



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO POR HPLC PARA CUANTIFICAR
CURCUMINOIDES EN INSUMOS HERBOLARIOS**

TESIS

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

PRESENTA

MARÍA FERNANDA TAGLE CARMONA



Ciudad Universitaria, CDMX

2021



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: INÉS FUENTES NORIEGA
VOCAL: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ
SECRETARIO: KENNETH RUBIO CARRASCO
1er. SUPLENTE: ALEJANDRO MARTÍNEZ GONZÁLEZ
2° SUPLENTE: ABEL BALTAZAR HERNÁNDEZ CALVO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 113, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

SUSTENTANTE:

María Fernanda Tagle Carmona

“Cuando te sientas vacío, tómate tu tiempo para sentirte lleno nuevamente.

Cuando estés lleno, compártelo con el mundo”

Regina Marco

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química, por brindarme el privilegio de recibir una educación de calidad y formación humana y profesional.

Al Departamento de Superación Académica, por el apoyo otorgado a través del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” en el periodo del 01 de septiembre de 2019 al 31 de agosto de 2020.

A los programas PAPIME PE207021 (Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación) y PAIP 5000-9165 (Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado PAIP) por el financiamiento otorgado al grupo de investigación para la realización de este proyecto.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, mi más sincero agradecimiento por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el apoyo y enseñanza para la realización del presente proyecto. En especial por su amistad y por el tiempo y esfuerzo dedicados en este trabajo a pesar de las difíciles circunstancias causadas por la pandemia.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus comentarios y observaciones, que sin duda enriquecieron este trabajo.

En especial a Angélica, Fernando, Angie y Vanessa, son la razón y el motivo de mi existencia, por su amor y apoyo incondicional, por creer en mí y ser la luz en mi vida.

A mi familia, por su enorme apoyo y amor.

A mis compañeros del laboratorio 113, por hacer amena y agradable mi estancia desde el primer día, por su apoyo académico y personal.

A Susana Hernández, Saraí De León, Iván Cruz, Sandra Hernández y Mariana Guerra, porque una verdadera amistad está fundamentada en confianza, apoyo, amor y respeto.

A mí, Fernanda Tagle, por el esfuerzo y dedicación en la realización de esta tesis. Por no rendirme aunque la situación se oscureció por un momento, por aprender a amar mi luz y oscuridad que descubrí durante el desarrollo de este proyecto, por crecer profesional y personalmente.

RESUMEN

Debido al uso e importancia medicinal de la especie *Curcuma longa* Linn su análisis farmacéutico es de primordial importancia para asegurar el cumplimiento de los requisitos legales y la calidad de sus insumos.

En este proyecto se desarrolló y validó un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para identificar y cuantificar los compuestos bioactivos del rizoma (Curcumina, Desmetoxicurcumina y Bisdesmetoxicurcumina) basado en la guía de validación para métodos analíticos ICH Q2.

Las condiciones de análisis establecidas fueron: cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; columna C8 (Symmetry Shield RP8 Waters, 5 μ m, 250 x 4.6 mm); fase móvil binaria: Solución A-Acetonitrilo, Solución B-Ácido acético 2 %v/v en agua (pH 2.45) en una proporción 50:50 [A]:[B]; flujo de 1.3 mL/min; volumen de inyección de 20 μ L y una longitud de onda de 360 nm.

Los parámetros de validación evaluados fueron: linealidad, precisión, exactitud y selectividad. El método analítico desarrollado es sencillo, rentable y adecuado para el análisis de diferentes insumos herbolarios que contengan cúrcuma.

Una vez validada la metodología se identificó la presencia de *Curcuma longa* L. en los insumos seleccionados. El contenido de curcuminoides fue de 100.9 % y 5.4 % para las cápsulas y el polvo, respectivamente. En contraste con el porcentaje de metabolitos secundarios estimados en el polvo, las cápsulas, cumplen con los límites especificados en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Cúrcuma.....	4
2.1.1. Composición química	5
2.1.2. Curcuminoides.....	6
2.1.3. Actividad biológica	9
2.1.4. Farmacocinética	10
2.2. Suplementos alimenticios.....	12
2.3. Control de calidad	15
2.4. Validación de métodos analíticos	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos particulares	20
4. METODOLOGÍA.....	21
4.1. Método analítico para cuantificar curcuminoides	21
4.1.1. Desarrollo del método analítico.....	21
4.1.2. Preparación de soluciones	21
4.1.2.1. Solución stock	21
4.1.2.1. Fase móvil acidificada	21
4.1.3. Diseño de experimentos para el desarrollo del método cromatográfico.....	22
4.2. Validación del método analítico para cuantificar curcuminoides por HPLC.....	23
4.2.1. Evaluación del sistema	23
4.2.1.1. Adecuabilidad del sistema.....	23
4.2.1.2. Linealidad del sistema	23

4.2.1.3. Precisión del sistema.....	24
4.2.2. Validación del método analítico.....	24
4.2.2.1. Linealidad y exactitud del método.....	25
4.2.2.2. Precisión del método.....	26
4.2.2.3. Especificidad del método.....	26
4.2.2.4. Robustez del método.....	27
4.2.2.5. Límites de cuantificación y detección.....	28
4.3. Cuantificación de curcuminoides en suplementos alimenticios empleando el método analítico.....	28
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	29
5.1. Método analítico para cuantificar curcuminoides	29
5.1.1. Desarrollo del método analítico.....	29
5.1.2. Diseño de experimentos para el desarrollo del método cromatográfico.....	30
5.1.2.1. Diseño factorial 1.....	30
5.1.2.2. Diseño factorial 2.....	33
5.1.2.3. Diseño factorial 3.....	37
5.2. Validación del método analítico para cuantificar curcuminoides por HPLC.....	42
5.2.1. Evaluación del sistema	42
5.2.1.1. Adecuabilidad del sistema.....	42
5.2.1.2. Precisión del sistema.....	43
5.2.1.3. Linealidad del sistema.....	44
5.2.2. Validación del método analítico.....	46
5.2.2.1. Precisión del método.....	46
5.2.2.2. Linealidad y exactitud del método.....	48
5.2.2.3. Límites de cuantificación y detección.....	50
5.2.2.4. Especificidad del método.....	50
5.2.2.5. Robustez del método.....	55
5.3. Cuantificación de curcuminoides en suplementos alimenticios por HPLC	58

6. CONCLUSIONES	60
7. PERSPECTIVAS	60
8. ANEXO	61
9. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i> L.)	4
Figura 2.	Detalle del rizoma de <i>C.longa</i> L. entero y pulverizado.....	5
Figura 3.	Estructura y tautómeros de los curcuminoides	6
Figura 4.	Conformación cerrada y abierta de la forma ceto-enol.	8
Figura 5.	Sitios de reactividad química en la curcumina que contribuyen a su actividad y biodisponibilidad.	8
Figura 6.	Principales productos de degradación de la curcumina.....	9
Figura 7.	Resumen de actividad biológica de los curcuminoides.....	11
Figura 8.	Productos del metabolismo de la curcumina	12
Figura 9.	Porcentaje de adulteraciones según el país de reporte, expresados como porcentaje del total de reportes entre 2009-2019.....	14
Figura 10.	Espectro UV-VIS de estándar de curcuminoides [100 µg/mL].	29
Figura 11.	Diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño factorial 1.....	31
Figura 12.	Gráfica de efectos principales del diseño factorial 1.....	32
Figura 13.	Gráfica de malla de superficie del diseño factorial 1.....	32
Figura 14.	Gráfica de contornos de superficie del diseño factorial 1.....	33
Figura 15.	Diagrama de Pareto de los factores evaluados del diseño factorial 2.....	34
Figura 16.	Gráfica de efectos principales para el diseño factorial 2.....	35
Figura 17.	Gráfica de malla de superficie del diseño factorial 2.....	35
Figura 18.	Gráfica de contornos de superficie del diseño factorial 2.....	36
Figura 19.	Diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño factorial 3.....	38
Figura 20.	Gráfica de efectos principales del diseño factorial 3.....	39
Figura 21.	Gráfica de malla de superficie estimada del diseño factorial 3.	39
Figura 22.	Gráfica de contornos de superficie del diseño factorial 3.....	40
Figura 23.	Cromatograma del estándar de curcuminoides [60 µg/mL].	41
Figura 24.	Linealidad del sistema.....	45

Figura 25.	Linealidad del método.	48
Figura 26.	Equilibrio ácido-base de los curcuminoides.	52
Figura 27.	Comparación de cromatogramas obtenidos con el estándar de curcuminoides a una concentración de 60 µg/mL y la degradación forzada	54
Figura 28.	Comparación de cromatogramas obtenidos con el producto prueba a una concentración de 306 µg/mL y la degradación forzada.	55
Figura 29.	Diagrama de Pareto de los factores evaluados para la resolución.	56
Figura 30.	Gráfica de efectos principales para la resolución.	57
Figura 31.	Gráfica de malla de superficie de la respuesta estimada para la resolución... ..	57
Figura 32.	Gráfica de contornos de superficie de la respuesta estimada fijando el pH a 2.45 para la resolución.	58
Figura 33.	Cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico de ACN: agua acidificada a pH de 2.55 [40:60] con flujo de 1.0 mL/min	65
Figura 34.	Cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico de ACN: agua acidificada a pH de 2.35 [60:40] con flujo de 1.5 mL/min	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición de la cúrcuma	5
Tabla 2.	Propiedades fisicoquímicas de curcuminoides	7
Tabla 3.	Color de los curcuminoides a diferentes valores de pH	8
Tabla 4.	Métodos de cuantificación de curcuminoides de <i>C. longa</i> L. por HPLC.....	16
Tabla 5.	Factores y niveles evaluados para el diseño experimental 1.....	22
Tabla 6.	Factores y niveles evaluados para el diseño experimental 2.....	22
Tabla 7.	Factores y niveles evaluados para el diseño experimental 3.....	22
Tabla 8.	Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración del sistema.....	24
Tabla 9.	Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración.	25
Tabla 10.	Condiciones de degradación del estándar de curcuminoides.	26
Tabla 11.	Condiciones de degradación del producto prueba.	27
Tabla 12.	Factores seleccionados para evaluar la robustez del método analítico.....	27
Tabla 13.	Máximos de absorción observados con el estándar de curcuminoides.....	29
Tabla 14.	Aleatorización y resultados del diseño factorial 1.....	31
Tabla 15.	Análisis de varianza para el modelo del diseño factorial 1.....	31
Tabla 16.	Aleatorización y resultados del diseño factorial 2.....	34
Tabla 17.	Análisis de varianza para el modelo del diseño factorial 2.....	34
Tabla 18.	Soluciones empleadas para el ajuste de pH a 2.45 de una disolución de ácido acético al 3% v/v.....	37
Tabla 19.	Aleatorización y resultados del diseño factorial 3.....	38
Tabla 20.	Análisis de varianza para el modelo del diseño factorial 3.....	38
Tabla 21.	Comparación de parámetros de aptitud del sistema cromatográfico en diferentes condiciones de trabajo.....	41
Tabla 22.	Condiciones cromatográficas establecidas para el método analítico.	41
Tabla 23.	Adecuabilidad del sistema.	43
Tabla 24.	Parámetros registrados en la evaluación de la adecuabilidad del sistema. .	43

Tabla 25.	Precisión del sistema para la cuantificación de curcuminoides.	44
Tabla 26.	Parámetros de linealidad del sistema.	45
Tabla 27.	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y pendiente.	45
Tabla 28.	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema.....	46
Tabla 29.	Repetibilidad del método.	47
Tabla 30.	Precisión intermedia del método.....	47
Tabla 31.	Parámetros de linealidad del método.....	49
Tabla 32.	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y pendiente.	49
Tabla 33.	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método.....	49
Tabla 34.	Linealidad del método para determinar la exactitud.....	50
Tabla 35.	Resultados obtenidos durante la degradación forzada del estándar de curcuminoides.....	53
Tabla 36.	Resultados obtenidos durante la degradación forzada del producto prueba.....	53
Tabla 37.	Porcentaje de degradación del estándar de curcuminoides.....	54
Tabla 38.	Porcentaje de degradación del producto prueba.....	54
Tabla 39.	Aleatorización y resultados para evaluar la resolución.....	56
Tabla 40.	Análisis de varianza para resolución.....	56
Tabla 41.	Resultados de cuantificación por HPLC de curcuminoides en polvo.....	59
Tabla 42.	Resultados de cuantificación por HPLC de curcuminoides en cápsulas.	59
Tabla 43.	Evaluación de diferentes sistemas cromatográficos.....	61
Tabla 44.	Soluciones empleadas para el ajuste de pH a 2.45 de una disolución de ácido acético al 3% v/v.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje	Log P	Coefficiente de reparto o de partición
% v/v	Porcentaje volumen/volumen	M	Molar
[IC(β_0)]	Intervalo de confianza para la ordenada al origen	MeOH	Metanol
[IC(β_1)]	Intervalo de confianza para la pendiente	mg	miligramo
[IC(μ)]	Porcentaje de recobro	min	minuto
\bar{X}	Promedio	mL	mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius	Mn	Manganeso
μg	microgramo	N	Número de platos teóricos
μL	Microlitro	NaOH	Hidróxido de sodio
ACN	Acetonitrilo	NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ATP	Adenosín trifosfato	NE	No especificado
BDMC	Bisdesmetoxicurcumina	nm	nanómetro
C.V	Coefficiente de variación	NRF2	Factor de transcripción Nrf2 regula la expresión enzimas antioxidantes
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios	OMe	Metoxilo
COX-1 y 2	Ciclooxigenasas	p53	Proteína supresora de tumores
Cu	Cobre	r	coeficiente de correlación
CUR	Curcumina	R	Resolución
CYP	Citocromo P450	R.A	Grado analítico
DE	Desviación estándar	r^2	Coefficiente de determinación
DMC	Desmetoxicurcumina	RIS	Reglamento de Insumos para la Salud
DNMT	DNA metiltransferasa	ROS	Especies reactivas de oxígeno
Fe	Hierro	SA	Suplemento Alimenticio
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos	T	Temperatura
GI	Grados de libertad	T	Factor de coleo
H	Hidrógeno	TEA	Trietanolamina
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	TFA	Ácido trifluoroacético
H_3PO_4	Ácido fosfórico	TR	Tiempo de Retención
HDAC	Histona deacetilasa	USP	Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución	UV	Ultravioleta
ICH	Conferencia Internacional de Armonización	VIS	Visible
IL-1 β	Interleucina 1- β	Zn	Zinc
k'	Factor de capacidad	β_0	Ordenada al origen
LC	Límite de cuantificación	β_1	Pendiente de la recta
LD	Límite de detección	λ	Longitud de onda
		Σ	Suma

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que el 80% de la población mundial emplea medicinas derivadas (directa o indirectamente) de plantas para la atención primaria de la salud. El aumento en el interés y consumo de productos naturales se debe principalmente al cambio de perfil del consumidor y a un mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados.

