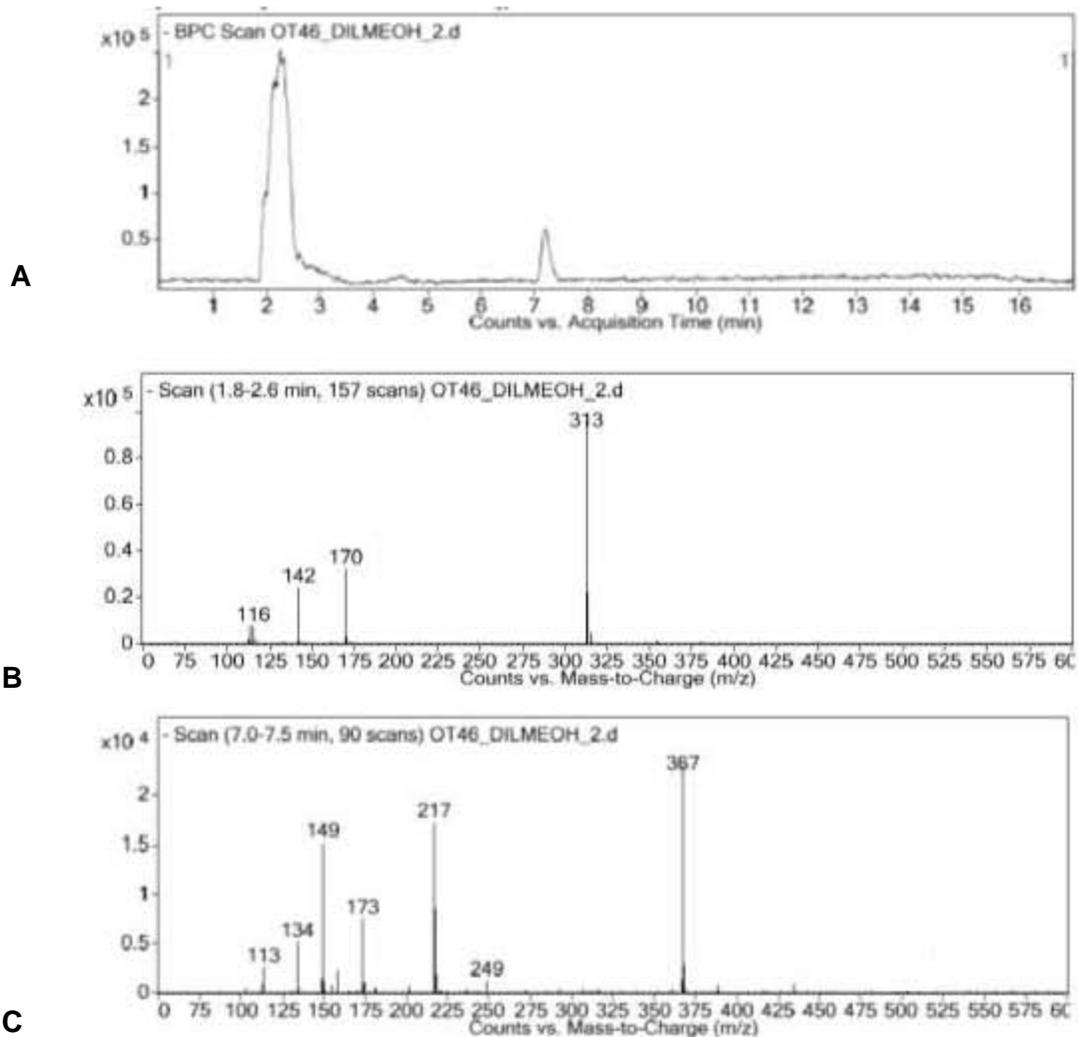


Figura 45. **A**: cromatograma de la combinación curcumina-ranitidina. **B**: espectro de masas del pico observado a 1.8-2.6 min, en el cual el pico base corresponde con la masa molecular de la ranitidina m/z 313 (M-H). **C**: espectro de masas del pico observado a 7.0-7.5 min, en el cual el pico base corresponde con la masa molecular de la curcumina m/z 367 (M-H). Modo de ionización, ESI negativo

Dentro de los resultados, no se encontraron nuevas señales en el cromatograma de la mezcla, lo cual sugiere que no hubo interacción química entre las moléculas. Por lo que el mecanismo antagonista que presentan el extracto y la curcumina frente al efecto gastroprotector de la ranitidina, no está relacionado con una interacción entre las moléculas.

En ambos casos, cuando el extracto o la curcumina se administraron antes que la ranitidina, el efecto presentado fue subaditivo. Cabe destacar que cuando se disecaron los estómagos tratados, se observó que la curcumina y el extracto formaban una capa amarilla sobre la mucosa gástrica. Por lo que se decidió evaluar si la curcumina, el extracto y los demás curcuminoides poseían propiedades mucoadhesivas. La mucoadhesión podría explicar el efecto subaditivo de la curcumina y el extracto sobre la ranitidina, ya que esta capa formada sobre la mucosa gástrica retardaría la absorción de la ranitidina y por lo tanto su efecto gastroprotector.

Es por ello, que se decidió realizar la evaluación de la mucoadhesión de las suspensiones empleadas en la administración del extracto y los tres curcuminoides, mediante un método reológico. Las condiciones empleadas para el análisis se describen en la metodología.

Para comenzar el estudio, las diferentes suspensiones se caracterizaron a diferente temperatura (25° y 37° C) y pH 1.6, simulando las condiciones gástricas.

En las curvas de flujo de cizalla simple (Figura 46) se observó un comportamiento no newtoniano del tipo adelgazante al flujo a $37.0 \pm 1^\circ \text{C}$, pH 1.6, para todas las suspensiones. Se determinó el efecto de la temperatura, donde en todos los casos su viscosidad disminuyó al aumentar la temperatura de 25° a 37° C, sin embargo, su estructura permanece estable con dicha variación. Por otro lado, en las curvas de flujo oscilatorio, el módulo viscoso (G') predomina en el comportamiento de las mezclas a estas condiciones. En la Figura 38 se muestran los gráficos mecánicos de flujo oscilatorio de baja amplitud de deformación ($\gamma < 5\%$), donde se sigue la evolución de los módulos G' y G'' con respecto al flujo, y se observa que en todos los cursos el módulo $G'' > G'$, demostrando un comportamiento “pseudo-sólido” para todas las mezclas. En la Figura 48 se puede observar que todas las mezclas mostraron valores de $\Delta G'$ y $\Delta G''$ positivos, lo cual indica un sinergismo reológico. Éste sinergismo indica que existe una interacción entre los componentes de la mezcla, lo que sugiere mucoadhesión (Hägerström et al., 2000). En la mezcla del extracto-mucina, G'' fue mayor que G' con una meseta independiente a la frecuencia, lo cual ha sido relacionado previamente con la mucoadhesión (García-Guzmán et al., 2018). La mezcla de mucina con curcumina o bis-desmetoxicurcumina (Figura 47A y 47D) presentan un mayor comportamiento “pseudo-sólido”, lo cual indica mayor interacción entre sus componentes y por lo tanto, sugiriendo mayor mucoadhesión en comparación con el extracto y la desmetoxicurcumina, los cuales

también presentan esta característica. Los valores de sinergismo mayores se observaron a frecuencias altas, es decir a tiempos cortos de estudio (Figura 48). Todas las suspensiones evaluadas (el extracto, la curcumina, la desmetoxicurcumina y la bis-desmetoxicurcumina) presentaron mucoadhesión bajo las condiciones del estudio (Figura 48).

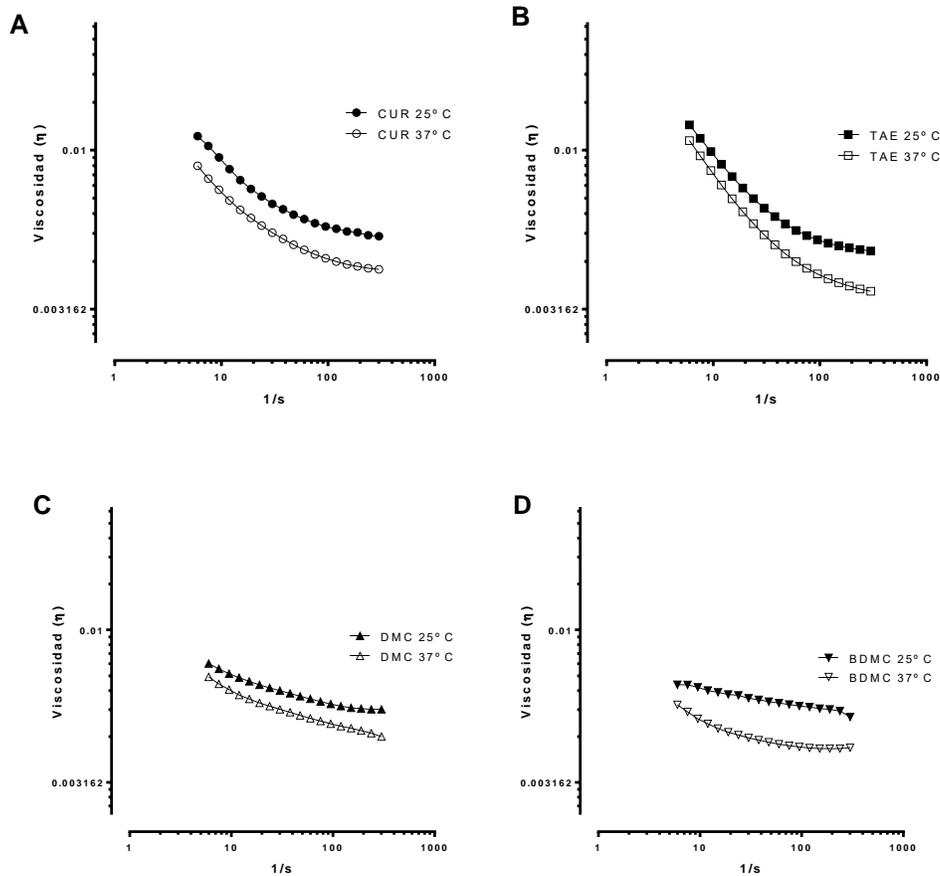


Figura 46. Gráficos de la prueba de cizalla simple para las diferentes suspensiones, curcumina (A), extracto (B), desmetoxicurcumina (C) y bis-desmetoxicurcumina (D) a 25° C y 37° C.

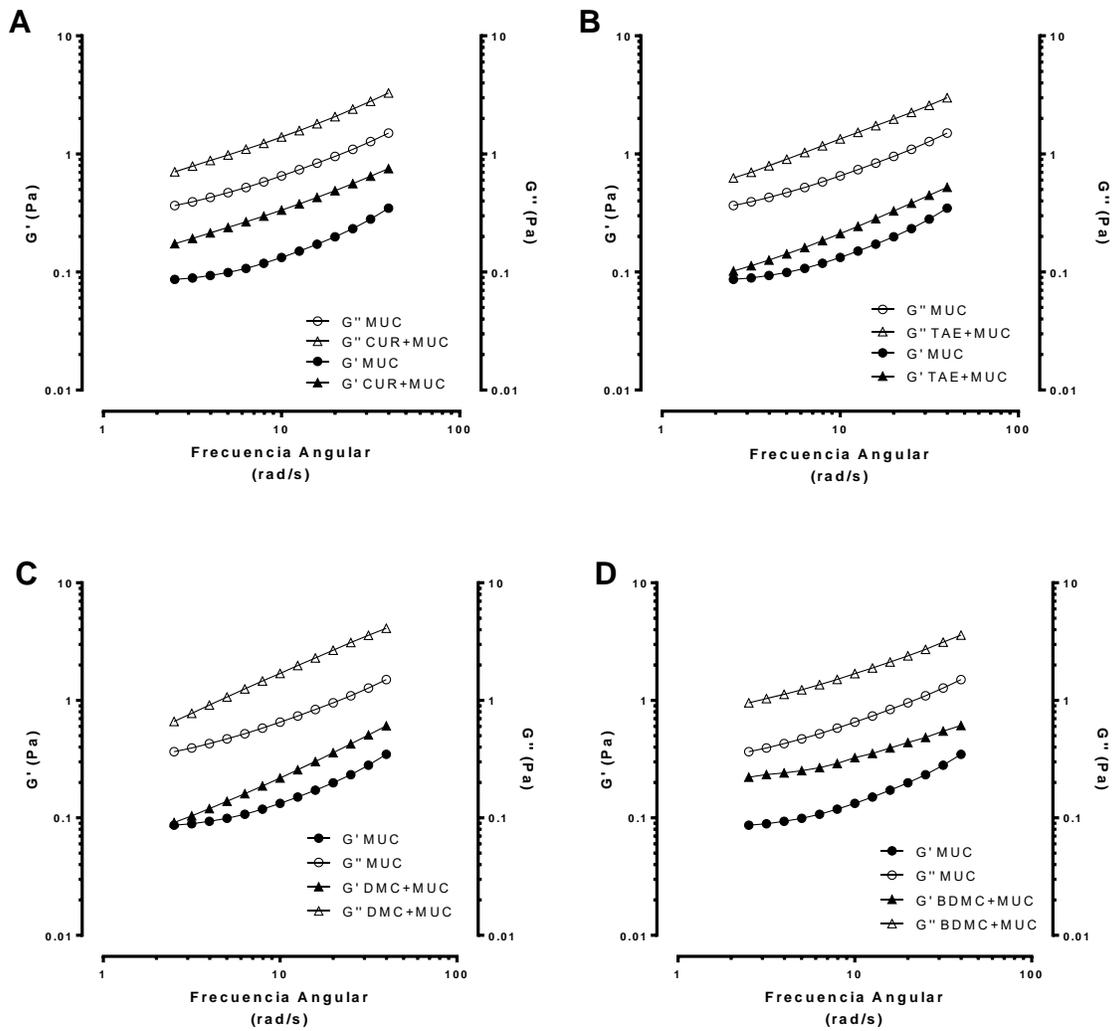


Figura 47. Gráficos comparativos de G' y G'' de mucina sola dispersa, y cada una de las mezclas de curcuminoides con mucina (**A**: curcumina; **B**: extracto de *C. longa*; **C**: desmetoxicurcumina; **D**: bis-desmetoxicurcumina).

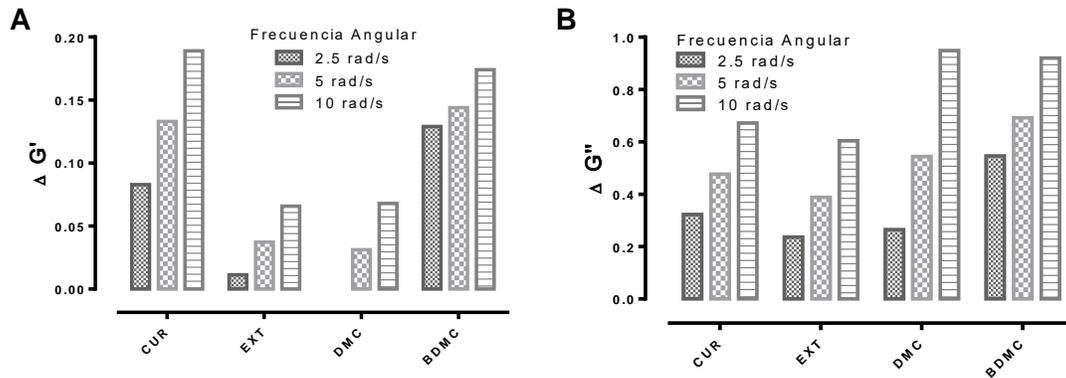


Figura 48. Sinergismo de los parámetros de sinergismo reológico $\Delta G'$ (A) y $\Delta G''$ (B) de los diferentes sistemas a distintas frecuencias angulares (2.5, 5, 10 rad/s).

Con intención de evaluar si la mucoadhesión presentada por la curcumina y el extracto se encontraba relacionada con el mecanismo antagonista, se decidió invertir el orden de administración. Siendo la ranitidina administrada 15 min previos al extracto o la curcumina, para permitir su absorción.

En la Figura 49 se muestra el isoblograma normalizado de la combinación, donde se puede apreciar que la *Dm experimental* (7.66 mg/kg) cae dentro del área de aditividad y no existe diferencia significativa con respecto a la *Dm teórica* (9.19 mg/kg). Esto sugiere que el mecanismo antagonista del extracto o la curcumina, se encuentra relacionado con la mucoadhesión determinada por el método reológico.

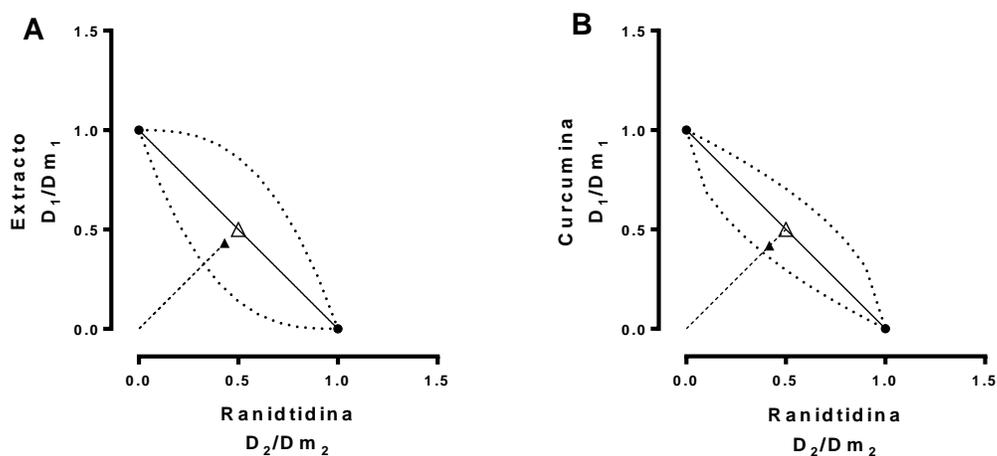


Figura 49. Isoblograma normalizado de la combinación (A) ranitidina-extracto y (B) ranitidina-curcumina. Los puntos de la *Dm experimental* (▲) (7.49 mg/kg y 7.66 mg/kg, respectivamente) fueron comparados contra la *Dm teórica* (Δ) (8.79 mg/kg y 9.19 mg/kg, respectivamente).* Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) aplicando una prueba Mann-Withney. Las líneas punteadas delimitan la zona de aditividad.

Los resultados de este estudio sugieren que, además de los mecanismos de acción reportados para *C. longa* y los curcuminoides, como agentes antioxidantes y antiinflamatorios, su mucoadhesión podría considerarse como un mecanismo de barrera física relacionado con el alivio de heridas cutáneas y úlceras gástricas.

Es muy probable que la barrera física formada por el extracto y la curcumina, cuando interactúan con la mucina, es la responsable de la subaditividad del efecto de la ranitidina. Estos resultados son de gran relevancia para los pacientes que consumen cúrcuma como suplemento alimenticio o medicina alternativa para el tratamiento de úlcera péptica u otras enfermedades, por lo que se recomienda que la administración de los fármacos sean al menos 15 min antes del consumo de cúrcuma, para evitar la disminución en la absorción de los mismos.

Como se mencionó en los antecedentes, algunos estudios reportan la presencia de curcumina en el tracto gastrointestinal (Epstein et al., 2010), lo cual permite su interacción con algunas de las principales proteínas de transporte. Al respecto, se sabe que tanto el extracto como la curcumina modula algunas de las proteínas de transporte ABC (ATP-binding cassette, por sus siglas en inglés), pudiendo afectar la absorción de algunos medicamentos (Adiwidjaja et al., 2017; Bahramsoltani et al., 2017). Además, modula la expresión de la familia de citocromos P450 (CYP450) en intestino, hígado y riñón, modificando el metabolismo de varios fármacos (Zhang et al., 2007; Bahramsoltani et al., 2017). Sin embargo, éste es el primer estudio en el cual se evidencia la interacción de la curcumina y los otros curcuminoides con la mucina, proponiendo la mucoadhesión como un mecanismo de interacción adicional, que podría afectar la absorción de fármacos administrados concomitantemente.

Por otra parte, la coadministración del extracto o la curcumina con el subsalicilato de bismuto (en una proporción 1:1 con respecto a su dosis mediana) no mostró interacción farmacológica (Figuras 33A y 33B). La *DmEXP* de las combinaciones no presentó diferencia estadística con respecto a la *DmTeo*. El análisis del índice de combinación muestra un comportamiento dual para ambas combinaciones, mientras que para $fa < 0.5$ presenta un efecto subaditivo para $fa \geq 0.5$ muestra un efecto aditivo (Figuras 34A y 34B). Este comportamiento del índice de combinación indica que las dosis mayores a la dosis mediana son adecuadas para la coadministración del extracto o curcumina con subsalicilato de bismuto. Sin embargo, se debe de tener precaución con aquellas dosis por debajo de la dosis mediana.

El estudio de la interacción química entre la curcumina y el subsalicilato de bismuto, en las condiciones del estómago, se llevó a cabo mediante Espectroscopía de Infrarrojo (IR) para la identificación de nuevos grupos funcionales en caso de una posible reacción.