Muchas plantas con propiedades benéficas para la salud se han industrializado y comercializado mundialmente como suplementos alimenticios. Dichos productos refieren, en su publicidad, una gran variedad de beneficios medicinales sustentados en la información científica disponible. A pesar de su amplia seguridad, se han reportado algunos efectos adversos como diarrea, dolor de cabeza, náuseas, erupción cutánea y heces amarillas (Lao, 2006; Sharma, 2004). Para evitar dichos efectos, es necesario que los preparados de plantas medicinales cumplan con las normas pertinentes para garantizar su calidad, seguridad y eficacia.

Sin embargo, la falta de conocimiento de los principios bioactivos de muchas plantas medicinales ha dificultado el control de calidad y la estandarización de los productos herbolarios al punto de que el proceso sea complejo y, en algunos casos hasta inexistente. El proceso tan laxo para la aprobación y venta de los insumos herbolarios ha propiciado inconsistencias en los procesos mundiales de su manufactura. Los procesos también, han ocasionado toxicidad, efectos adversos, falta de eficacia y adulteración; por lo tanto, el análisis farmacéutico de los diversos insumos comercializados debe ser imperativo.

El creciente interés en la investigación y estudio de plantas medicinales también se ve reflejado en el número de publicaciones. De acuerdo con la base de datos NCBI, al 16 de febrero de 2021, se habían publicado 100 113 artículos sobre plantas medicinales, de los cuales, 955 versaban sobre *Curcuma longa* L. Esta planta es originaria de la India y se utiliza ampliamente por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitarias, anticancerígenas, hepatoprotectoras y antivirales. También, se emplea como colorante alimenticio y especia a lo largo del mundo.

La Organización Mundial de la Salud ha realizado un compendio de monografías de las plantas medicinales más utilizadas y estudiadas en el mundo, entre las cuales se encuentra

Curcuma longa L.; estas monografías fueron realizadas con el fin de proporcionar al usuario toda la información necesaria para su conocimiento y uso adecuado.

Al ser una de las plantas más comercializadas, se han desarrollado diversos métodos analíticos para detectar y cuantificar los curcuminoides presentes en la especie. Las metodologías descritas en la literatura permiten la estandarización y el control de calidad de diversos insumos para la salud incluidos los suplementos alimenticios elaborados a base de *C. longa* L.

De acuerdo con el Artículo 8 del RIS (Reglamento de Insumos para la Salud), en ausencia de una monografía farmacopeica para la especie podrá recurrirse a farmacopeas de otros países o a métodos encontrados en la bibliografía científica.

Con base en lo antes expuesto, el presente proyecto tiene como objetivo principal desarrollar y validar un método analítico, indicativo de estabilidad, para identificar y cuantificar los curcuminoides presentes (curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina) en *C. longa* L. Para ello, se empleó la guía de validación de métodos analíticos emitida por el Consejo Internacional de Armonización sobre los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (ICH, por sus siglas en inglés; ICH Q2 "Validation of analytical procedures").

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cúrcuma

La cúrcuma (*Curcuma longa* Linn, Zingiberaceae) conocida también como turmérico, haldi, yuquilla amarilla, jengibre amarillo o azafrán asiático es una planta tropical nativa del sur y sudeste de Asia; aunque ha sido introducida en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo.

Desde hace miles de años, los habitantes del Sudeste Asiático y de la India emplean a la cúrcuma en su dieta habitual como colorante y remedio para aliviar diferentes trastornos de la salud. La medicina ayurvédica o medicina tradicional hindú considera que la cúrcuma es un excelente antibiótico natural para el tratamiento de fiebres, infecciones, disentería, artritis, problemas hepáticos y como remedio de venenos y picaduras de serpientes, entre otros (Ayati, 2019).

La especie es una herbácea perenne con tallos largos que llegan a medir 120 cm, aunque existen variaciones dependiendo de las condiciones agroclimáticas de cultivo. Se reproduce vegetativamente por esquejes del rizoma, el cual es muy ramificado; de color marrón por fuera y naranja en el interior. El rizoma es la causa de que la cúrcuma sea una planta interesante desde el punto de vista gastronómico, medicinal, alimenticio y cosmético debido a que concentra los principales componentes bioactivos.

La producción global de cúrcuma es alrededor de 1, 100,000 toneladas por año siendo la India el líder global con un 48% de la producción, seguido por países como Bangladesh, Pakistán, Taiwán, China, El Caribe y América Latina (Nair, 2019).



Figura 1. Cúrcuma (*Curcuma longa* L.)
A. Planta de cúrcuma. B. Detalle de la flor. C. Rizoma.
(Imagen recuperada de: www.eol.org y www.ntbg.org.)

2.1.1. Composición química

El rizoma es la parte de la planta más investigada. Con la finalidad de encontrar sus principios activos y analizar sus actividades biológicas, así como dilucidar sus mecanismos de acción, se han preparado numerosos extractos con diversos disolventes. El análisis fitoquímico de dichos extractos permitió establecer la siguiente composición química (Chao, 2018; Kotha, 2019; Wichitnithad, 2009)

Tabla 1. Composición de la cúrcuma

Composición	Porcentaje (%)
Carbohidratos	63.7 a 69.4
Agua	12.0 a 13.1
Proteínas	5.8 a 7.8
Grasas	4.7 a 9.8
Aceites esenciales:	4.6 a 6.0:
α -felandreno	1.0
Cineol	1.0
Zingibereno	25
Sesquiterpenos	53
Fibra	3.5 a 21.1
Minerales	3.2 a 3.5
Curcuminoides: (curcumina, desmetoxicurcumina y disdesmetoxicurcumina).	2.5 a 6.0 % del peso seco

*El porcentaje varía dependiendo de la región de origen.

El rizoma posee un color amarillo-naranja muy característico (Figura 2) que se atribuye a los curcuminoides (compuestos polifenólicos) responsables de las propiedades farmacológicas de *C. longa* L.



Figura 2. Detalle del rizoma de *C.longa* L. entero y pulverizado
(Imagen recuperada de <https://definicion.de/curcuma/>)

2.1.2. Curcuminoides

Los curcuminoides característicos de *C. longa* L. son la curcumina, la desmetoxicurcumina y la bisdesmetoxicurcumina (Figura 3). El contenido de curcuminoides en la cúrcuma puede variar dependiendo de las condiciones geográficas. Los extractos crudos de *C. longa* L. contienen un porcentaje de 60-80% de curcumina, 15- 30% de desmetoxicurcumina y 10-15% de bisdesmetoxicurcumina (Pistelli, 2012; Nelson, 2017).

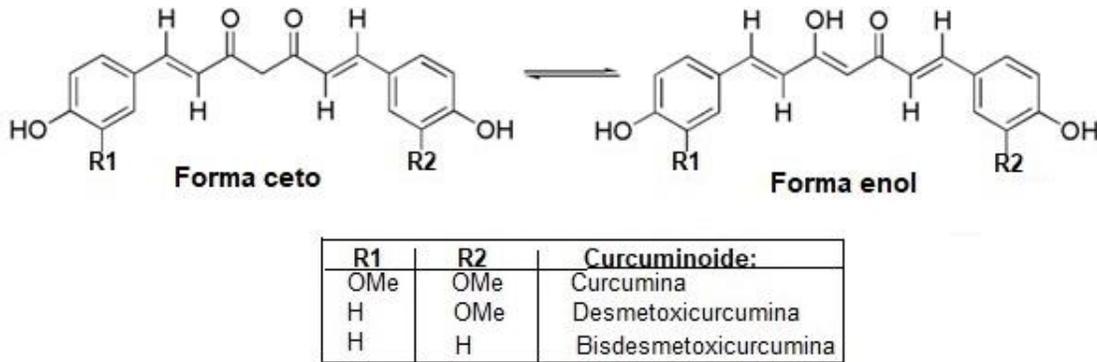


Figura 3. Estructura y tautómeros de los curcuminoides

(Recuperado de González-Albadalejo, 2015)

Sus estructuras se integran por un esqueleto hidroxicarbonado dicetónico con diferentes grupos funcionales (β -dicetona, enlaces vinílicos, fenoles y metoxilos) que proporcionan a la molécula un comportamiento químico característico (Tabla 2).

Dependiente del pH de la solución los curcuminoides presentan dos formas tautoméricas ceto-enólicas (Figura 3): a pH <7 la forma ceto es la principal, mientras que a pH >7 la forma enólica es mayoritaria. Cuando el equilibrio está desplazado hacia el tautómero enol la estructura puede estar en conformación abierta o cerrada (Figura 4) dependiendo si el disolvente es aceptor de enlaces de hidrógeno. En la conformación cerrada se observa la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que en disolventes polares adopta una conformación abierta con un enlace de hidrógeno intermolecular.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de curcuminoides

Nombre común	Curcumina	Desmetoxicurcumina	Bisdsmetoxicurcumina
Nombre químico	Diferuloilmetano	4-hidroxicinamoil-(feruloil) metano	bis (4-hidroxicinamoil) metano
Nomenclatura IUPAC	(1E, 6E) -1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona	(1E, 6E) -1- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -7- (4-hidroxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona	(1 E , 6 E) -1,7-bis (4-hidroxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona
Masa molecular (g•mol ⁻¹)	368.4	338.4	308.3
Estado físico	Sólido		
Olor	Inodoro		
Color	Amarillo- naranja a marrón-rojizo dependiendo del pH (ver tabla 3).		
Punto de fusión (°C)	184-186	172.5-174.5	224-231
Solubilidad	Soluble en: metanol, etanol, isopropanol, cetonas, ácido acético, cloroformo, dimetilsulfóxido. Muy poco soluble en agua (0.00575 mg/mL a 25 °C, pH>7) Insoluble en éter y agua fría.		
Estabilidad	Estable a temperaturas bajas y moderadas (<80-100) Sensible a la luz (Fotosensible) Estabilidad en rango de pH: 2.0>pH<7.0 (Hidrólisis ácidas y básicas).		
Log P	De carácter anfipático por la polaridad en la parte central y grupos adyacentes de su estructura, aunque preferentemente lipofílico (Log P = 3.3).		
Reacciones químicas	Principalmente en tres sitios reactivos, como se ilustra en la Figura 5: <ul style="list-style-type: none"> • donante de átomo de hidrógeno • Aceptor tipo Michael: susceptible a adiciones nucleofílicas • Quelante de metales: Alto nivel de coordinación con M⁺ divalentes de Fe, Cu, Mn y Zn. 		

Nair, 2019; National Center for Biotechnology Information, 2020



Figura 4. Conformación cerrada y abierta de la forma ceto-enol.
(Recuperado de González-Albadalejo, 2015)

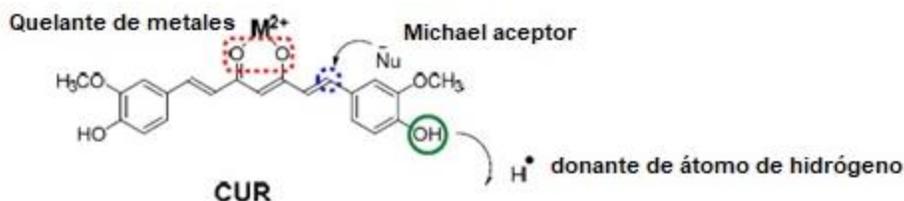


Figura 5. Sitios de reactividad química en la curcumina que contribuyen a su actividad y biodisponibilidad.
(Recuperado de Kotha, 2019)

Tabla 3. Color de los curcuminoides a diferentes valores de pH

Rango de pH	Estado	Color	Estructura								
< 2	Protonado	Rojo-marrón									
2– 7	Neutral	Amarillo-naranja									
7 >	Desprotonado	Rojo-marrón	<p>pKa:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>CUR</th> <th>DMC</th> <th>BDMC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>8.11</td> <td>8.31</td> <td>8.50</td> </tr> </tbody> </table> <p>8.96</p> <p>9.5</p>		CUR	DMC	BDMC		8.11	8.31	8.50
	CUR	DMC	BDMC								
	8.11	8.31	8.50								

Caballero-Casero, 2014; Cheng, 2019. CUR: Curcumina, DMC: Desmetoxicurcumina, BDMC: Bisdesmetoxicurcumina. La determinación de pKas de DMC y BDMC son escasas, por lo que no se cuenta con la información completa.