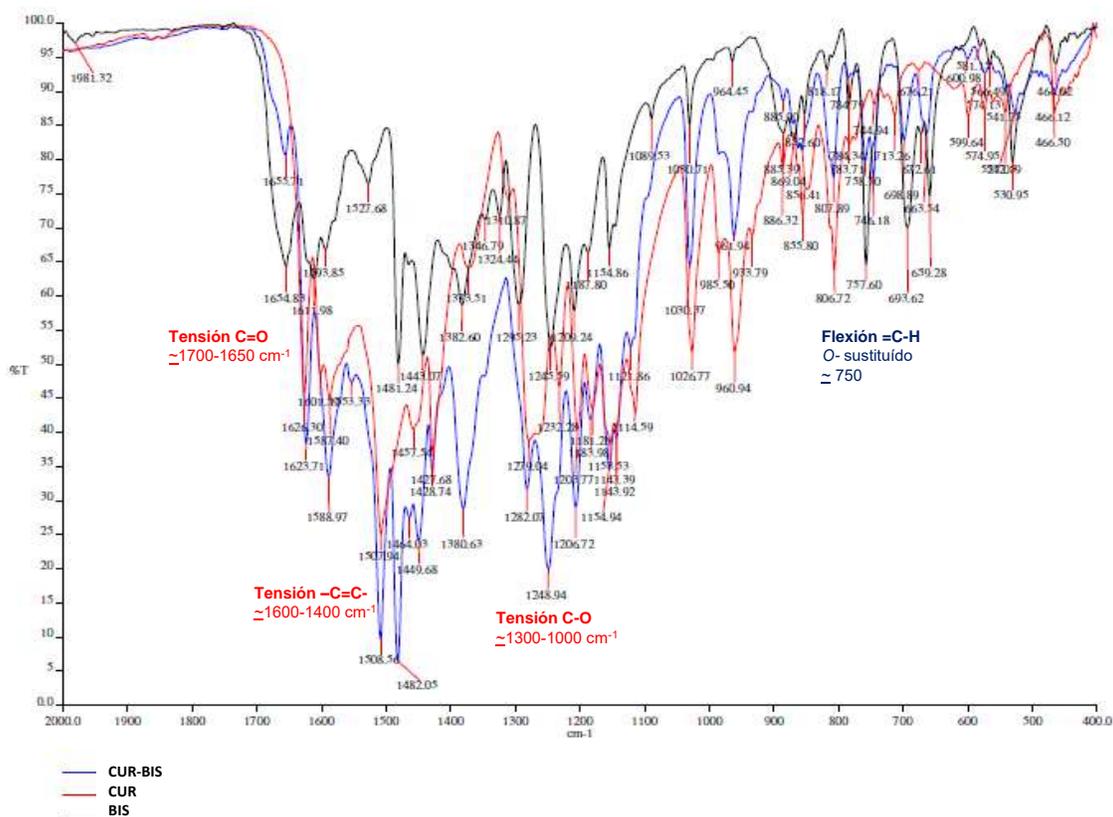


Figura 50. Espectro de absorción en infrarrojo de la curcumina (línea continua roja), del subsalicilato de bismuto (línea continua negra) y de la mezcla de ambos compuestos (línea continua azul).

El análisis de los espectros no indica la formación de nuevos grupos funcionales en la combinación (Figura 50). Por lo que el efecto aditivo presentado sólo puede relacionarse con la sumatoria de los efectos farmacológicos de los tratamientos. Son necesarios estudios posteriores para aclarar el mecanismo por el cual se presenta subaditividad a dosis menores a la dosis mediana.

Se ha sugerido que parte del mecanismo molecular de las sales de bismuto son la inducción de prostaglandinas y la secreción de bicarbonato (Tanaka et al., 1997), lo cual podría verse involucrado en el comportamiento de la curva del índice de combinación. Por otro lado, el efecto aditivo observado a la dosis mediana, podría estar relacionado con el principal mecanismo de acción de las sales de bismuto, el cual es cubrir la úlcera para facilitar su pronta recuperación y evitar mayor daño (Tanaka et al., 1997). Así mismo,

como ya se mencionó anteriormente, tanto el extracto como la curcumina presentaron mucoadhesión, la cual puede facilitar el alivio de las úlceras gástricas. En este caso, ambos tratamientos comparten un mismo mecanismo de acción, por lo que al ser combinados se puede observar la aditividad de los efectos de ambos tratamientos.

Es común encontrar en los mercados diferentes remedios herbolarios a la venta como extractos crudos o como la simple droga cruda sin tratamiento previo más que el secado. En algunas ocasiones se pueden encontrar incluso mezclas de plantas. Esto ha cambiado la idea de que sólo existe un componente activo responsable del efecto terapéutico de una planta, ya que los estudios recientes han demostrado que varios metabolitos pueden actuar de manera sinergista (Williamson, 2001). Este hecho podría explicar por qué los extractos son eficaces a pesar de las bajas concentraciones de los metabolitos, o por qué en algunas ocasiones un extracto pierde su eficacia al ser fraccionado (Williamson, 2001; Efferth y Koch, 2011). Además, varios estudios indican una mejor eficacia de los extractos que los compuestos aislados (Williams et al., 2003; Mishra et al., 2010; Ye et al., 2010; Batarseh et al., 2017; Chithambo et al., 2017; Nicasio-Torres et al., 2017). El incremento de la actividad biológica mostrada por los extractos es atribuido a la sinergia entre los componentes. Sin embargo, son muy pocos los estudios que demuestran experimentalmente la sinergia de los metabolitos individuales, utilizando modelos matemáticos como el índice de combinación y el isoblograma. Además, son menos los estudios que abordan la influencia de las proporciones de estos metabolitos en la eficacia terapéutica.

La eficacia de los extractos recae en la gran variedad de metabolitos presentes, los cuales poseen diferentes blancos de acción, resultando en una eficacia mayor que los compuestos individuales (Gilbert y Alves, 2003; Efferth y Koch, 2011).

Cabe destacar que tanto el extracto y los tres curcuminoides principales poseen eficacia comprobada de gastroprotección en diferentes modelos de inducción de úlcera (Kim et al., 2005; Mahattanadul et al., 2009; Rahim et al., 2014; Rouhollahi et al., 2014; Sharma et al., 2012). Sin embargo, no existe evidencia previa que demuestre la sinergia de los metabolitos individuales contenidos en el extracto.

Los resultados de este estudio muestran que tanto el tratamiento con los curcuminoides individuales y con el extracto, presentan eficacia dosis-dependiente contra el daño gástrico inducido con etanol en ratas (Figura 35). Como se mencionó anteriormente, esto puede relacionarse con la actividad antioxidante de los curcuminoides, el cual es su

principal mecanismo de acción (Epstein et al., 2010). En este caso, el extracto acetónico de *C. longa* mostró una mayor potencia (Dm 0.004 mg/kg) que los curcuminoides individuales (CUR Dm 0.99 mg/kg; DMC Dm 1.68 mg/kg; BDMC Dm 0.25 mg/kg; Figura 35), debido a un posible sinergismo entre sus metabolitos.

Antes de preparar las combinaciones de los curcuminoides para su análisis de interacción, fue preciso determinar la proporción relativa a la cual se encontraban éstos en el extracto mediante CLAR/EM. En dicho análisis se encontró a la curcumina en un $46.3 \pm 0.98\%$, la desmetoxicurcumina en $21.4 \pm 0.86\%$ y la bis-desmetoxicurcumina en $32.3 \pm 0.57\%$ (Figuras 25 a 28). A partir de estos porcentajes, se calculó la proporción de cada curcuminoide dentro del extracto con respecto a su dosis mediana. La proporción calculada fue: 3.7 veces la Dm de la curcumina, 1 Dm de desmetoxicurcumina y 10 veces la Dm de bis-desmetoxicurcumina (3.7:1:10, CUR:DMC:BDMC).

Como se mencionó anteriormente, el extracto presentó mayor potencia que los curcuminoides individuales, por lo que se decidió evaluar las combinaciones binarias curcumina-desmetoxicurcumina y curcumina-bis-desmetoxicurcumina (CUR-DMC y CUR-BDMC, respectivamente) en una proporción 1:1 con respecto a su Dm , para evaluar si la ausencia de uno de los curcuminoides afecta la actividad gastroprotectora. Las curvas de los isobogramas normalizados de ambas combinaciones (Figuras 41A y 41B) indican una interacción de tipo subaditiva, debido a que la Dm_{EXP} es mayor estadísticamente que la Dm_{TEO} . Las curvas del índice de combinación corroboran los resultados de los isobogramas en ambos casos. El índice de combinación es mayor a 1 para las $fa < 0.9$, lo que indica que para casi todas las dosis probadas la interacción es subaditiva en ambas combinaciones (Figuras 40A y 40B). Estos resultados sugieren que es necesaria la presencia de los tres curcuminoides para proteger la mucosa gástrica frente al daño inducido con etanol.

Como se mencionó con anterioridad, es bien conocido que los extractos crudos en ocasiones muestran mayor actividad que sus metabolitos aislados (Gilbert y Alves, 2003). Es importante considerar que una enfermedad o condición de salud adversa, involucra diversos factores y mediadores moleculares que a su vez se vuelven blancos de acción para la terapéutica. Las interacciones sinérgicas entre los metabolitos de una planta son debidas a los múltiples blancos moleculares que poseen (Williamson, 2001; Efferth y Koch, 2011).

A pesar de las similitudes estructurales de los curcuminoides, algunos reportes sugieren ciertas diferencias en su mecanismo gastroprotector. Se sabe que la curcumina favorece la recuperación de la úlcera gástrica a partir de la estimulación de la angiogénesis y restitución de fibras de colágeno (Sharma et al., 2012), además de modular varios de los mediadores antiinflamatorios y actuar como neutralizador de radicales libres (Epstein et al, 2010). Mahattanadul y colaboradores (2009) reportaron que la bis-desmetoxicurcumina mostró una actividad regenerativa similar a la curcumina, este metabolito también presentó una mayor inhibición de la secreción gástrica que la curcumina. No existe evidencia acerca del tratamiento para úlcera gástrica con desmetoxicurcumina o de su mecanismo de acción, sin embargo se sabe que es capaz de modular el NF- κ B, el cual está involucrado con la respuesta inflamatoria (Sandur et al. 2007). Kim y colaboradores (2005) reportaron que el extracto de acetato de etilo de *C. longa* previene el daño gástrico en ratas en el modelo de ligadura del píloro, debido a la disminución de la secreción gástrica por antagonismo de los receptores de histamina H₂, similar al mecanismo de la ranitidina; sin embargo, en este mismo estudio se reportó que la curcumina no antagoniza dichos receptores. La actividad hacia diferentes blancos moleculares que poseen los curcuminoides podría explicar el efecto gastroprotector sinergista observado por el extracto de *C. longa*.

Cuando se evaluó la combinación triple de curcuminoides a una proporción fija 1:1:1 con respecto a su dosis mediana, se observó un efecto subaditivo, el cual difiere de los resultados observados para el extracto, donde la proporción de los curcuminoides fue 3.7:1:10 (CUR:DMC:BDMC). La *Dm* calculada (2.54 mg/kg) fue mayor que para el extracto o los curcuminoides individuales (Figura 38). La curva del índice de combinación para el extracto (Figura 36), demuestra que los componentes en el extracto tienen una interacción sinergista a todos los niveles de *fa* con valores menores a 1. Mientras que, los valores calculados para la combinación 1:1:1 fueron mayores a 1 para *fa* <0.9, indicando una interacción de tipo subaditiva (Figura 39). Debido a que todas las dosis del extracto presentan una interacción sinergista, el índice de reducción de la dosis fue calculado, para cada curcuminoide dentro del extracto. Indicando una reducción de la dosis favorable para cada curcuminoide a todos los niveles de *fa* evaluados (Figura 37).

Otro punto importante a considerar, es que en el extracto se encuentran otros componentes en menor proporción, diferentes a los curcuminoides principales, que podrían estar actuando como coadyuvantes del efecto gastroprotector. Existe evidencia previa de la presencia de ácido cafeico y ácido cinámico en el extracto de *Curcuma longa*

(Ravindran, *et al.*, 2007). Se ha reportado que estos metabolitos poseen actividad antiinflamatoria y como neutralizadores de especies reactivas de oxígeno (Khan, *et al.*, 2016; de Cássia da Silveira *et al.*, 2014), además de que se ha demostrado el efecto gastroprotector del ácido cinámico (Jung, *et al.*, 2011). Sin embargo, estos dos componentes no fueron detectados en el extracto acetónico con el que se trabajó en este estudio. Aun así, se debe tener en cuenta la presencia de otros componentes en el extracto que podrían estar involucrados en el sinergismo observado.