Los curcuminoides presentan una escasa estabilidad (Tabla 2) y su degradación sucede principalmente por dos diferentes procesos:

1. La degradación fotoquímica es el principal método de degradación. Se produce principalmente por oxidación y auto-oxidación mediante peróxidos, radicales libres y ROS, entre otros.
2. La degradación química es mayoritariamente por hidrólisis básica. Recientemente, se ha sugerido que los productos de degradación son bioactivos y contribuyen a la actividad farmacológica de *C. longa* L. Dichos compuestos se muestran en la Figura 6.

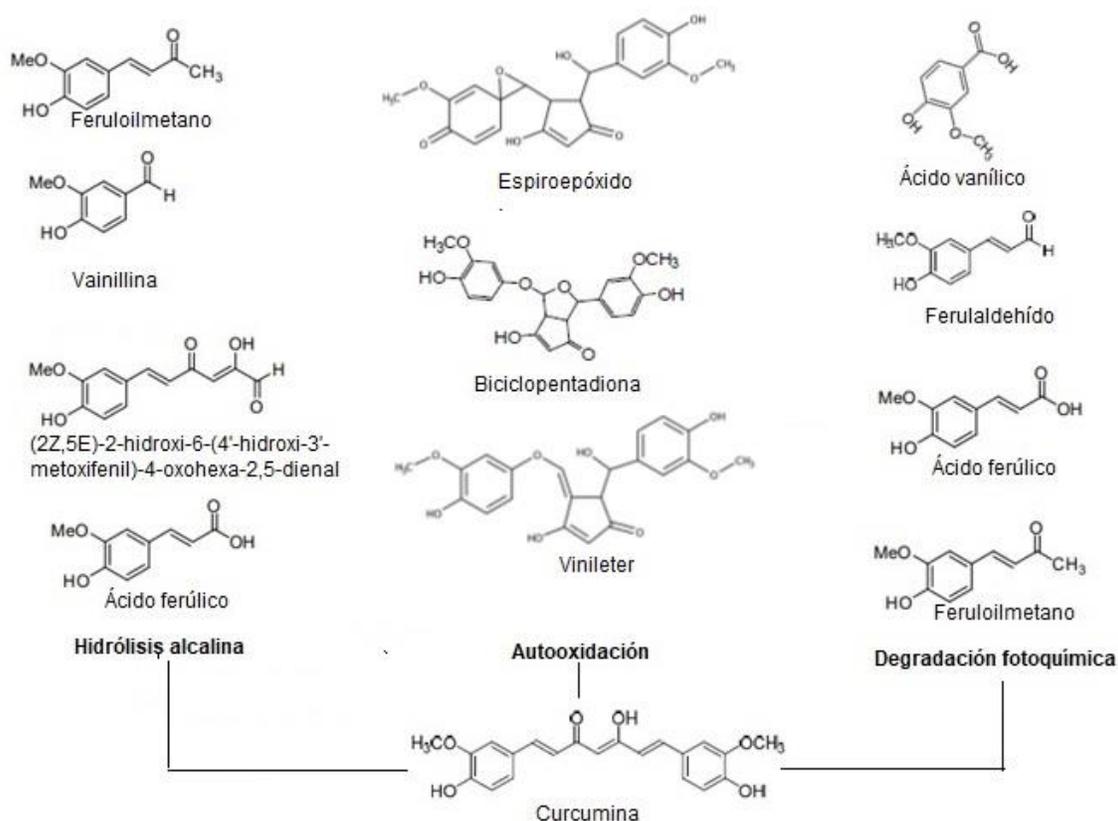


Figura 6. Principales productos de degradación de la curcumina
(Estructuras recuperadas de Zhu, 2017; González-Albadalejo, 2015; Dei Cas, M., 2019)

2.1.3. Actividad biológica

Son muchas las propiedades atribuidas a los extractos de *C. longa* L. y a su componente principal: la curcumina. Desde 1953 se ha investigado el potencial terapéutico de la cúrcuma. En la Figura 7 se resumen diversos efectos biológicos así como sus mecanismos de acción.

Diversos estudios farmacológicos han comparado la actividad de *C. longa* contra medicamentos o moléculas que son empleadas en el tratamiento de patologías asociadas con virus, bacterias, hongos o parásitos (Dei Cas, 2019; Moghadamtousi, 2014; Muhammad, 2018; Macías-Pérez, 2019). Los resultados derivados de estas investigaciones permiten concluir que los curcuminoides, por sí solos, no podrían sustituir el efecto del tratamiento alopático debido a su pobre biodisponibilidad. Es por ello, que solo deben emplearse como preventivos o coadyuvantes del tratamiento para potenciar el efecto deseado.

2.1.4. Farmacocinética

Gran parte de los estudios farmacocinéticos reportados en la literatura, tanto en animales como en humanos, se enfocan en la curcumina. Los estudios biofarmacéuticos realizados con la curcumina atribuyen su pobre absorción a su escasa solubilidad y a la glicoproteína-P (transportador de eflujo de membrana dependiente de ATP). Cabe mencionar que al ser una molécula lipofílica el principal mecanismo de absorción (de la cantidad que llega a ser soluble) es por difusión pasiva. Una vez absorbida, se distribuye mayoritariamente al hígado y los riñones: órganos de mayor irrigación sanguínea.

La curcumina presenta un metabolismo rápido, debido a que se metaboliza por el hígado, el intestino, la bilis y por la microbiota intestinal. El metabolismo hepático e intestinal, se compone de dos fases. La fase I es una reducción dependiente de NADPH que involucra la reducción de los dobles enlaces de la estructura heptadieno-3, 5-diona. En tanto que la fase II es un proceso de conjugación en donde la curcumina y sus metabolitos reducidos, provenientes de la fase I, se conjugan con el ácido glucurónico (mediante β -glucuronidasa; UGT) y con sulfato (por medio de enzimas sulfatasas; SULT), ambos vía O-conjugación (Figura 8). Finalmente, la curcumina se excreta mayoritariamente a través de las heces y se elimina mediante la orina.

Para aumentar la biodisponibilidad de la curcumina se han desarrollado un gran número de estrategias, tales como la modificación estructural, el empaquetamiento en sistemas como liposomas, micelas, complejos de fosfolípidos, nanopartículas, nanoemulsiones, microencapsulación o combinaciones con piperina o lecitina. Por lo tanto, los suplementos alimenticios elaborados con estas tecnologías tendrán un mejor desempeño que aquellos que se elaboren con el compuesto puro o el extracto.

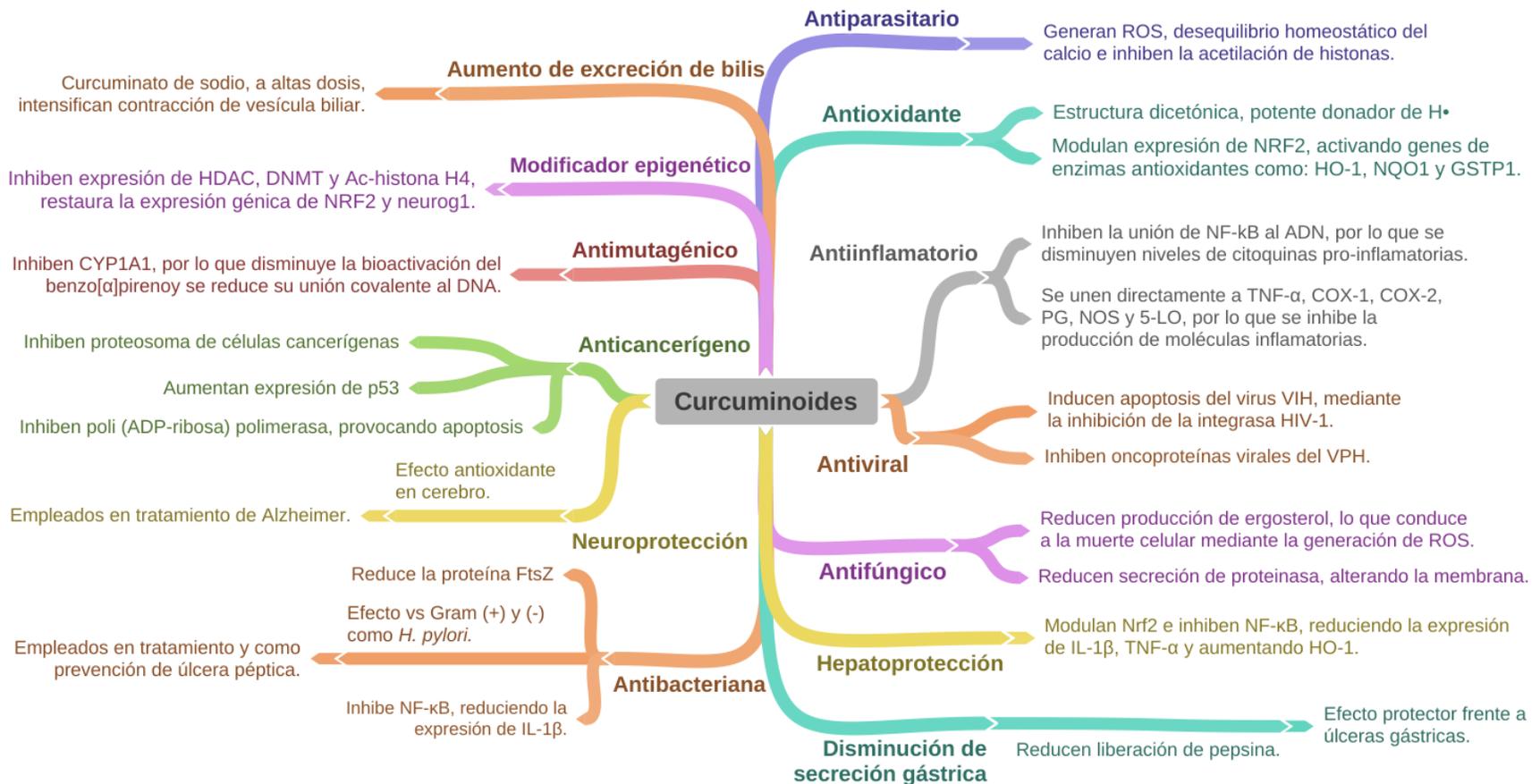


Figura 7. Resumen de actividad biológica de los curcuminoides

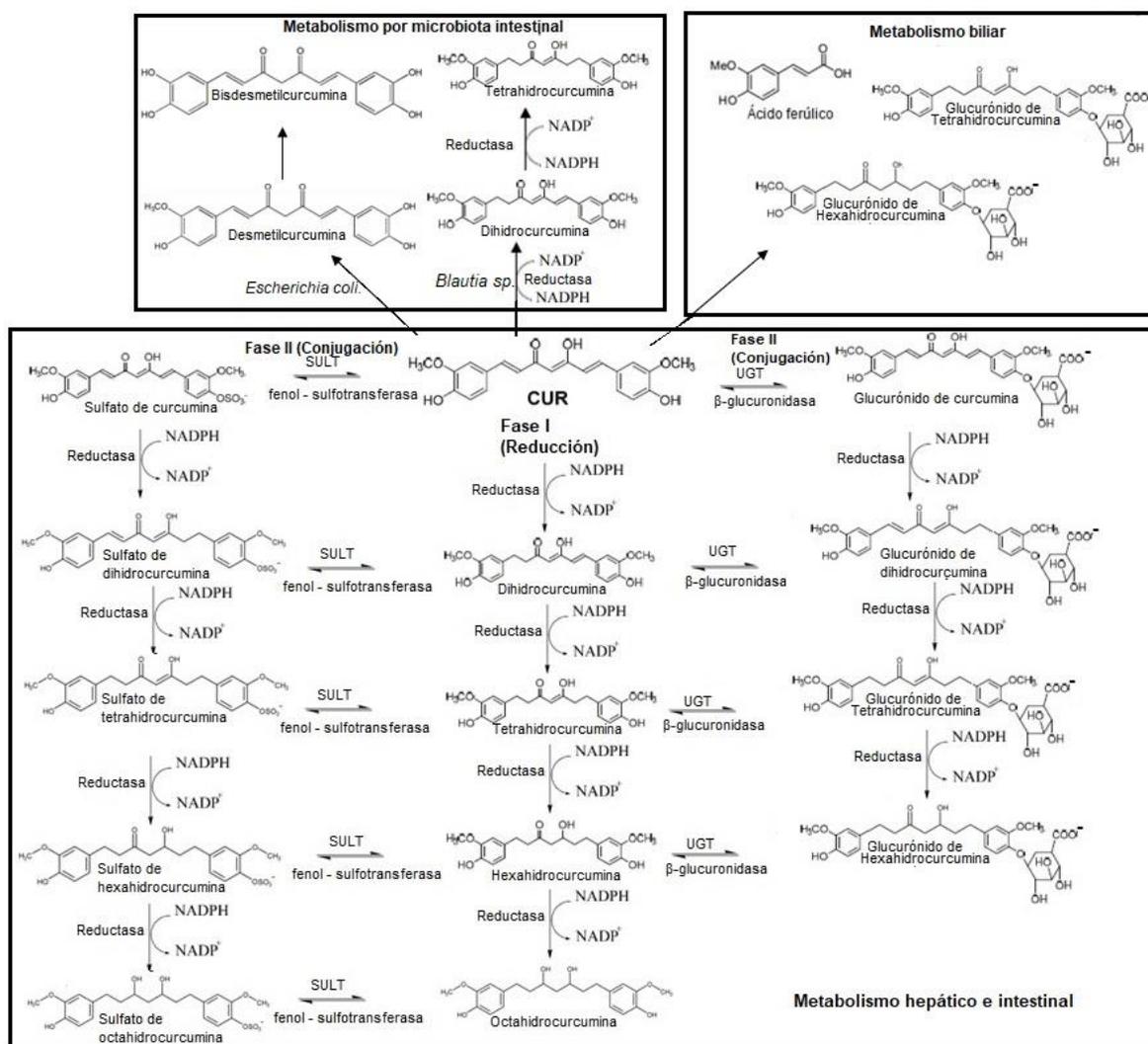


Figura 8. Productos del metabolismo de la curcumina
 (Recuperado de Kotha, 2019; Dei Cas, 2019; Burapan, 2017; Cheng, 2019).

2.2. Suplementos alimenticios

La Ley General de Salud en su Artículo 215, fracción V, define a los suplementos alimenticios (SA) como aquellos productos elaborados a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir algún componente.

Si bien es cierto que los suplementos alimenticios pueden contener vitaminas y/o minerales, estos productos no deben exceder los límites establecidos por los Reglamentos de Insumos para la Salud y el de Control Sanitario de Productos y Servicios. Además, en el Reglamento de Control

Sanitario de Productos y Servicios especifica en el Artículo 168 los ingredientes que pueden formar parte de un SA. En ese mismo documento, en el Artículo 169, se enumeran los ingredientes prohibidos para la elaboración de suplementos, las sustancias con acción farmacológica reconocida o aquellos a los que con base en su composición se les atribuyan propiedades terapéuticas, preventivas o rehabilitatorias.

Los SA son de venta libre, por ende, se pueden adquirir fácilmente en diversos comercios como farmacias, tiendas naturistas, tiendas de conveniencia o a través de internet. Por otra parte, la publicidad de estos productos ha propiciado que su mercado global crezca de manera exponencial. De acuerdo con el Market Research Report, 2020, en el 2019, se registraron ventas por 120 mil millones de dólares y se espera un crecimiento anual del 8% en los próximos años.

La mayoría de los SA a base de plantas se compran a minoristas convencionales o naturales. En 2019, la cúrcuma fue el segundo suplemento alimenticio mundial más vendido dentro del sector de minoristas naturales por quinto año consecutivo con \$50 mil millones de dólares en ventas. La cúrcuma se encuentra en el tercer lugar en ventas de minoristas convencionales con \$90 mil millones de dólares (Nutrition Business Journal; NBJ, 2019).

Dicho crecimiento se debe, entre otros factores, a que los consumidores asocian los SA como productos más naturales, más “saludables” y menos nocivos que las especialidades farmacéuticas. Sin embargo, en muchos casos no suelen ser tan inocuos como aparentan, teniendo en cuenta que desde su introducción en el mercado mundial, se han reportado numerosos informes de productos adulterados que conllevan un alto riesgo para la salud (Figura 9).

La adulteración implica la alteración de la calidad y pureza de un producto. En el caso de los SA, esto puede incluir el uso de especies vegetales relacionadas (por lo general más económicas), la ausencia de algún componente, o bien la presencia de sustancias no declaradas.

Lamentablemente este hecho se ve favorecido por la regulación que rige a los suplementos alimentos; a diferencia de las especialidades farmacéuticas, el proceso de registro, aprobación y comercialización es mucho más simple y, generalmente, el control de calidad de estos recae únicamente en los fabricantes.

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es la dependencia federal encargada de la regulación de los productos herbolarios que se

comercializan en el territorio nacional. Para ejercer sus atribuciones de control sanitario, este organismo autónomo se apoya en los siguientes documentos:

- Ley General de Salud (Artículo 200 Bis a 202; 212, 215 y 216).
- Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios (Artículos 168 a 179).
- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Publicidad (Artículos 21,22, 27 y 79).
- Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.
- ANEXO 1 del acuerdo por el que se dan a conocer los trámites y servicios, así como los formatos que aplica la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, inscritos en el Registro Federal de Trámites y servicios de la Comisión Federal de mejora regulatoria (D.O.F. 19 de junio de 2009).
- Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias (16/07/2012).
- Acuerdo por el que se determinan las plantas prohibidas o permitidas para tés, infusiones y aceites vegetales comestibles (15/12/1999).
- Farmacopea Herbolaria.

A pesar de todos los documentos normativos en los que se apoya la COFEPRIS para la regulación de los SA, existen muchos vacíos que han sobrepasado su capacidad para ejercer su autoridad a fabricantes y distribuidores.

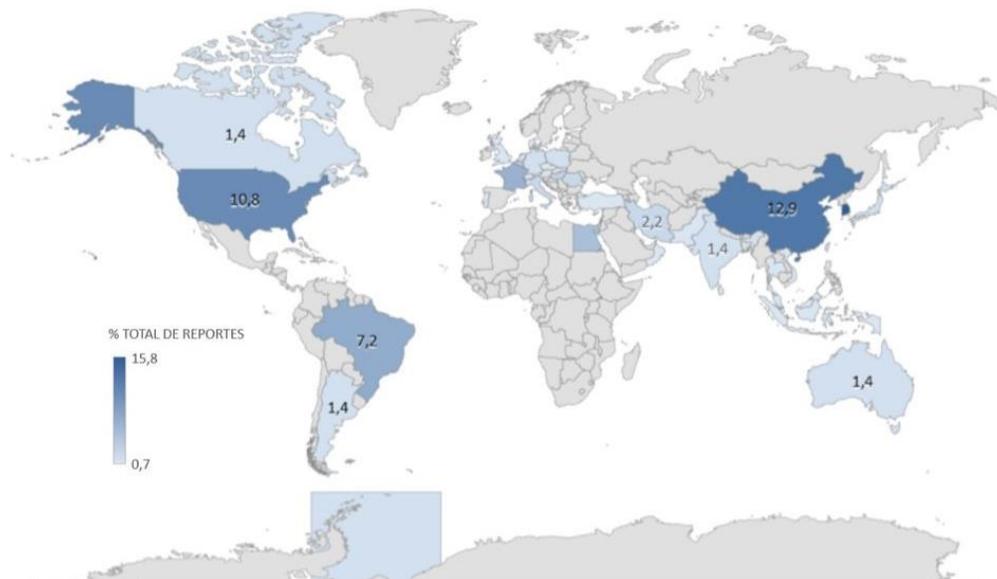


Figura9. Porcentaje de adulteraciones según el país de reporte, expresados como porcentaje del total de reportes entre 2009-2019

(Recuperado de Muschietti, ,2020)

2.3. Control de calidad

Entre las metodologías más utilizadas para este propósito se encuentran las técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Estas técnicas permiten la separación, la detección, la identificación, la cuantificación de sustancias declaradas y, en algunos casos, incluso la cuantificación de sustancias no declaradas. Así, el desarrollo de métodos analíticos adecuados permite establecer si los suplementos alimenticios cumplen con los requisitos de calidad establecidos.

La técnica de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) es una de las más empleadas para el análisis de productos herbolarios. La alta resolución de esta técnica ha permitido apoyar el desarrollo del concepto de la "huella dactilar"; característica para cada planta medicinal y producto herbolario con fines de identificación y autenticación.

Desde una perspectiva regulatoria, los requisitos de la farmacopea son el punto de referencia central para el análisis de plantas medicinales. Sin embargo, las monografías descritas en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos son aún insuficientes considerando la premura con la cual estos productos salen al mercado.

La Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos no cuenta con una monografía para el análisis de *C. longa*. En este caso, y de acuerdo con el Artículo 8 del Reglamento de Insumos para la Salud (RIS), cuando no aparezcan las especificaciones de calidad y los procedimientos de análisis en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y sus suplementos vigentes, podrá recurrirse a farmacopeas de otros países u otra bibliografía científica reconocida internacionalmente.

En este marco de referencia la USP cuenta con una monografía en la que se establecen especificaciones de calidad tanto para los curcuminoides como para los medicamentos en la forma farmacéutica de tabletas y cápsulas. También, la literatura científica describe numerosos métodos para su cuantificación. En la tabla 4 se muestran algunos de los métodos reportados.

Todos los métodos de análisis empleados para la determinación cuantitativa de cualquier analito, en este caso los curcuminoides, deben generar datos reproducibles y confiables con el fin de permitir una interpretación válida de los estudios que sustenta.

Tabla 4. Métodos de cuantificación de curcuminoides de *C. longa* L. por HPLC

Columna	Fase Móvil	Tipo de método	Flujo (mL/min)	Vol. de inyección (μL)	T (°C)	Detector	λ(nm)	Tiempo de análisis (min)	Referencia
Nucleosil NH ₂ (250 x 4.6 mm, 5 μm)	Etolol R.A	Isocrático	NE	20	25	Fluorímetro	Excitación:420 Emisión: 470	30	Tønnesen, H., et. al. (1985).
C18 (300 x4.6 mm, 5 μm)	MeOH (A) : Ác. acético 2%v/v (B): ACN (C)	Gradiente 0 min : 5%A: 45%B: 50%C 1-15 min : 5%A : 65%B: 30%C 15-20 min : 5%A: 50%B: 45% C	1.0	20	25	UV	425	20	Jayaprakasha, G., et. al (2002).
C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm)	ACN: Ác. acético 2% v /v [40:60]	Isocrático	2.0	20	33	UV-Vis	425	16	Wichitnithad, W., et. al. (2009).
C8 (2.1 x 50 mm, 5 μm)	Ác. Fórmico 0.1% (v/v) en ACN [A] y Agua [B] [50:50]	Isocrático	0.2	20	25	MS	NA	12	Vijaya Saradhi, e. al (2010)
C18 (4.6 x 12.5 mm, 5 μm)	ACN: Ácido acético 2% (v/v) , pH 2.6 [40: 60]	Isocrático	1.3	20	35	UV	370	18.5	Ang, L, et. al.. (2014).
C8 (2.1x 50 mm, 2.7μm)	Acetato de amonio 10 mM y Ác. Fórmico 0.1%(v/v) en agua [A] o en ACN [B]	Gradiente 0-5 min: 20% B 5-8.1 min: 80% B 8.1-10.0 min: 20% B	0.3	2.0	25	MS	NA	10	Tan, S., et.al. (2015)
C8 (2.1 x150 nm, 3.5 μm)	ACN y Ác. acético 0,5% (v/v) [A] ; Agua y Ác. Fórmico 2% (v/v) [B]	Gradiente 0 min: 10% A-90%B 20 min: 85%A-15%B 21 min. 100% A- 0%B 21.5 min: 10% A- 90% B 27 min: 10%A-90%B	0.2	10	25	MS	NA	27	Dall'Acqua, S., et. al (2016)
C18 (150 x4.6 mm, 5 μm)	ACN: acetato de amonio, pH 3.5 [45:55]	Isocrático	1.0	20	25	UV	425	17	Amanolahi, F., et. al. (2017).

T: temperatura, λ: Longitud de onda, MeOH: Metanol, ACN: Acetonitrilo, NE: No Especificado.

Continuación de Tabla 4. Métodos de cuantificación de curcuminoides de *C.longa* L. por HPLC

Columna	Fase Móvil	Tipo de método	Flujo (mL/min)	Vol. de inyección (μL)	T (°C)	Detector	λ(nm)	Tiempo de análisis (min)	Referencia
C18 (2.1×50 mm, 3.5 μm)	MeOH[Disolvente B] Formiato de amonio 10mM (pH 3,0) [Disolvente A]	Gradiente 0-3.0 min : 25%A-75% B 3.0-7.5 min : 90%A-10% B 7.5-7.51 min: 75%A-25% B 7.51-11.0 min : 25%A-75% B	0.25	20	4	MS	NA	11	Kunati, S., et.al (2018).
C18 (4.6 x 150 mm, 3 μm)	Acetato de amonio 10mM, pH 4.5 (disolvente A) y ACN (disolvente B)	Gradiente 0-14 min : 90%A-10%B 15-24 min : 60%A-40%B 25-29 min : 15%A-85%B 30 min : 100%B 30.1-40.0 min : 90%A-10%B	1.0	25	50	UV-Vis	426	40	Mahale, J., et. al. (2018).
C18 (250× 4.6 mm, 5 μm)	ACN [A] y Ác. acético 0.4% (v/v) [B]	Gradiente 0–13 min: 5% A-95% B 13–16 min : 45 a 56% A-55a 44%B 16–50 min: 56% A-44%B 50–55 min : 56 a 100%A- 44 a 0% B	1.0	10	35	UV	430	55	Chao, I. C., et. al. (2018).
C18 (4.6 x 150 mm, 5 μm)	ACN: agua , pH 4.6 [55:45]	Isocrático	0.8	20	25	UV	425	10	Nasr, M.,et. al.. (2019)
C18 (55 x 4 mm, 3μm)	ACN: MeOH: Ác. acético 2% (v / v) [37.5: 2.5: 60]	Isocrático.	1.0	20	35	UV	425	13	Silva, J., et. al. (2019).