El análisis histológico muestra que el extracto y la combinación CUR-DMC-BDMC 1:1:1 son efectivas contra el daño inducido por etanol a las dosis más altas evaluadas (Figura 44), comparadas contra un control ulcerado. Sin embargo, la combinación triple 1:1:1 fue menos potente que el extracto, además de observarse que la integridad de la mucosa se conserva mejor en el estómago tratado con el extracto, ya que posee mayor similitud al control sano (Figura 44).

Los resultados de este trabajo sugieren que la presencia de los tres curcuminoides es necesaria para mantener una gastroprotección eficaz. Sin embargo, la proporción a la cual se encuentran los tres curcuminoides principales tiene una mayor influencia y este parámetro sugiere ser de mayor importancia para el efecto gastroprotector que la presencia de los tres compuestos.

8. CONCLUSIONES.

- El extracto de *C. longa* y los curcuminoides presentaron actividad gastroprotectora dosis dependiente, siendo más potentes que los fármacos de venta libre, en el modelo de daño gástrico inducido con etanol.
- La interacción del extracto o la curcumina en combinación con ranitidina fue de tipo subaditiva, cuando la administración de la curcumina o el extracto es antes que la ranitidina. Los resultados del estudio reológico sugieren que la mucoadhesión presentada, podría estar involucrada en el mecanismo subaditivo del extracto y la curcumina con el efecto de la ranitidina.
- La mucoadhesión presentada podría sugerir otro mecanismo de gastroprotección, además de los ya conocidos (anti-inflamatorio y antioxidante) para la *Curcuma longa* y los curcuminoides.
- La administración del extracto o curcumina con subsalicilato de bismuto resultó ser de tipo aditiva, en las condiciones evaluadas. Por lo que, la aditividad de los efectos de los tratamientos es farmacológica.
- El extracto presentó mayor actividad gastroprotectora, que los curcuminoides individuales, sus combinaciones binarias o la combinación triple (1:1:1), en el modelo de daño con etanol, lo que sugiere que las proporciones de los curcuminoides en el extracto son importantes para mantener su potencia.

Perspectivas

- Evaluar el perfil farmacocinético de la ranitidina administrada después de la curcumina o el extracto, para demostrar si a mucoadhesión de éstos afecta los parámetros farmacocinéticos y la biodisponibilidad del fármaco antiulceroso.
- Determinar el tipo de interacción farmacodinámica sobre el efecto gastroprotector de los principales curcuminoides evaluando diferentes proporciones a las del extracto.
- Evaluar la capacidad de recuperación por el extracto o los curcuminoides, posteriores al daño gástrico inducido.
- Evaluar el efecto gastroprotector de otros curcuminoides (tetrahidrocurcumina) y su combinación con fármacos antiulcerosos.

Referencias

- Adiwidjaja J., McLachlan A.J., Boddy A.V. 2017. Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 13(9): 953-972
- Ammon H. P., Wahl M. A. 1990. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 57(1):1-7
- Bahramsoltani R., Rahimi R., Farzaei M.H. 2017. Pharmacokinetic interactions of curcuminoids with conventional drugs: A review. *J Ethnopharmacol.* 14 (209): 1-12
- Balint G. A. 1998. A possible molecular basis of the effect of gastric anti-ulcerogenic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 19(10):401-403
- Barletta J.F., Sclar D. A. 2014. Use of proton pump inhibitors for the provision of stress ulcer prophylaxis: Clinical and economic consequences. *Pharmacoeconomics.* 32(1):5-13
- Barzegar A. 2012. The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. *Food Chem.* 135(3):1369-1376
- Batarseh Y.S., Bharate S.S., Kumar V., Kumar A., Vishwakarma R.A., Bharate S.B., Kaddoumi A. 2017. *Crocus sativus* extract tightens the blood-brain barrier, reduces amyloid β load and related toxicity in 5XFAD mice. *ACS Chem Neurosci.* 8 (8): 1756–1766
- Benzie, F. F. & Wachtel-Galor, S., 2011. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Segunda ed. Estados Unidos de América: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Camacho-Barquero L., Villegas I., Sánchez-Calvo J. M., Talero E., Sánchez-Fidalgo S., Motilva V., Alarcón de la Lastra C. 2007. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol.* 7(3):333-342
- Chattopadhyay I., Bandyopadhyay U., Biswas K., Maity P., Banerjee R. K. 2006. Indomethacin activates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radic Biol Med.* 40(8):1397-1408
- Chávez-Piña, A. E., Tapia-Álvarez, G. R., Reyes-Ramírez, A. & Navarrete, A., 2011. A. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/(c)GMP/K(ATP) pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. *Fundam Clin Pharmacol.* 25(6):717-22

- Chithambo B., Noundou X.S., Krause R.W.M. 2017. Anti-malarial synergy of secondary metabolites from *Morinda lucida* Benth. *J. Ethnopharmacol.* 199: 91–96
- Chou T. C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 58(3):621-681.
- Chu S., Schubert M. L. 2013. Gastric Secretion. *Curr Opin Gastroenterol.* 29(6):636-641
- Chou T. C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70(2):440-446
- Chueca E., Lanás A., Piazuelo E. 2012. Role of gastrin peptides in Barrett's and colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 18(45):6560-6570
- Davis C. D., Ross S. A. 2008. Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutr Rev.* 66(8):477-82
- de Cássia da Silveira E. Sá R., Andrade L. N., Dos Reis Barreto de Oliveira R., De Sousa D. P. 2014. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules.* 19(2):1459-80
- De Paz-Campos M. A.,Chávez-Piña A. E.,Ortiz M. I.,Castañeda-Hernández G. Evidence for the Participation of ATP-sensitive Potassium Channels in the Antinociceptive Effect of Curcumin. *Korean J Pain.* 25(4):221-7
- De R., Kundu P., Swarnakar S., Ramamurthy T., Chowdhury A., Nair G. B., Mukhopadhyay A. K. 2009. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(4):1592-1597
- Díaz-Triste N. E., González-García M. P., Jimenez-Andrade J. M., Castañeda-Hernández G., Chávez-Piña A. E. 2014. Pharmacological evidence for the participation of NO-cGMP-KATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. *Eur J Pharmacol.* 5(730):102-106
- Ding X., Wu F., Gou Z., Yao X. 2008. Molecular dissection of HCl secretion in gastric parietal cells using streptolysin O permeabilization. *Methods Mol Biol.* 440:217-226
- Dirección General de Epidemiología (DGE). Secretaría de Salud. Anuario de morbilidad 2013. Consultado 28 de mayo de 2015:
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Doll R., Hill I. D., Hutton C. F. 1965. Treatment of gastric ulcer with carbenoxolone sodium and oestrogens. *Gut*. 6:19-24

Efferth T, Koch E. 2011. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Curr Drug Targets*. 12(1):122–132

Epstein J., Sanderson I. R., Macdonald T. T. 2010. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 103(11):1545-1557

García-Guzmán P., Medina-Torres L., Calderas F., Bernad-Bernad M. J., Gracia-Mora J., Mena B. y Manero O. 2018. Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 167: 397–406

Gilbert B, Alves L. 2003. Synergy in plant medicines. *Curr Med Chem*. 10(1):13–20

Gupta S. C., Patchva S., Aggarwal B. B. 2013. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J*. 15(1):195-218

Hägerström H, Paulsson M, Edsman K (2000) Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. *Eur J Pharm Sci* 9:301–309

Hall, D. W. & van den Hoven, W. E., 1987. Gastric mucosa protection and prostaglandin E2 generation in rats by colloidal bismuth subcitrate (DE-NOL). *Arch Int Pharmacodyn Ther*.286(2):308-19

Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F. M., Torti S. V. 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trails. *Cell Mol Life Sci*. 65(11):1631-1652

Højgaard L., Mertz N. A., Rune S. J. 1996. Peptic ulcer pathophysiology: acid, bicarbonate, and mucosal function. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 216:10-15

Hsu D. Z., Chu P. Y., Liu M. Y. 2009. Effect of sesame oil on acidified ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *J Parenter Enteral Nutr*. 33(4):423-427

Jung J., Lee J. H., Bae K. H., Jeong C. S. 2011. Anti-gastric actions of eugenol and cinnamic acid isolated from *Cinnamomi ramulus*. *Yakugaku Zasshi*. 131(7):1103-10

- Jurenka J. S. 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 14(2):141-153
- Khan F. A., Maalik A., Murtaza G. 2016. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *J Food Drug Anal.* 24(4):695-702
- Kim D. C., Kim S. H., Choi B. H., Baek N. I., Kim D., Kim M. J., Kim K. T. 2005. *Curcuma longa* extract protects against gastric ulcers by blocking H₂ histamine receptors. *Biol Pharm Bull.* 28(12):2220-2224
- Kim Y. S., Ahn Y., Hong M. H., Joo S. Y., Kim K. H., Sohn I. S., Park H. W., Hong Y. J., Kim J. H., Kim W., Jeong M. H., Cho J. G., Park J. C., Kang J. C. 2007. Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF- α -stimulated human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 50(1):41-49
- Konturek S. J., Dembinski A., Warzecha Z., Bielanski W., Brzozowski T., Drozdowicz D. 1998. Epidermal growth factor (EGF) in the gastroprotective and ulcer healing actions of colloidal bismuth subcitrate (De-Nol) in rats. *Gut.* 29(7):894-902
- Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ (2002) Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 53:39–50
- Lin J. K., Pan M. H., Shiao S. Y. L., 2000. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors.* 13(1-4):153-158
- Lorentzon, P., Eklundh, B., Brändström, A. & Wallmark, B., 1985. The mechanism for inhibition of gastric (H⁺ + K⁺)-ATPase by omeprazole. *Biochim Biophys Acta.* 817(1):25-32
- Love J. W. 2008. Peptic ulceration may be a hormonal deficiency disease. *Med Hypotheses.* 70(6):1103-1107
- Mahattanadul S., Nakamura T., Panichayupakaranant P., Phdoongsombut N., Tungsinmunkong K., Bouking P. 2009. Comparative antiulcer effect of bisdemethoxycurcumin and curcuminin a gastric ulcer model system. *Phytomedicine.* 16(4):342-351
- Martelli L., Ragazzi E., di Mario F., Martelli M., Castagliuolo I., Dal Maschio M., Palù G., Maschietto M., Scorzeto M., Vassanelli S., Brun P. 2007. A potential role for the vanilloid

receptor TRPV1 in the therapeutic effect of curcumin dinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis in mice. *Neurogastroenterol Motil.* 19(8):668-74

Mertz H. R., Walsh J. H. 1991. Peptic ulcer pathophysiology. *Med Clin North Am.* 75(4):799-814

Midudhula S. S., Mundra A. 2010. Kinetics and mechanism of oxidation of curcumin by sulphate radical anion in aqueous acetonitrile solution. *BCC.* 42(2):126-129

Mishra N., Oraon A., Dev A., Jayaprakash V., Basu A., Pattnaik A.K., Tripathi S.N., Akhtar M., Ahmad S., Swaroop S., Basu M. 2010. Anticonvulsant activity of *Benkara malabarica* (Linn.) root extract: in vitro and in vivo investigation. *J. Ethnopharmacol.* 128(2): 533–536

Nicasio-Torres M.P., Serrano-Román J., Jiménez-Ferrer E., Herrera-Ruiz M. 2017. Effect of dichloromethane-methanol extract and tomentin obtained from *Sphaeralcea angustifolia* cell suspensions in a model of kaolin/carrageenan-induced arthritis. *Planta Med.* 4: 35–42

Okwuosa C. N., Okoi-Ewa R., Achukwu P. U., Onuba A. C., Azubiuke N. C. 2011. Gastroprotective effect of crude hexane leaf extract of *Sesamum indicum* in rabbits. *NigPhysiol Sci.* 26(1):49-54

Priyadarsini K. I., Maity D. K., Naik G. H., Kumar M. S., Unnikrishnan M. K., Satav J. G., Mohan H. 2003. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med.* 35(5):475-484

Rahim N. A., Hassandarvish P., Golbabapour S., Ismail S., Tayyab S., Abdulla M. A. 2014. Gastroprotective effect of ethanol extract of *Curcuma xanthorrhiza* leaf against ethanol-induced gastric mucosal lesions in Sprague-Dawley rats. *Biomed Res Int.* 2014:1-10

Rasband, W. S., 1997-2014. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>.