T: temperatura, λ: Longitud de onda, MeOH: Metanol, ACN: Acetonitrilo, NE: No Especificado

2.4. Validación de métodos analíticos

El procedimiento analítico se refiere a la forma, en detalle, para realizar las pruebas analíticas (ICH-Q2, 2005). El desarrollo de un método analítico implica el desarrollo del método con sus diversos parámetros y se divide en el desarrollo del método y en su validación.

El desarrollo de un método analítico es una de las etapas que consumen más tiempo y esfuerzo, por ello, se recomienda como primer paso reunir toda la información que pueda conducir, de manera exitosa, a la obtención del método analítico. Con la información recabada, se inicia el trabajo experimental del desarrollo en donde los experimentos empíricos y el diseño de experimentos son instrumentos que permiten encontrar las mejores condiciones para analizar el analito de interés.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el análisis de un analito, es necesario evaluar si el procedimiento desarrollado se comporta de manera consistente. Ante la necesidad de asegurar que los resultados experimentales obtenidos durante un estudio son confiables, surge el concepto de la validación de métodos analíticos.

La validación de un método es el proceso que establece, mediante procedimientos experimentales, que las características de desempeño cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 37 NF32).

Las características analíticas típicas empleadas para la validación de métodos son: exactitud, precisión (repetibilidad o precisión intermedia), especificidad, linealidad, robustez, límite de detección y de cuantificación.

Entiéndase los parámetros de validación como:

Exactitud. Expresa la cercanía entre los resultados obtenidos experimentalmente respecto a los valores considerados como reales, convencional o teóricos.

Precisión. Describe la cercanía de las mediciones individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión se puede considerar en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad: expresa la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento en un intervalo corto de tiempo; también se denomina precisión intra-ensayo.

Precisión intermedia: expresa variaciones en el laboratorio, debido a la aplicación del método en diferentes días, por diferentes analistas y diferentes equipos, entre otros.

Reproducibilidad: expresa el grado de concordancia de los resultados experimentales entre laboratorios.

Especificidad. Capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito de interés en presencia de otros componentes de la muestra.

Linealidad. Capacidad del método (dentro de un intervalo establecido) para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

Robustez. Medida de la capacidad del método para no resultar afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método.

Límite de detección. Cantidad mínima del analito en una muestra que se puede detectar pero no necesariamente cuantificarse en las condiciones experimentales indicadas.

Límite de cuantificación. Cantidad mínima de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud en las condiciones experimentales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico, indicativo de estabilidad, que permita identificar y cuantificar a los curcuminoides en diferentes suplementos alimenticios.

3.2. Objetivos particulares

- Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar a los curcuminoides en diferentes insumos para la salud de acuerdo con los parámetros establecidos en la guía de validación para métodos analíticos ICH Q2.
- Identificar la presencia de *Curcuma longa* L. en los insumos analizados.
- Determinar si los insumos analizados cumplen con los límites especificados en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP).

4. METODOLOGÍA

4.1. Método analítico para cuantificar curcuminoides

4.1.1. Desarrollo del método analítico

El desarrollo y la validación del método analítico se realizó por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Para este propósito se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10A (VP); una bomba LC10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplados a un equipo de cómputo. El control del equipo así como el procesamiento de los datos obtenidos se realizó utilizando el software LC solution.

Las soluciones empleadas durante el desarrollo y la validación de los métodos analíticos fueron preparadas utilizando un estándar marca Sigma-Aldrich con una pureza de curcuminoides de $\geq 94\%$ y de curcumina $\geq 80\%$.

4.1.2. Preparación de soluciones

4.1.2.1. Solución stock

La solución stock del estándar de curcuminoides se preparó a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol. A partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones para obtener todas las soluciones empleadas en el desarrollo y la validación del sistema y método.

4.1.2.1. Fase móvil acidificada

La fase móvil acidificada se realizó preparando una solución de ácido acético al 3% v/v empleando ácido acético glacial (ACS, Fermont). Posteriormente, se ajustó el pH a 2.45 con NaOH 1 M y se aforó con agua desionizada (Merck Mili Q).

4.1.3. Diseño de experimentos para el desarrollo del método cromatográfico

El desarrollo del método analítico se sustenta en los métodos cromatográficos descritos en la literatura, evaluando distintas columnas y diferentes sistemas de elución. Para encontrar las condiciones óptimas de los métodos propuestos se realizaron tres diseños de experimentos factoriales 2³. Los factores se seleccionaron considerando la información reportada en la bibliografía (Ang, 2014; Cheng, 2010; Amanolahi, 2017; Wichitnithad, 2009).

Tabla 5. Factores y niveles evaluados para el diseño experimental 1.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
% V/V de ácido acético	1	3
Proporción de Metanol	10	20
Proporción de Acetonitrilo	30	40

Tabla 6. Factores y niveles evaluados para el diseño experimental 2.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
% V/V de ácido acético	1	3
Proporción de Agua	40	60
Proporción de Acetonitrilo	30	40

Tabla 7. Factores y niveles evaluados para el diseño experimental 3.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
pH de fase móvil	2.35	2.55
Flujo (mL/min)	1.0	1.5
Proporción de Acetonitrilo	40	60

La aleatorización del diseño se realizó empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. Las respuestas evaluadas para cada diseño de experimentos fueron factor de coe, resolución y amplitud del pico principal; en cada caso se determinó la influencia de cada uno de los factores sobre las respuestas mencionadas anteriormente.

En todos los experimentos llevados a cabo para el desarrollo del método se utilizó una solución de curcuminoides, en metanol, a una concentración de 60 µg/mL.

4.2. Validación del método analítico para cuantificar curcuminoides por HPLC

Se desarrolló un protocolo de validación de acuerdo con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos analíticos emitida por la ICH (ICH-Q2 "Validation of analytical procedures") y la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP 37, 2014).

Para el sistema se evaluaron la adecuabilidad, la precisión y la linealidad. Para validar el método los parámetros evaluados fueron la linealidad, la exactitud, la precisión (repetibilidad y precisión intermedia), la especificidad, y los límites de cuantificación y detección.

Para este fin, se utilizó una columna Symmetry Shield RP8 marca Waters(C-8), con un tamaño de partícula de 5 μm , 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. Como sistema de elución se utilizó una fase móvil binaria compuesta por acetonitrilo (grado HPLC, Honeywell) y ácido acético acuoso 2% v/v a un pH de 2.45 (ácido acético glacial, ACS, Fermont; Agua desionizada Merck Mili Q), en una proporción 50:50. El flujo fue de 1.3 mL/min, con un volumen de inyección de 20 μL y, una longitud de onda de 360 nm.

4.2.1. Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se evaluó la adecuabilidad, linealidad y precisión del sistema. Para ello se realizaron diferentes diluciones (soluciones de trabajo) a partir de la solución stock.

4.2.1.1. Adecuabilidad del sistema

La evaluación de la adecuabilidad del sistema se determinó analizando, por quintuplicado, una solución estándar de curcuminoides a una concentración de 61.2 $\mu\text{g/mL}$. Los parámetros registrados fueron tiempo de retención, factor de coe, resolución, factor de capacidad y el número de platos teóricos. Finalmente, se determinó el coeficiente de variación (% CV) entre las réplicas para determinar si el sistema es adecuado para la ejecución de los análisis.

4.2.1.2. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se llevó a cabo mediante el análisis de tres curvas de calibración con siete niveles de concentración en un intervalo de 10.2 $\mu\text{g/mL}$ a 122.4 $\mu\text{g/mL}$. Cada

curva se preparó mediante diluciones independientes a partir de la solución stock (Tabla 8). El análisis estadístico de la respuesta obtenida se realizó mediante una regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados, calculando la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), el coeficiente de determinación (r^2), el coeficiente de correlación (r) y el intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$] y ordenada al origen [$IC(\beta_0)$].

Tabla 8. Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración del sistema.

Nivel de concentración	Concentración de la solución stock	Volumen de alícuota (mL)	Aforo con MeOH (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
1	204 $\mu\text{g/mL}$	0.5	10	10.2
2		1	10	20.4
3		2	10	40.8
4		3	10	61.2
5		4	10	81.6
6		5	10	102
7		3	5	122.4

4.2.1.3. Precisión del sistema

La precisión del sistema se determinó por medio del análisis, por sextuplicado, de soluciones preparadas de manera independiente a una concentración de 61.2 $\mu\text{g/mL}$ a partir de la solución stock. Con la respuesta analítica obtenida se calculó el coeficiente de variación.

4.2.2. Validación del método analítico

Todas las soluciones de trabajo empleadas en la validación del método se prepararon a partir de una solución madre del extracto de cúrcuma (marca Kirkland), en metanol, a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; esta solución se mezcló con diferentes proporciones de la solución stock de curcuminoides para generar muestras enriquecidas.

4.2.2.1. Linealidad y exactitud del método

Para determinar ambos parámetros, se utilizó la técnica del estándar adicionado. Para dicho propósito se preparó, por triplicado, una curva de calibración del estándar con seis niveles de concentración. Cada curva se preparó mediante diluciones independientes de la solución stock y se adicionaron 3 mL de una solución del producto de prueba a una concentración de 1010 µg/mL, como se indica en la Tabla 9.

La linealidad del método se determinó mediante una regresión lineal entre la concentración (variable X) y la suma de las áreas bajo la curva de los curcuminoides (variable Y); los parámetros calculados fueron β_0 , β_1 , r^2 , r , $[IC(\beta_1)]$ y $[IC(\beta_0)]$.

La exactitud del método se estableció mediante la estimación del porcentaje de recobro $[IC(\mu)]$ también, conocido como porcentaje de recuperación para cada muestra adicionada. Posteriormente, se determinó el promedio aritmético y la desviación estándar para cada nivel. La ecuación para calcular el $[IC(\mu)]$ es la siguiente:

$$Exactitud = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100$$

Tabla 9. Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración.

<i>Nivel de concentración</i>	<i>Volumen de la solución stock</i> [200 µg/mL]	<i>Volumen de la solución muestra</i> [1010 µg/mL]	<i>Aforo con MeOH (mL)</i>	<i>Concentración final del estándar de curcumina (µg/mL)</i>	<i>Concentración final de la solución de trabajo (µg/mL)</i>
1	0.5 mL	3 mL	10	10	19.7
2	1 mL	3 mL	10	20	29.9
3	2 mL	3 mL	10	40	50.3
4	3 mL	3 mL	10	60	70.7
5	4 mL	3 mL	10	80	91.1
6	5 mL	3 mL	10	100	111.5

4.2.2.2. Precisión del método

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Se determinó la repetibilidad del método mediante el análisis de seis soluciones independientes a una concentración de 70.7 µg/mL de la solución de trabajo; posteriormente, se calculó el coeficiente de variación.

La precisión intermedia, se evaluó con el análisis por triplicado de la solución de trabajo a una concentración de 70.7 µg/mL. Las soluciones se prepararon por diferentes analistas en diferentes días.

4.2.2.3. Especificidad del método

Para evaluar la especificidad del método se analizó la posible interferencia de los productos de degradación obtenidos mediante reacciones de oxidación e hidrólisis básica y ácida. Para cada condición de degradación se trabajaron dos réplicas.

Se emplearon dos soluciones, la primera solución se preparó con el estándar de curcuminoides a una concentración de 60µg/mL obtenida por dilución de la solución stock. La segunda solución se preparó con el extracto de cúrcuma (producto de prueba), en metanol, a una concentración de 306 µg/mL.

Posteriormente, se colocó a reflujo 1 mL de la solución del estándar de curcuminoides con 1 mL del reactivo de degradación correspondiente durante 1 h (Tabla 10). Al término de este proceso se analizaron las muestras en el sistema cromatográfico; con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de degradación. El mismo procedimiento se aplicó para degradar el producto prueba (Tabla 11).

Tabla 10. Condiciones de degradación del estándar de curcuminoides.

Condición experimental	Estándar de curcuminoides (60µg/mL)	Reactivo adicionado	Tiempo a reflujo
Sin tratamiento	1 mL	Ninguno	1 hora
Hidrólisis básica	1 mL	1 mL NaOH 1 M	1 hora
Hidrólisis ácida	1 mL	1 mL HCl 1 M	1 hora
Oxidación	1 mL	1 mL H ₂ O ₂ 5%	1 hora

Tabla 11. Condiciones de degradación del producto prueba.