Ravindran, P. N., Nirmal-Babu, K. & Sivaraman, K., 2007. *Turmeric the genus Curcuma*. Primera ed. Estados Unidos de América: CRC Press Taylor and Francis Group.

Rouhollahi E., Moghadamtousi S. Z., Hamdi O. A., Fadaeinasab M., Hajrezaie M., Awang K., Looi C. Y., Abdulla M. A., Mohamed Z. 2014. Evaluation of acute toxicity and gastroprotective activity of *Curcuma purpurascens* BI. Rhizome against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2014:1-10

Robert A., Nezamis J. E., Lancaster C., Hanchar A. J. 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*. 77(3):433–443

Sandur S. K., Pandey M. K., Sung B., Ahn K. S., Murakami A., Sethi G., Limtrakul P., Badmaev V., Aggarwal B. B. 2007. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 28(8):1765-1773

Secretaría de Salud. 2009. Diagnóstico y tratamiento de la úlcera péptica complicada. Conceptos Básicos. México.

Shang Y. J., Jin X. L., Shang X. L., Tang J. J., Liu G. Y., Dai F., Qian Y. P., Fan G. J., Liu Q., Zhou B. 2010. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure-activity relationship and influence of microenvironment. *Food Chem*. 119(4):1435-1442

Sharma A. V., Ganguly K., Paul S., Maulik N., Swarnakar S. 2012. Curcumin heals indomethacin-induced gastric ulceration by stimulation of angiogenesis and restitution of collagen fibers via VEGF and MMP-2 mediated signaling. *Antioxid Redox Signal*. 116(4):351-362

Shen L., Ji H. F. 2007. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 67(3-4):619-623

Shin J. M., Munson K., Vagin O., Sachs G. 2009. The gastric HK-ATPase: structure, function and inhibition. *Pflugers Arch*. 457(3):609-622

Swarnakar S., Ganguly K., Kundu P., Banerjee A., Maity P., Sharma A. V. 2005. Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J Biol Chem*. 280(10):9409-15

Tarnawski A., Brzozowski T., Sarfeh I. J., Krause W. J., Ulich T. R., Gergely H., Hollander D. 1988. Prostaglandin protection of human isolated gastric glands against indomethacin and ethanol injury. Evidence of direct cellular action of prostaglandin. *J Clin Invest*. 81(4):1081-9

Tallarida R. J., 2006. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther*. 319(1):1-7

- Tallarida R, J. 2007. Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacol Ther.* 113(1):197-209
- Tallarida R.J., 2012. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *J Pharmacol Exp Ther.*342(1):2-8
- Tanaka S, Guth PH, Carryl OR, Kaunitz JD (1997) Cytoprotective effect of bismuth subsalicylate in indomethacin-treated rats is associated with enhanced mucus bismuth concentration. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 605–612.
- Thavorn, K., Mamdani, M. M. & Straus, S. E., 2014. Efficacy of turmeric in the treatment of digestive disorders: a systematic review and meta-analysis protocol. *Syst Rev.*3(71):1-6
- Thompson C. J., Ernst E. 2002. Systematic review: herbal medicinal products for non-ulcer dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther.* 16(10):1689-1699
- Tourkey M., Karolin K., 2009. Anti-ulcer Activity of Curcumin on Experimental Gastric Ulcer in rats and its Effect on Oxidative Stress/Antioxidant, IL-6 and Enzyme Activities. *Biomed Environ Sci.* 22(6):488-495
- Tuskey A., Peura D. 2013. The use of H2 antagonist in treating and preventing NSAID-induced mucosal damage. *Arthritis Res Ther.* 15(3):1-7
- Ukil A., Maity S., Karmakar S., Datta N., Vedasiromoni J. R., Das P. K. 2003. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol.* 139(2):209-218
- Vareed S. K., Kakarala M., Ruffin M. T., Crowel J. A., Normolle D. P., Djuric Z., Brenner D. E. 2008. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*17(6):1411-1417
- Velázquez-Moyado J. A., Martínez-González A., Linares E., Bye R., Mata R., Navarrete A. 2015. Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *J Ethnopharmacol.* 174: 403-409
- Vimala G., Gricilda-Shoba F. 2014. A review on antiulcer activity of few Indian medicinal plants. *Int J Microbiol.* 2014:1-14
- Wallace J. L., Syer S., Denou E., de Palma G., Vong L., McKnight W., Jury J., Bolla M., Bercik P., Collins S. M., Verdu E., Ongini E. 2011. Proton pump inhibitors exacerbate

NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*. 141(4):1314:22

Wan Y., Li H., Fu G., Chen X., Chen F., Xie M., 2014. The relationship of antioxidant components and antioxidant activity of sesame seed oil. *J Sci Food Agric*. Diciembre 4.

Williams S.N., Pickwell G. V., Quattrochi L.C. 2003. A combination of tea (*Camellia senensis*) catechins is required for optimal inhibition of induced CYP1A expression by green tea extract. *J Agric Food Chem*. 51(22): 6627–6634

Williamson EM. 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 8(5): 401–409

Ye X.L.I., Huang W.W., Chen Z., Li X.G., Li P., Lan P., Wang L., Gao Y., Zhao Z.Q.I., Chen X. 2010. Synergetic effect and structure-activity relationship of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors from *Crataegus pinnatifida* bge. *J Agric Food Chem*. 58(5): 3132–3138

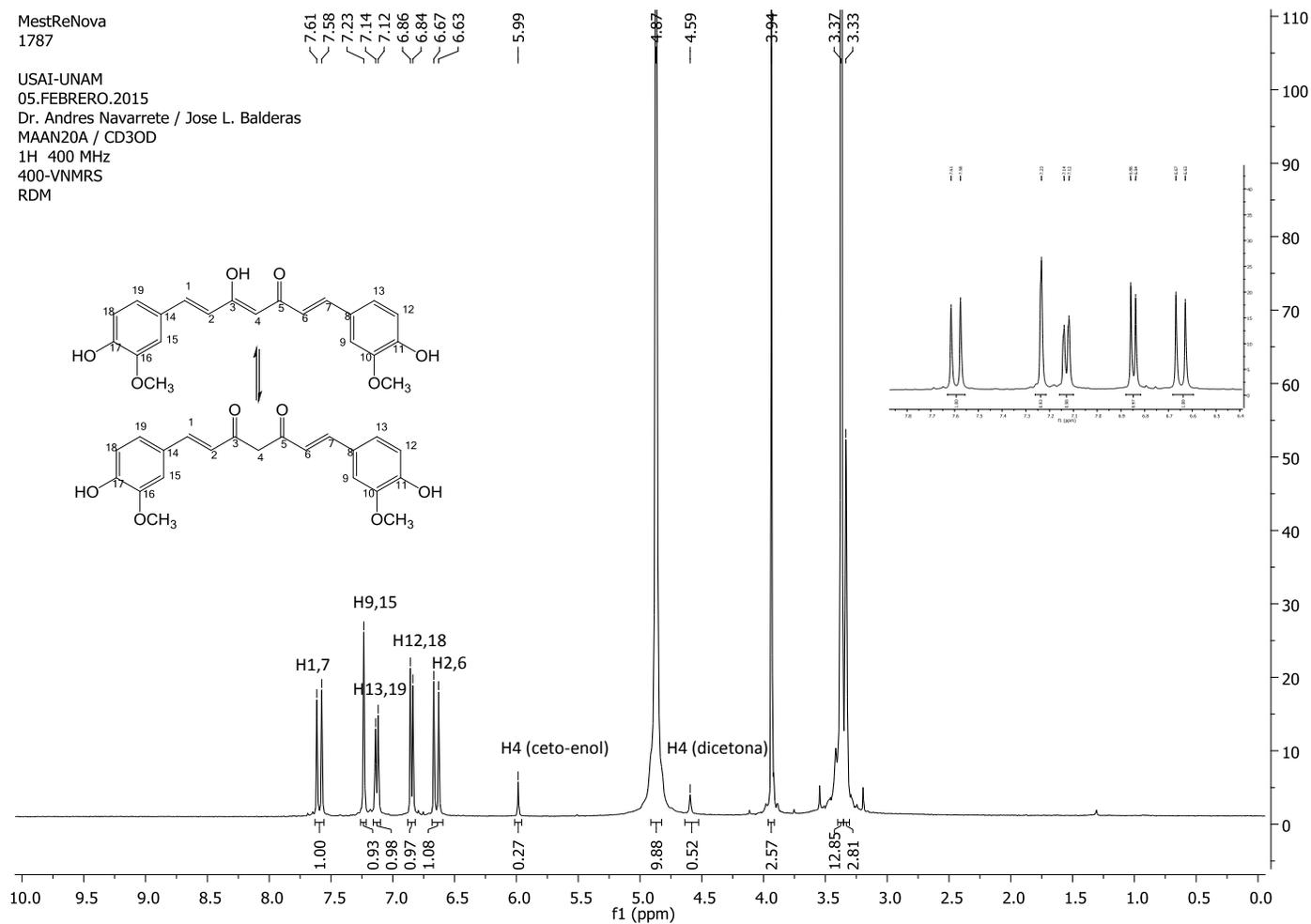
Zhang W., Tan T.M., Lim L.Y. 2007. Impact of curcumin-induced changes in P-glycoprotein and CYP3A4 expression on the pharmacokinetics of peroral celiprolol and midazolam in rats. *Drug Metab Dispos*. 35(1): 110-115

ANEXOS

MestReNova
1787

USAI-UNAM
05.FEBRERO.2015
Dr. Andres Navarrete / Jose L. Balderas
MAAN20A / CD3OD
1H 400 MHz
400-VNMRS
RDM