Condición experimental	Extracto de curcumina (306 µg/mL)	Reactivo adicionado	Tiempo a reflujo
Sin tratamiento	1 mL	Ninguno	1 hora
Hidrólisis básica	1 mL	1 mL NaOH 1 M	1 hora
Hidrólisis ácida	1 mL	1 mL HCl 1 M	1 hora
Oxidación	1 mL	1 mL H ₂ O ₂ 5%	1 hora

4.2.2.4. Robustez del método

La robustez del método analítico se evaluó mediante un diseño de experimentos factorial; los factores seleccionados fueron el pH de la fase móvil, el flujo y la variación de componentes en la fase móvil (Tabla 12). La solución de trabajo empleada para dicho análisis se preparó a partir de la solución stock, del estándar de curcuminas, a una concentración de 60 µg/mL.

El efecto de cada factor se analizó por duplicado; las respuestas analizadas fueron la resolución y la amplitud del pico principal de los curcuminoides. La aleatorización del diseño y el análisis estadístico se realizó empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

Tabla 12. Factores seleccionados para evaluar la robustez del método analítico.

Condiciones cromatográficas.	Condición de operación.	Nivel bajo.	Nivel alto.
pH de fase móvil	2.45	2.35	2.55
Flujo	1.3 mL/min	1.0 mL/min	1.5 mL/min
Composición de la fase móvil	Proporción de ACN: 50	40	60
	Proporción de H ₂ O: 50	60	40

4.2.2.5. Límites de cuantificación y detección

Para estimar el límite de cuantificación se empleó el método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente mediante la siguiente relación:

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde:

σ = la desviación estándar de la respuesta. En este caso se estimó basándose en la curva de calibración, donde dicha desviación se determina del intercepto.

S = la pendiente de la curva de calibración del analito.

Por otra parte, para la estimación del límite de detección se utilizó la siguiente expresión:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

4.3. Cuantificación de curcuminoides en suplementos alimenticios empleando el método analítico

Una vez demostrada la validez del método analítico se analizaron dos suplementos alimenticios: unas cápsulas y un polvo.

Para el análisis de las cápsulas se determinó el contenido promedio de 20 unidades de dosificación. A partir del polvo contenido en las 20 cápsulas se pesó la cantidad equivalente a una dosis y se disolvió con ayuda del baño de ultrasonido durante 10 minutos en 10 mL de metanol. A partir de la solución filtrada se realizó una dilución 7 en 10 para su análisis cromatográfico; se trabajaron tres réplicas y se determinó su contenido.

Para el análisis del polvo se pesaron 150.0 mg y se extrajeron con 20 mL de MeOH. El proceso de extracción se realizó utilizando el sonicador durante 10 minutos; la suspensión resultante se filtró y se analizó. Se prepararon tres réplicas independientes para estimar el contenido de curcuminoides.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Método analítico para cuantificar curcuminoides

5.1.1. Desarrollo del método analítico

Para el desarrollo del método analítico se tomaron como base algunos de los métodos cromatográficos descritos en la literatura (Ang, 2014; Cheng, 2010; Amanolahi, 2017; Wichitnithad, 2009). Así, se evaluaron distintas columnas y diferentes sistemas de elución (véase Anexo, Tabla 43, página 67) con el fin de obtener las condiciones cromatográficas óptimas que permitieran observar picos con características similares a un comportamiento gaussiano simétrico.

Por otro lado, para establecer la longitud de onda de máxima absorción para los curcuminoides se utilizó el espectro de absorción en el UV reportado en la literatura (Velázquez García, 2016) de una solución de referencia preparada con MeOH, en el intervalo espectral de 200 a 800 nm. De acuerdo con el espectro en el UV se observa que la mezcla de curcuminoides presenta máximos de absorción a 203, 259 y 421 nm como se ilustra en la Figura 10. La Tabla 13 resume los valores de máxima absorción.

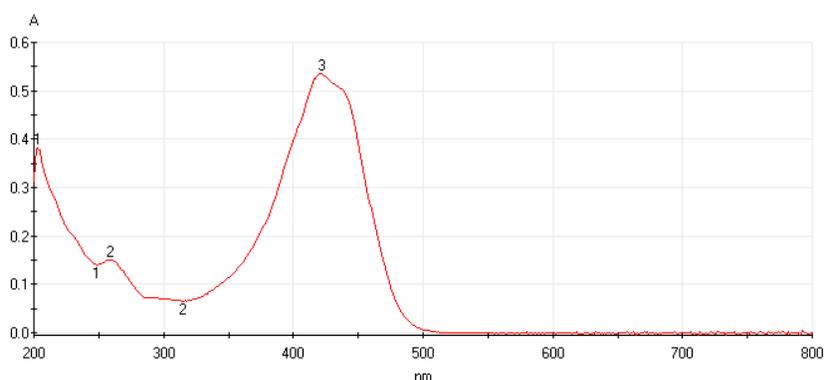


Figura 10. Espectro UV-VIS de estándar de curcuminoides [100 µg/mL].
(Recuperado de Velázquez García, 2016)

Tabla 13. Máximos de absorción observados con el estándar de curcuminoides.

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

Recuperado de Velázquez García, 2016.

Posteriormente, para establecer las condiciones cromatográficas óptimas del método de cuantificación se realizaron tres diseños de experimentos tipo factorial con tres factores y dos niveles (2^3).

Los diseños factoriales son empleados en gran medida para estudiar el efecto de cada factor y la interacción de estos sobre una respuesta. El diseño puede aplicarse entonces, para mejorar el desempeño o bien, para obtener procesos robustos a las fuentes de variabilidad analizadas.

Los factores evaluados fueron la proporción de metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) y ácido acético; %v/v del ácido acético, pH de la fase móvil y el flujo.

5.1.2. Diseño de experimentos para el desarrollo del método cromatográfico

5.1.2.1. Diseño factorial 1

El primer diseño de experimentos tiene como objetivo determinar la proporción de ACN y MeOH en la fase móvil, así como establecer el %v/v de ácido acético a emplear.

En la Tabla 14 se resume la aleatorización del diseño y los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de análisis. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación que describe el modelo factorial:

$$\text{Amplitud} = 15.348 + 0.89725*\%Ácido - 0.36925*\text{MeOH} - 0.34205*\text{ACN} - 0.0251*\%Ácido*\text{MeOH} - 0.0137*\%Ácido*\text{ACN} + 0.0085*\text{MeOH}*\text{ACN}.$$

En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos del análisis de varianza del modelo. El valor-P estimado para los factores MeOH y ACN es menor a 0.05 en ambos casos; por lo tanto, la diferencia entre los factores es estadísticamente significativa. Asimismo, el valor P estimado para la interacción MeOH-ACN indica un efecto significativo.

El diagrama de Pareto (Figura 11) permite corroborar los efectos estimados para cada factor en orden decreciente de importancia. En dicho diagrama se observa que los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo en la amplitud del pico (rebasan la línea vertical indicada de color azul) son la proporción de metanol, de acetonitrilo y la interacción entre ambos. Finalmente, la gráfica de efectos principales (Figura 12) ilustra que entre mayor sea la pendiente de la recta para cada factor, mayor es la influencia sobre la respuesta evaluada. Con base en los resultados obtenidos es posible concluir, con el 95% de confianza, que los factores MeOH, ACN y su interacción afectan significativamente la amplitud del pico.

Tabla 14. Aleatorización y resultados del diseño factorial 1.

% v/v Ácido acético	MeOH	ACN	Amplitud	%v/v Ácido acético	MeOH	ACN	Amplitud
3	20	30	2.634	3	20	30	2.650
3	10	40	1.497	3	10	40	1.479
1	20	40	1.141	1	20	40	0.792
1	20	30	3.184	1	20	30	3.292
3	20	40	0.841	3	20	40	0.800
3	10	30	5.100	3	10	30	5.375
1	10	40	1.809	1	10	40	1.659
1	10	30	4.275	1	10	30	5.758

Tabla 15. Análisis de varianza para el modelo del diseño factorial 1.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:%v/v de ácido acético	0.147072	1	0.147072	0.89	0.3723
B:MeOH	8.43612	1	8.43612	51.24	0.0001
C:ACN	30.9414	1	30.9414	187.92	0.0000
AB	0.128522	1	0.128522	0.78	0.4027
AC	0.00007225	1	0.00007225	0.00	0.9838
BC	2.15943	1	2.15943	13.11	0.0068
bloques	0.109561	1	0.109561	0.67	0.4383
Error total	1.31723	8	0.164654		
Total (corr.)	43.2394	15			

Diagrama de Pareto Estandarizada para Amplitud

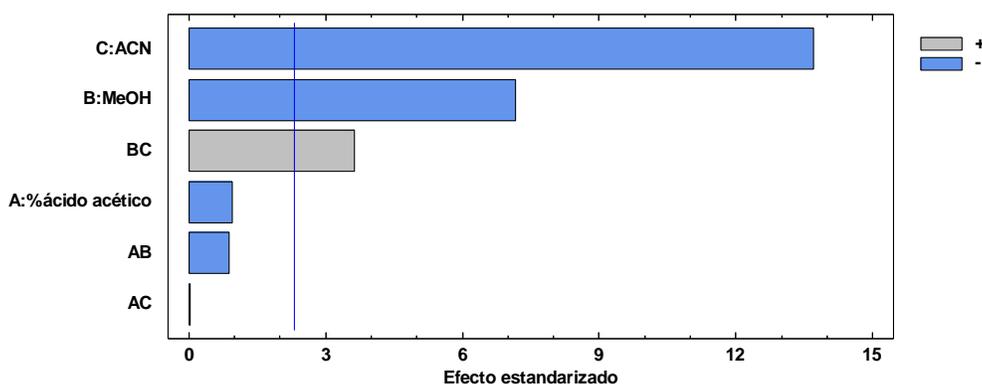


Figura 11. Diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño factorial 1.

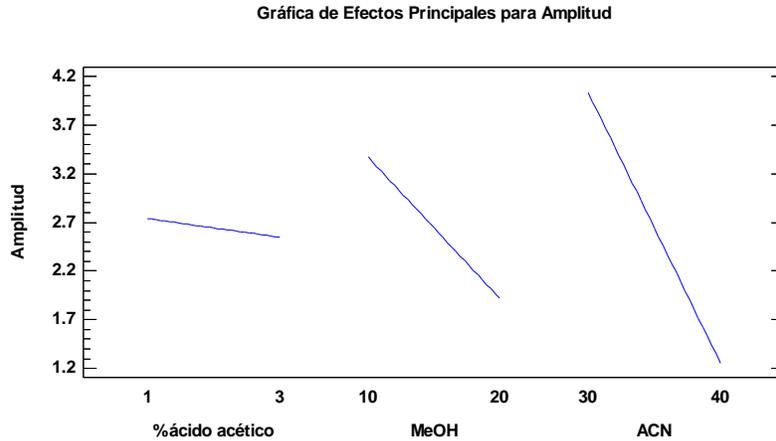


Figura 12. Gráfica de efectos principales del diseño factorial 1.

Utilizando la gráfica de malla de superficie de la respuesta estimada (Figura 13) se concluye que las condiciones óptimas para el análisis son: 38 a 40% de ACN, 16 a 20% de MeOH y 2.2 a 3.0 % v/v de ácido acético.

Debido a que el porcentaje de ácido acético, en la fase móvil, no presentó un efecto significativo en la amplitud del pico, en la gráfica de contornos de superficie (Figura 14), se fijó este factor a su nivel medio (2.0%). Mediante el análisis gráfico es posible establecer que un 40% de ACN y un 20% de MeOH la respuesta analítica es óptima.

En síntesis, las condiciones cromatográficas óptimas para obtener una amplitud del pico de 0.706 son: 20 % de MeOH, 40 % de ACN y 3% v/v de ácido acético.

Una vez establecida la proporción de ácido y disolventes orgánicos en la fase móvil se realizó un segundo diseño factorial con la finalidad de establecer la proporción de agua a utilizar y determinar su influencia en la respuesta evaluada.

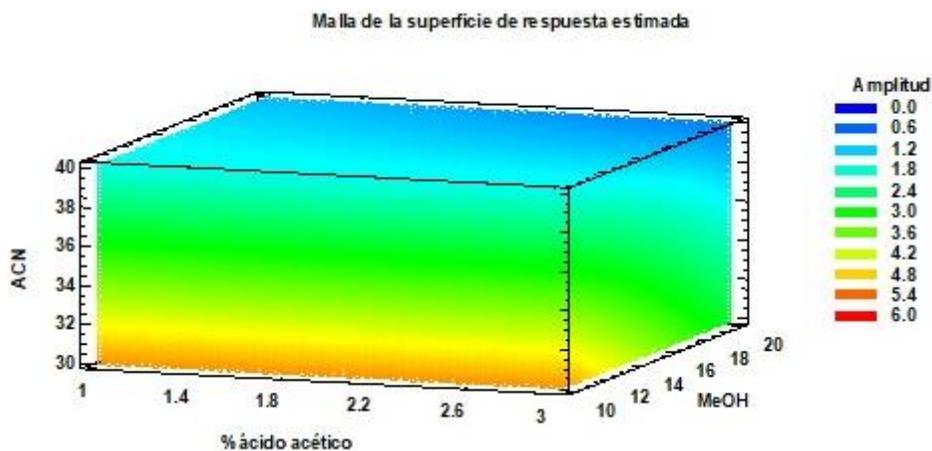


Figura 13. Gráfica de malla de superficie del diseño factorial 1.