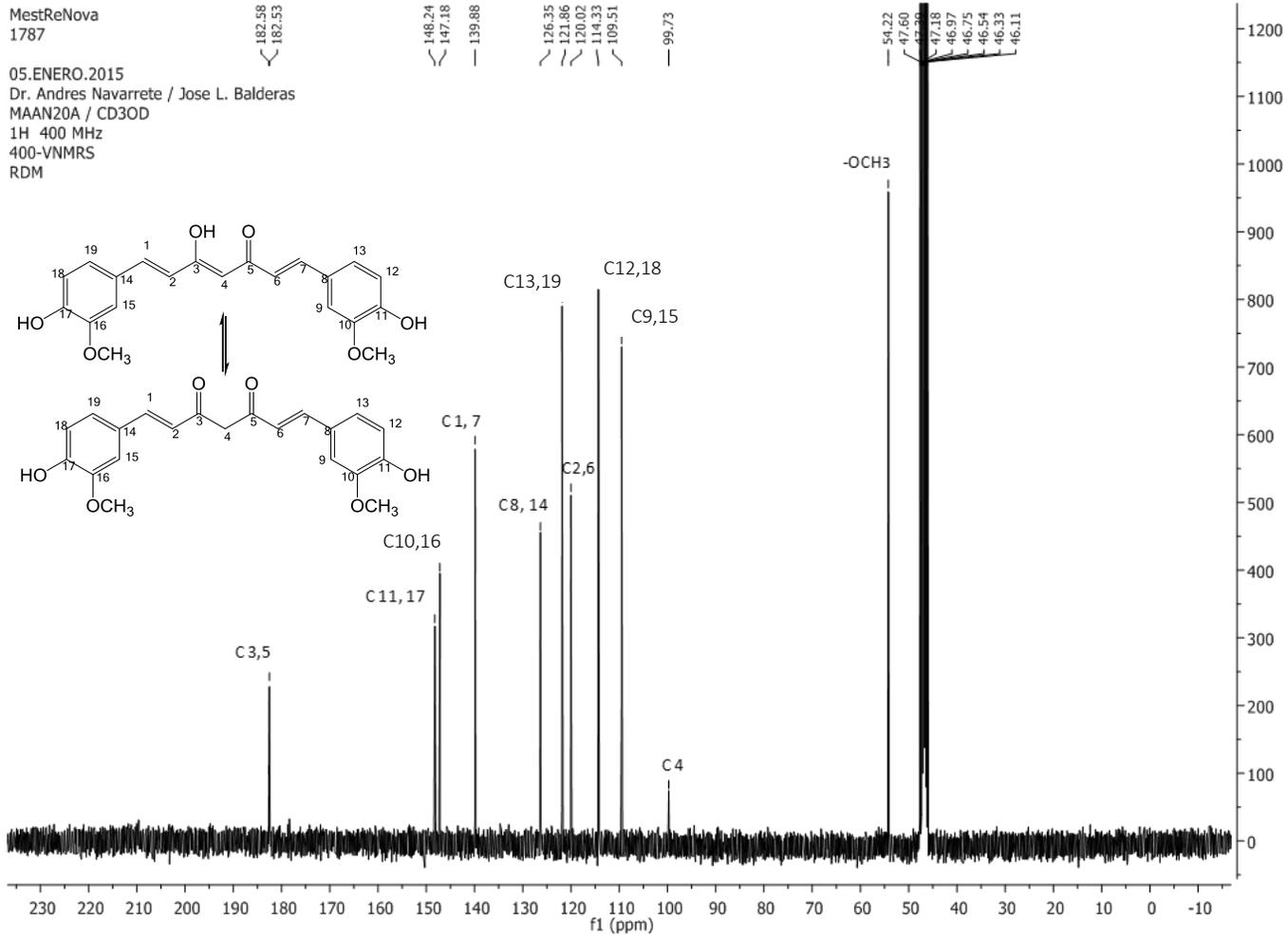
7.61
7.58
7.23
7.14
7.12
6.86
6.84
6.67
6.63
— 5.99



Anexo 1. Espectro de RMN ¹H de la curcumina (400 MHz, CD₃OD).

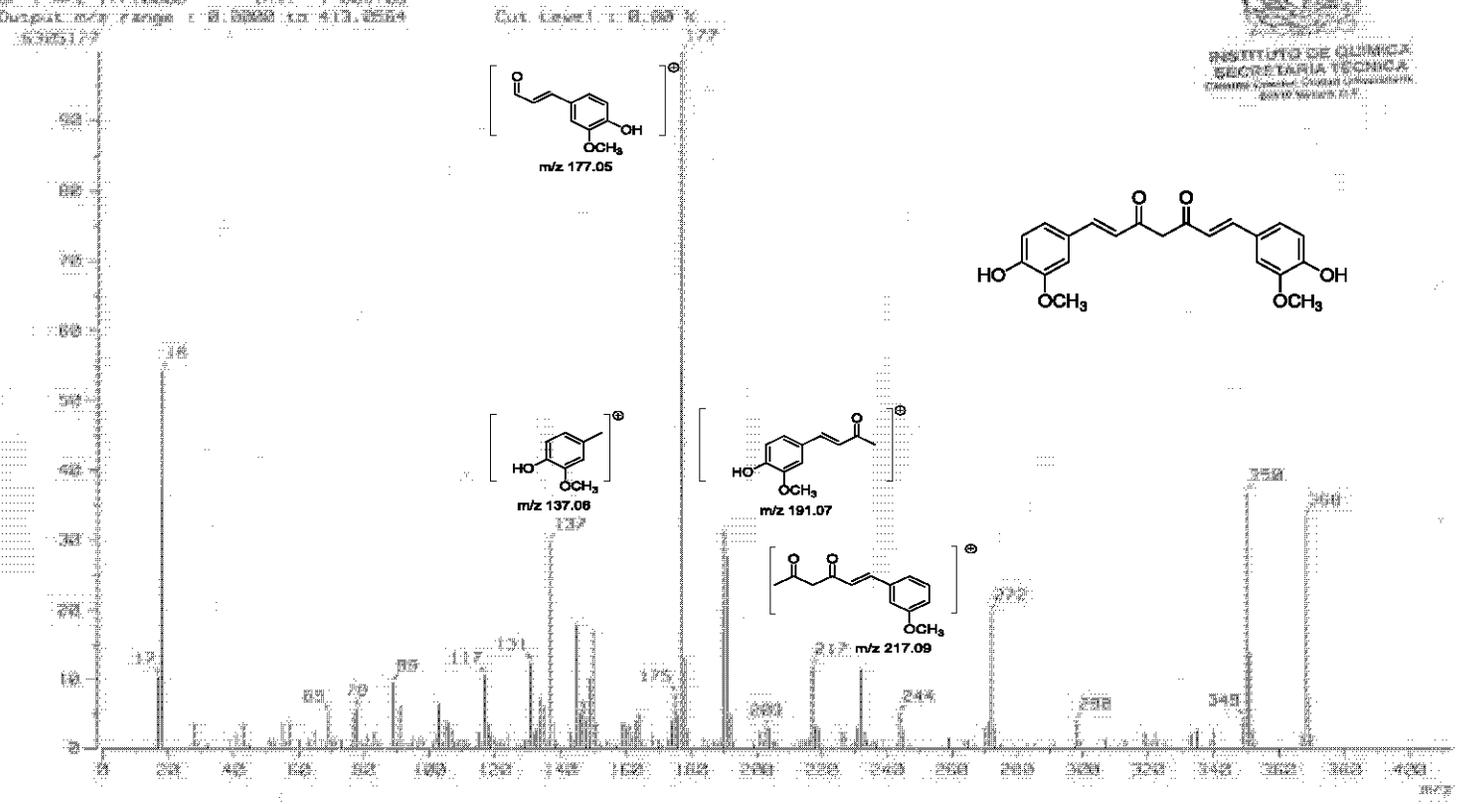
MestReNova
1787

05.ENERO.2015
Dr. Andres Navarrete / Jose L. Balderas
MAAN20A / CD3OD
1H 400 MHz
400-VNMRS
RDM



Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C de la curcumina (125 MHz, CD_3OD).

Mass Spectrum
 Date: 12-Nov-2013 10:45
 Sample: 102-210-5100-FCM-1-001-00000
 Note:
 Inlet: Direct Ion Mode: ESI+
 Spectrum Type: Normal Ion MS Scan
 RT: 0.25 min Scan: 117.153
 MS Type: FT-MS
 Output m/z range: 0.0000 to 413.0504



Anexo 3. Espectro de masas de la curcumina. Principales fragmentos (m/z= [M+H]⁺). Modo de ionización: impacto electrónico.

2814-1H_AOAN89

2814

USAI UNAM

17.Junio.2015

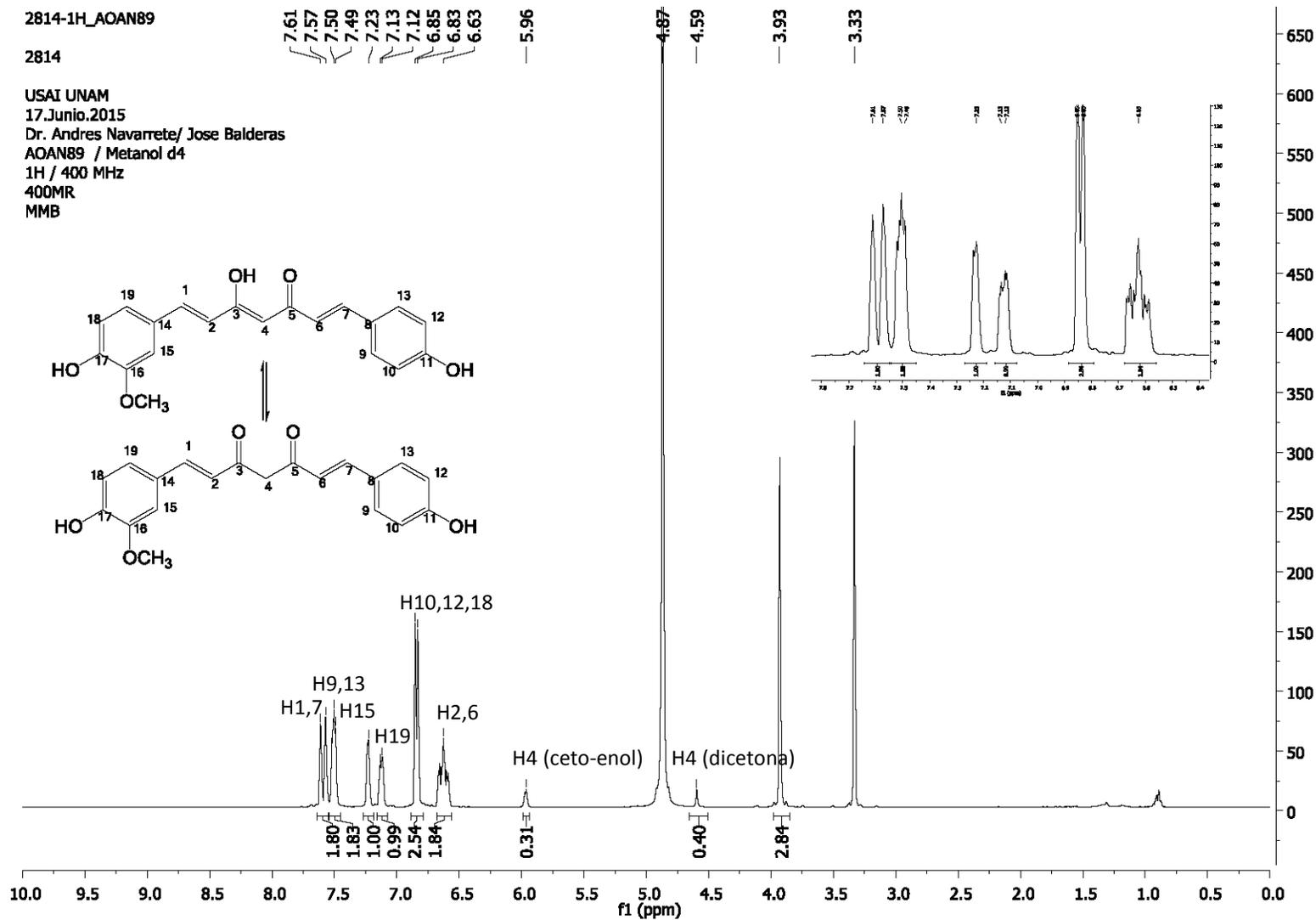
Dr. Andres Navarrete/ Jose Balderas

AOAN89 / Metanol d4

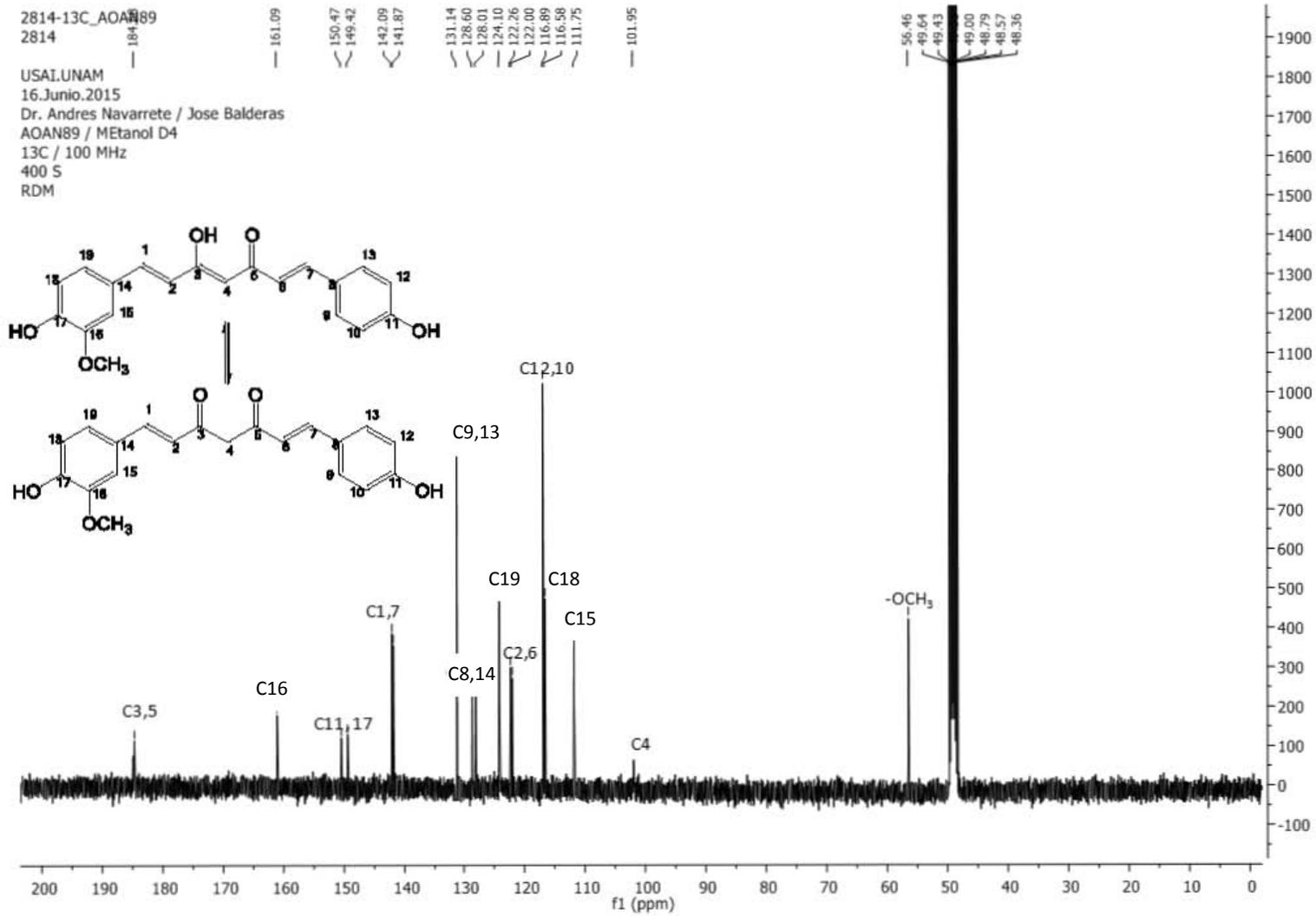
1H / 400 MHz

400MR

MMB

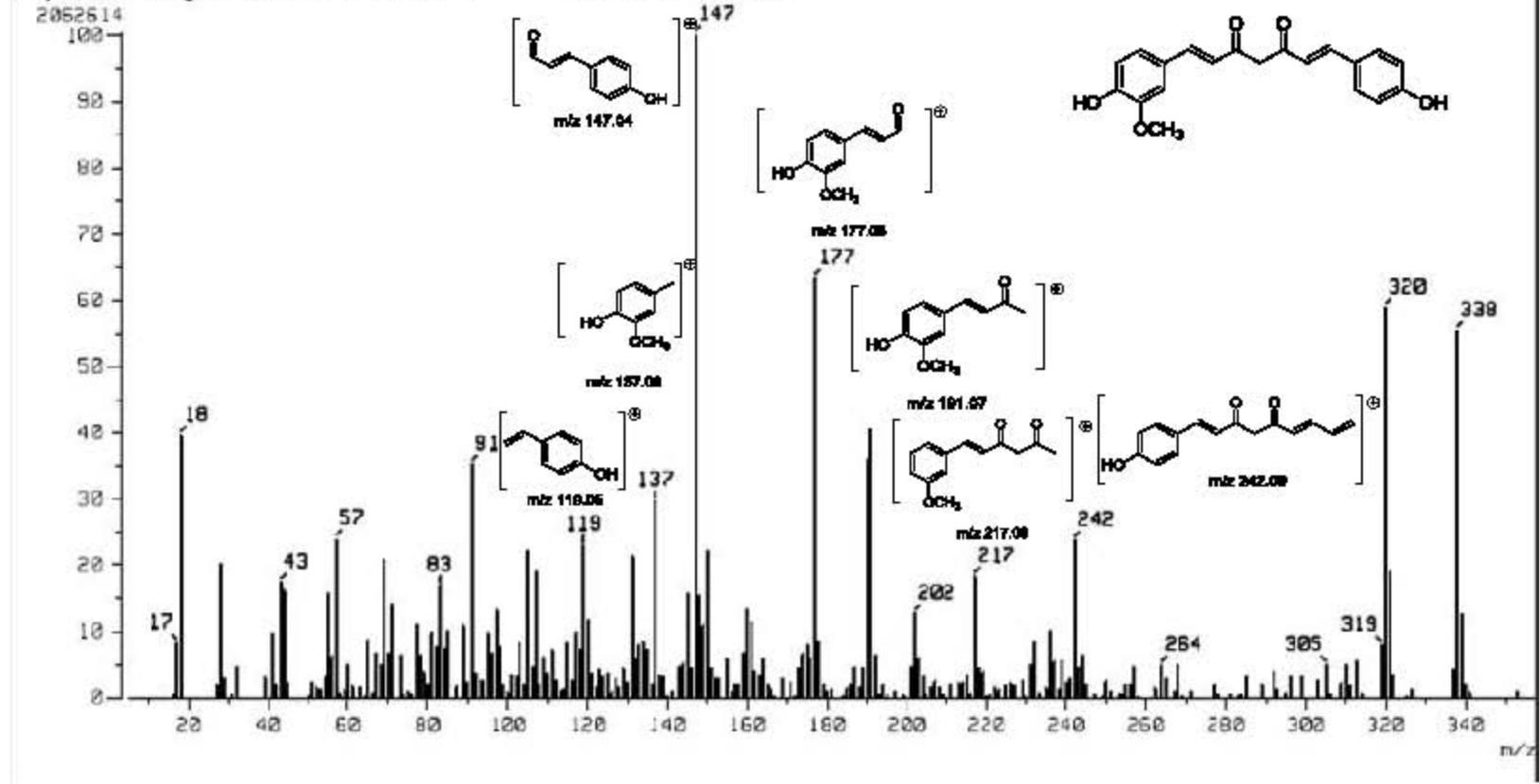


Anexo 4. Espectro de RMN ¹H de la desmetoxicurcumina (400 MHz, CD₃OD)



Anexo 5. Espectro de RMN ¹³C de la desmetoxicurcumina (125 MHz, CD₃OD).

[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Navarrete-Andres-257 Date : 01-Jul-2015 11:29
 Sample: 507 STE-5392 A0AN-1-09 Jea1 SX102A
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 3.41 min Scan# : (65,75)
 BP : m/z 147.0000 Int. : 196.15
 Output m/z range : 5.0004 to 357.0230 Cut Level : 0.00 %

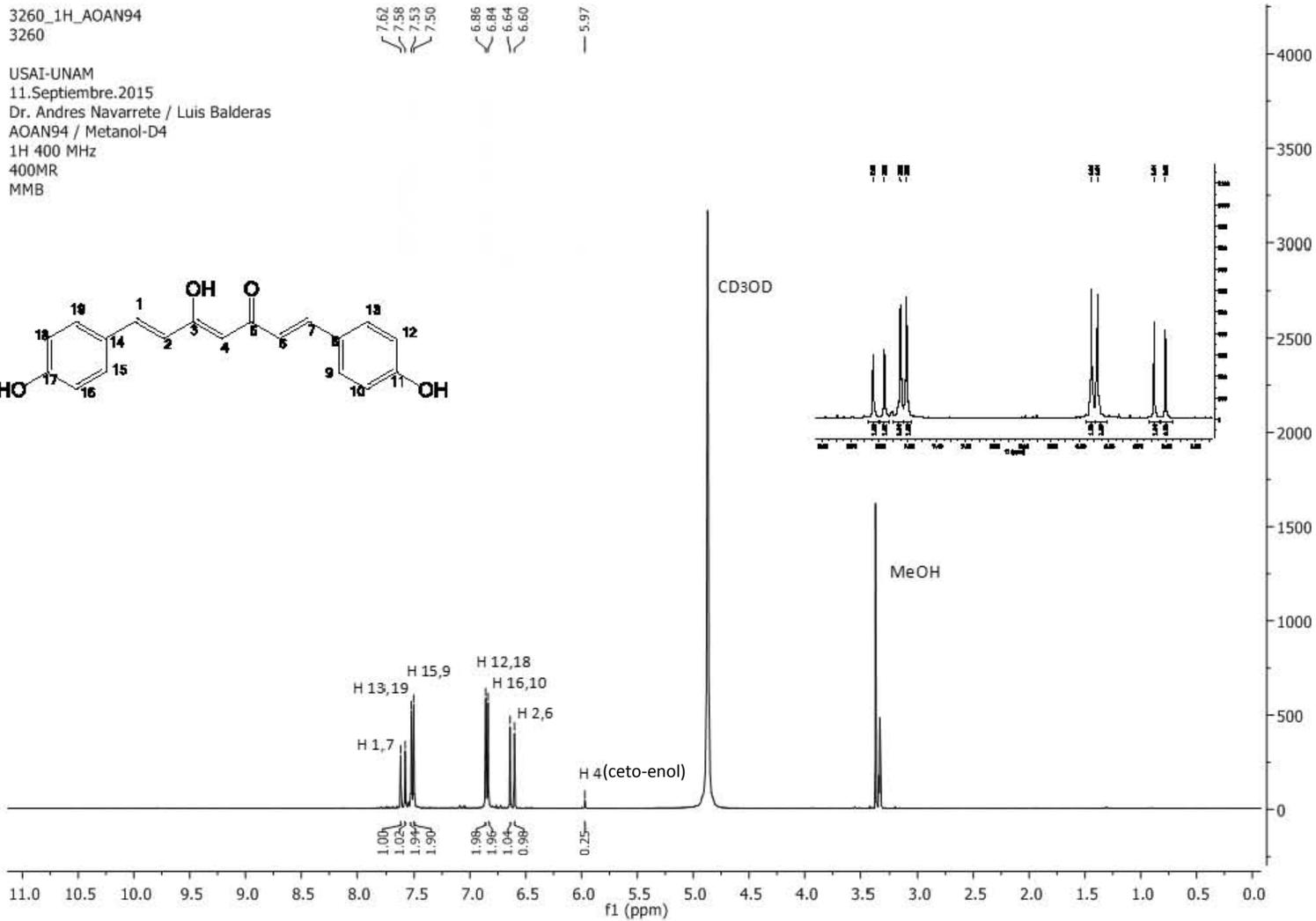
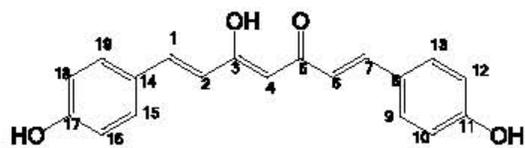