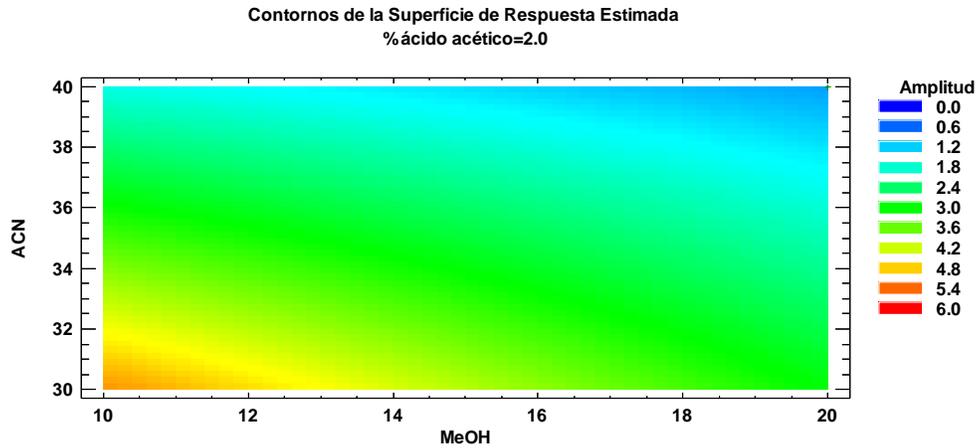


Figura 14. Gráfica de contornos de superficie del diseño factorial 1.

5.1.2.2. Diseño factorial 2

Una vez determinadas las proporciones de ACN y MeOH, se evaluó la influencia de la proporción de agua en la fase móvil.

En la Tabla 16 se resume la aleatorización del diseño y los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de análisis del diseño factorial 2. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación que describe el modelo factorial:

$$Amplitud = -25.4572 + 2.42062 * \% \text{ ácido acético} + 0.587575 * ACN + 0.620612 * Agua - 0.0516 * \% \text{ ácido acético} * ACN - 0.016625 * \% \text{ ácido acético} * Agua - 0.01335 * ACN * Agua.$$

En la Tabla 17 se muestran los valores obtenidos del análisis de varianza del modelo. Como se observa en la información presentada el valor- P estimado para los factores ACN y agua son menores a 0.05, lo que indica que la diferencia entre los valores es estadísticamente significativa. Asimismo, la interacción entre los factores ACN-Agua, obtuvo un valor P estimado menor a 0.05.

En la Figura 15, el diagrama de Pareto, muestra los efectos estimados para cada factor en orden decreciente de importancia, se observa que los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo en la amplitud del pico rebasan la línea vertical indicada en color azul, en este caso sobrepasan dicha línea el agua, ACN y su interacción.

Finalmente, en la Figura 16 se ilustran los principales efectos que presentan los factores analizados; se observa que entre mayor sea la pendiente de la recta para cada factor, mayor

es la influencia sobre la respuesta evaluada. Con base en estos resultados se concluye, con el 95% de confianza, que los factores ACN, agua y su interacción afectan significativamente la amplitud del pico.

Tabla 16. Aleatorización y resultados del diseño factorial 2.

%v/v ácido acético	ACN	Agua	Amplitud	%v/v ácido acético	ACN	Agua	Amplitud
1	40	60	2.834	1	40	60	2.84
3	30	40	1.359	3	30	40	1.365
3	40	40	0.841	3	40	40	0.800
3	30	60	5.100	3	30	60	5.375
1	40	40	1.141	1	40	40	0.792
1	30	60	4.275	1	30	60	5.758
1	30	40	1.400	1	30	40	1.435
3	40	60	1.083	3	40	60	1.086

Tabla 17. Análisis de varianza para el modelo del diseño factorial 2.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: % ácido acético	0.750822	1	0.750822	3.06	0.1182
B:ACN	13.4139	1	13.4139	54.73	0.0001
C:Agua	23.0832	1	23.0832	94.19	0.0000
AB	1.06502	1	1.06502	4.35	0.0706
AC	0.442225	1	0.442225	1.80	0.2160
BC	7.1289	1	7.1289	29.09	0.0007
bloques	0.12567	1	0.12567	0.51	0.4943
Error total	1.9606	8	0.245075		
Total (corr.)	47.9704	15			

Diagrama de Pareto Estandarizada para Amplitud

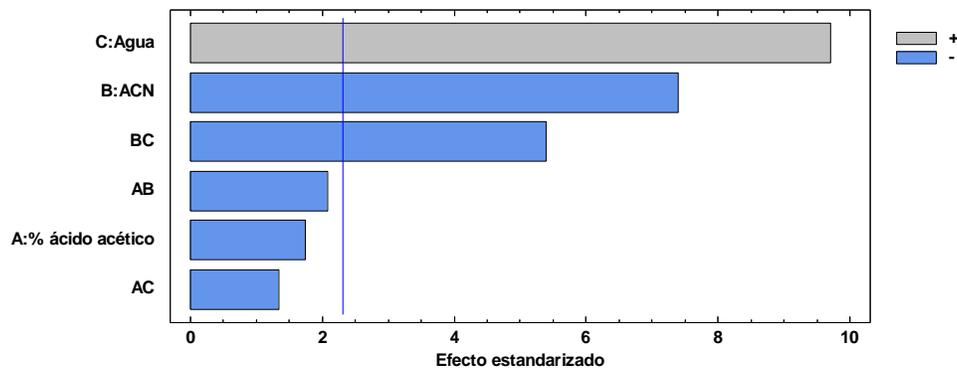


Figura 15. Diagrama de Pareto de los factores evaluados del diseño factorial 2.

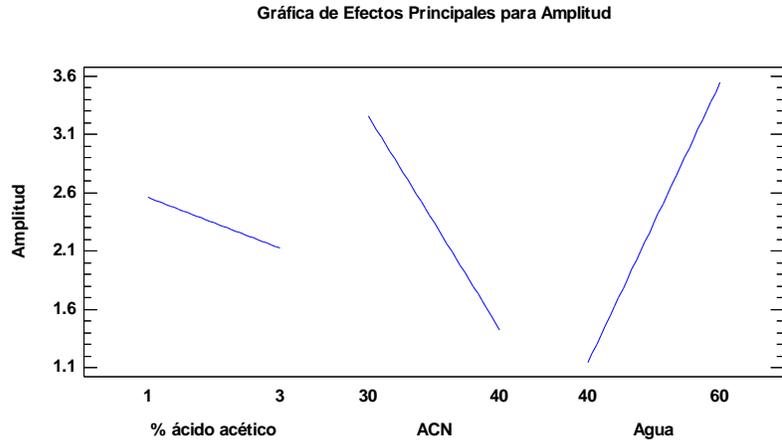


Figura 16. Gráfica de efectos principales para el diseño factorial 2.

En este segundo diseño factorial la gráfica de malla superficie (Figura 17) permite estimar que la respuesta es óptima con una proporción de agua entre 40-44 % y porcentajes de 30-40 y 3.0 % de acetonitrilo y ácido acético, respectivamente.

De nueva cuenta, en la gráfica de contornos de superficie (Figura 18), el porcentaje de ácido acético se fijó a su nivel medio (2.0%). Del análisis gráfico se deduce que el menor valor para la amplitud del pico se obtiene utilizando una proporción de 40% de ACN y 40 % de agua.

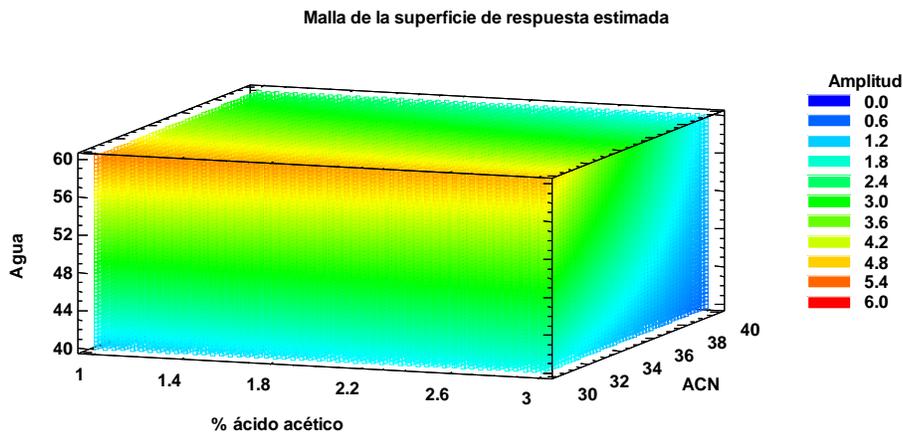


Figura 17. Gráfica de malla de superficie del diseño factorial 2.

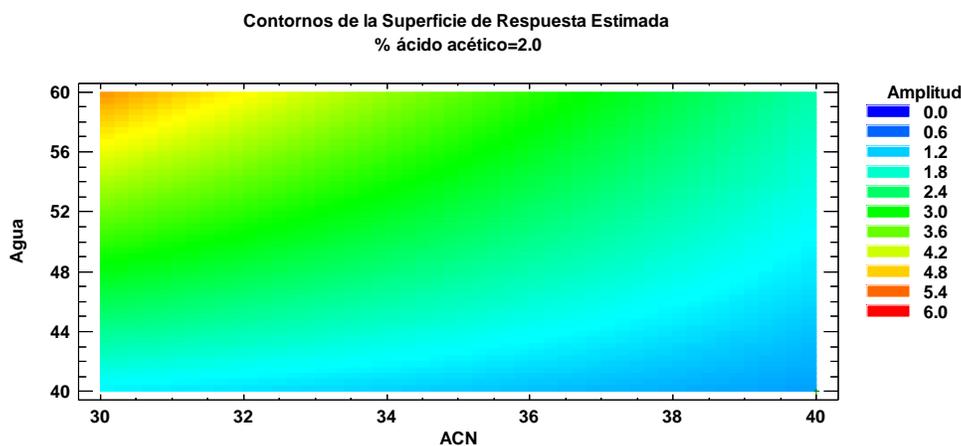


Figura 18. Gráfica de contornos de superficie del diseño factorial 2.

En resumen, las condiciones cromatográficas óptimas para obtener una amplitud del pico de 0.582 son: 40 % de agua de, 40 % de ACN y 3.0 % v/v de ácido acético. Cabe mencionar que las condiciones encontradas con este segundo diseño coinciden con las condiciones óptimas de trabajo encontradas con el diseño factorial 1. Así, la fase móvil utilizada para el desarrollo del método constituye una mezcla terciaria de MeOH: ACN: agua ácida en una proporción 20:40:40 (con 3.0% de ácido acético).

Una vez encontrada la mezcla de disolventes óptima se evaluó la adecuabilidad del sistema. Los resultados obtenidos permitieron establecer que factor de capacidad k' no cumplía con el criterio de aceptación ($k' > 2$) ya que se obtenían valores de 1.4. Por lo tanto, se realizaron ajustes a la fase móvil eliminándose el metanol e incrementando la proporción de agua. Las condiciones óptimas para cumplir con la adecuabilidad del sistema cromatográfico son: 60 % de agua, 40% de ACN y 3% v/v de ácido acético.

Finalmente, se realizó un tercer diseño de experimentos factorial con el objetivo de establecer la influencia del valor de pH en la amplitud del pico. Antes de realizar el diseño se utilizaron diferentes soluciones para ajustar el pH de la solución 3.0 % v/v de ácido acético a 2.45. Los resultados se resumen en la Tabla 18 y los cromatogramas generados se ilustran en el Anexo (Tabla 44).

En la Tabla 18 se observa que el menor tiempo de retención se obtuvo cuando se utilizó únicamente TFA para ajustar el pH. Considerando que cuando se utiliza NaOH 1 M la diferencia en el tiempo de retención de la curcumina es de 2.1 minutos, se decidió trabajar con dicha solución para disminuir el riesgo y los costos.

Tabla 18. Soluciones empleadas para el ajuste de pH a 2.45 de una disolución de ácido acético al 3% v/v.

Soluciones empleadas para el ajuste de pH a 2.45	Tiempo de retención (min)	Amplitud	Resolución	Coleo
NaOH 1 M	13.624	1.116	3.938	1.129
TEA (R.A) + H ₃ PO ₄ (R.A)	20.844	2.284	6.592	1.221
TEA (R.A)+ TFA (R.A)	12.658	1.000	4.981	1.186
TFA (R.A)	11.574	0.991	4.764	1.289

5.1.2.3. Diseño factorial 3

En la Tabla 19 se resume la aleatorización del diseño y los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de análisis del diseño factorial 3. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación que describe el modelo factorial:

$$Amplitud = 12.9454 - 2.44813 \cdot pH - 0.284478 \cdot ACN - 0.427375 \cdot Flujo + 0.0725625 \cdot pH \cdot ACN - 1.2225 \cdot pH \cdot Flujo + 0.054825 \cdot ACN \cdot Flujo.$$

En la Tabla 20 se sintetiza el análisis de varianza del modelo para el diseño factorial 3. Este análisis permitió calcular un valor P menor a 0.05 para los factores ACN y flujo y su interacción.