Anexo 6. Espectro de masas de la desmetoxicurcumina. Principales fragmentos (m/z = [M+H]⁺). Modo de ionización: impacto electrónico.

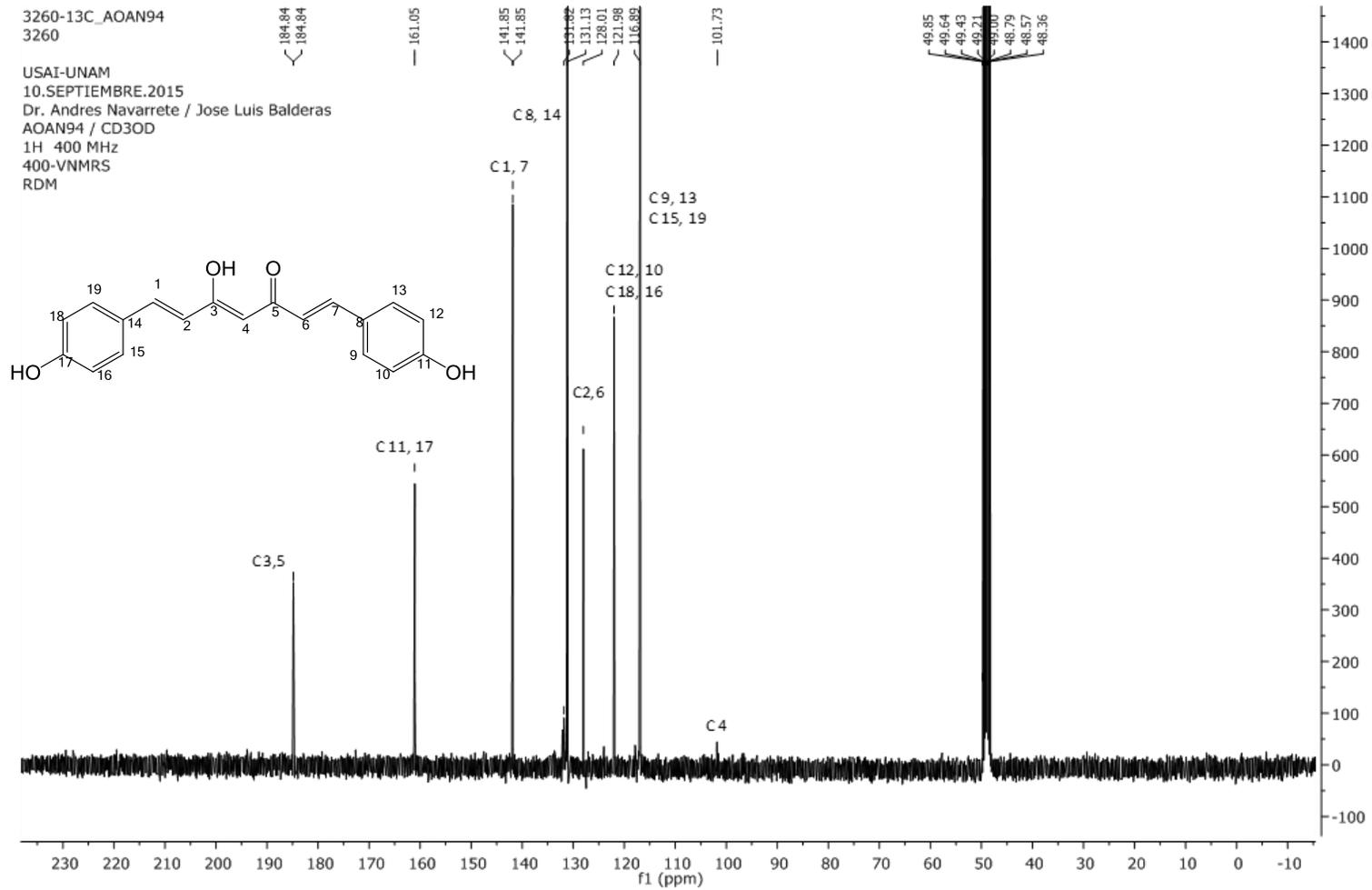
3260_1H_AOAN94
3260

7.62
7.58
7.53
7.50
6.86
6.84
6.64
6.60
5.97

USAI-UNAM
11.Septiembre.2015
Dr. Andres Navarrete / Luis Balderas
AOAN94 / Metanol-D4
1H 400 MHz
400MR
MMB

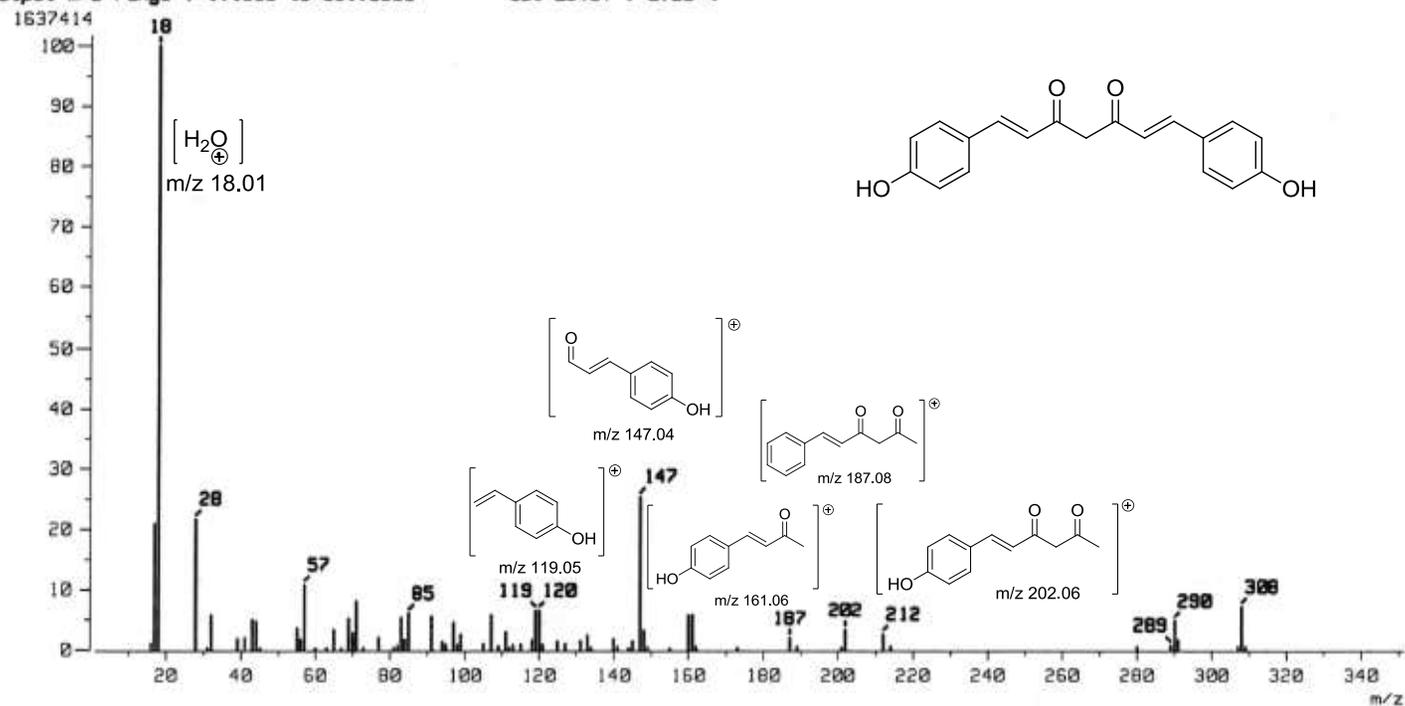


Anexo 7. Espectro de RMN ¹H de la bis-desmetoxicurcumina (400 MHz, CD₃OD)

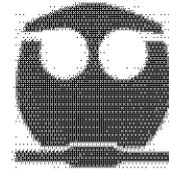


Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C de la bis-desmetoxicurcumina (125 MHz, CD_3OD).

[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Navarrete-Andres-820 Date : 21-Sep-2015 12:33
 Sample: 636 STE-5491 AOFN-94 Jeol SX102A
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.89 min Scan# : (18,21)
 BP : m/z 18.0000 Int. : 153.49
 Output m/z range : 1.1869 to 351.3353 Cut Level : 0.00 %



Anexo 9. Espectro de masas de la bis-desmetoxicurcumina. Principales fragmentos ($m/z = [M+H]^+$). Modo de ionización: impacto electrónico.



FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

OFICIO FQ/CICUAL/147/16

ASUNTO: Aprobación de Protocolo

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Presente

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

"Estudio de la interacción de Curcuma longa con fármacos antiulcerosos"

No. de animales empleados en el estudio: 468 ratas machos Wistar

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

Con una vigencia de: 1 año posterior a la fecha de aprobación.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Alientamente:

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 13 de abril del 2016

M. en C. Mtra. Isabel Gracia Morán
Presidente

Dra. Mtra. Elena Brava Gómez
Secretaria

- C.e.p. Dr. Jorge Vázquez, Director de la FQ.
- C.e.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
- C.e.p. H. Consejo Técnico FQ.
- C.e.p. Comisión de Seguridad e Higiene, FQ.
- C.e.p. Mtra. Patricia Santibán, Secretaria Administrativa, FQ.
- C.e.p. Expediente CICUAL.