En la Figura 19 se ilustran los efectos estimados para cada factor en orden decreciente de importancia. Así, el ACN, el flujo y su interacción tienen un efecto estadísticamente significativo en la amplitud del pico ya que rebasan la línea vertical ilustrada en la gráfica. Por lo tanto, el valor de pH no presenta influencia significativa sobre la respuesta evaluada.

Finalmente, en la Figura 20, se ilustran los principales efectos que presentan los factores analizados. En la misma Figura se observa que entre mayor sea la pendiente de la recta para cada factor, mayor es la influencia sobre la respuesta evaluada. Con base en los resultados obtenidos es posible concluir, con el 95% de confianza, que los factores ACN, flujo y su interacción afectan significativamente la amplitud del pico.

Tabla 19. Aleatorización y resultados del diseño factorial 3.

pH	ACN	Flujo (mL/min)	Amplitud	pH	ACN	Flujo (mL/min)	Amplitud
2.55	60	1	0.408	2.55	60	1	0.409
2.35	40	1.5	1.083	2.35	40	1.5	1.008
2.55	40	1	1.586	2.55	40	1	1.305
2.35	60	1	0.425	2.35	60	1	0.408
2.35	60	1.5	0.266	2.35	60	1.5	0.267
2.35	40	1	1.434	2.35	40	1	1.475
2.55	60	1.5	0.242	2.55	60	1.5	0.609
2.55	40	1.5	0.708	2.55	40	1.5	0.542

Tabla 20. Análisis de varianza para el modelo del diseño factorial 3.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	0.0193906	1	0.0193906	0.75	0.4119
B:ACN	2.33097	1	2.33097	90.07	0.0000
C:Flujo	0.464102	1	0.464102	17.93	0.0029
AB	0.0842451	1	0.0842451	3.26	0.1088
AC	0.0149451	1	0.0149451	0.58	0.4691
BC	0.300578	1	0.300578	11.62	0.0092
bloques	0.00104006	1	0.00104006	0.04	0.8461
Error total	0.207027	8	0.0258784		
Total (corr.)	3.42229	15			

Diagrama de Pareto Estandarizada para Amplitud

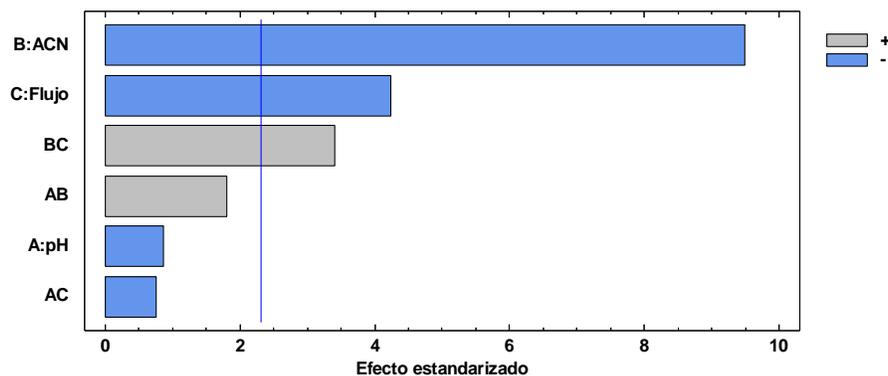


Figura 19. Diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño factorial 3.

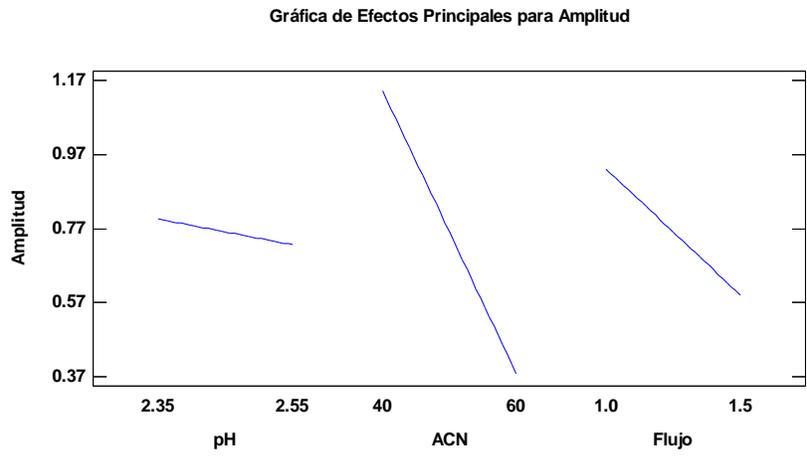


Figura 20. Gráfica de efectos principales del diseño factorial 3.

En la Figura 21 se muestra la gráfica de malla de superficie para la amplitud del pico; el análisis de dicha gráfica permite estimar que la respuesta será óptima cuando se utilice una proporción de 56-60% de ACN; un flujo de 1.2 a 1.5 mL/min y un valor de pH de 2.35 a 2.55.

Debido a que el valor de pH en la fase móvil no presenta influencia significativa en la respuesta evaluada se fijó a su nivel medio (valor de 2.45) en la gráfica de contornos de superficie (Figura 22). El análisis de esta gráfica permitió establecer que el valor de amplitud del pico es menor cuando se emplea 60 % de ACN y un flujo de 1.5 mL/min.

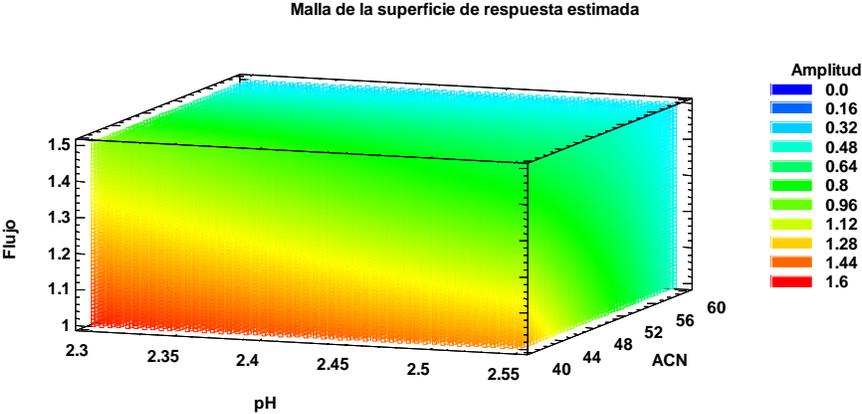


Figura 21. Gráfica de malla de superficie estimada del diseño factorial 3.

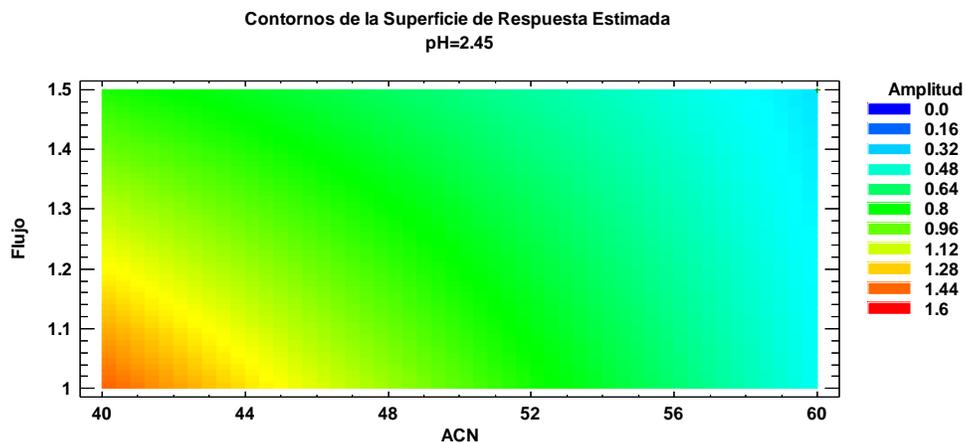


Figura 22. Gráfica de contornos de superficie del diseño factorial 3.

En conclusión, los diseños de experimentos realizados establecen que las condiciones óptimas de trabajo para obtener una **amplitud del pico de 0.339** son: **ACN: agua acidificada a pH de 2.35 [60:40] con un flujo de 1.5 mL/min**. Sin embargo, cuando se evaluó la aptitud del sistema cromatográfico la resolución (R) y factor de capacidad (k') no cumplieron con los límites establecidos en la guía de validación.

En diversos textos analíticos se menciona que el uso del ensayo y el error no es recomendable, en su lugar, se deben diseñar los experimentos para tener de una manera ordenada y concluyente el efecto de cada uno de los factores. En este caso particular el diseño de experimentos nos permitió elucidar el efecto que tiene cada factor y su interacción sobre la respuesta analítica pero la optimización de dichos factores no cumplen con los criterios establecidos en las guías para validar los métodos analíticos. Finalmente, la experimentación por ensayo y error permitió llegar a las siguientes condiciones de análisis: **ACN: agua acidificada a pH de 2.45 [50:50] con un flujo de 1.3 mL/min** (Tablas 21 y 22; Figuras 23, 33 y 34 del Anexo).

Tabla 21. Comparación de parámetros de aptitud del sistema cromatográfico en diferentes condiciones de trabajo.

Condición de trabajo	Réplica	TR (min).	Amplitud del pico.	N	T	R	k'
ACN:agua acidificada a pH de 2.55 [40:60] con flujo de 1.0 mL/min	1	18.087	1.586	6075	1.136	6.141	2.420
	2	17.253	1.305	7556	1.106	6.395	2.262
	3	16.151	1.316	6627	1.162	5.862	2.187
ACN:agua acidificada a pH de 2.45 [50:50] con flujo de 1.3 mL/min.	1	5.384	0.534	3634	1.131	3.196	2.248
	2	5.517	0.517	3692	1.167	3.254	2.270
	3	5.449	0.550	3743	1.150	3.162	2.251
ACN:agua acidificada a pH de 2.35 [60:40] con flujo de 1.5 mL/min.	1	2.968	0.266	2932	0.011	1.767	0.658
	2	2.651	0.267	2257	0.010	1.462	0.631
	3	2.573	0.300	2141	0.010	1.363	0.609
Criterios de aceptación				N>2000	T< 2	R>2	k'>2

Tabla 22. Condiciones cromatográficas establecidas para el método analítico.

Fase móvil	Solución A: Acetonitrilo Solución B: Ácido acético acuoso 3.0 %v/v a pH 2.45 Proporciones [A]:[B] : (50:50)
Temperatura	25 °C
Flujo	1.3 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda	360 nm
Columna	Symmetry Shield RP8 Waters, 5 µm, 250 x 4.6 mm

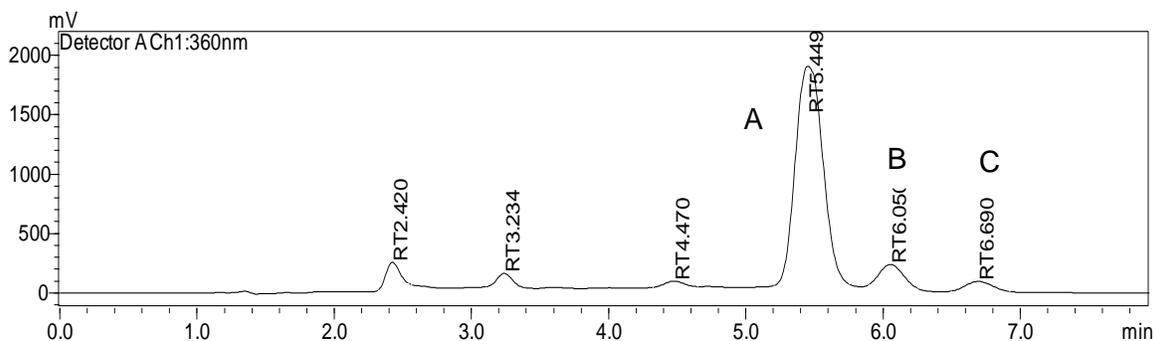


Figura 23. Cromatograma del estándar de curcuminoides [60 µg/mL].

Se muestran los curcuminoides presentes:

A) Curcumina, tiempo de retención: 5.449 min.

B) Desmetoxicurcumina, tiempo de retención: 6.050 min.

C) Bisdesmetoxicurcumina, tiempo de retención: 6.690 min.

5.2. Validación del método analítico para cuantificar curcuminoides por HPLC

Considerando que el método analítico desarrollado tiene como objetivo la cuantificación de los principales curcuminoides presentes en *C. longa* y la identificación de productos de degradación (indicativo de estabilidad) los parámetros de desempeño que se evaluaron para el sistema cromatográfico fueron: adecuabilidad, precisión y linealidad.

Enseguida, se evaluaron los parámetros que conformaron la validación del método: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), especificidad, límite de cuantificación y de detección.

5.2.1. Evaluación del sistema

Si bien, este parámetro de calidad no es un requisito en las guías de validación de métodos analíticos (ICH-Q2; USP 37, 2014), en este trabajo, se evaluó con la finalidad de establecer la confiabilidad del sistema cromatográfico antes de procesar las muestras durante el uso rutinario del método (ICH-Q2; USP 37, 2014).

La adecuabilidad del sistema es parte integral de los métodos cromatográficos ya que permite verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son adecuadas para el análisis que se realizará. Asimismo, se establece que el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras a analizar, constituyen un sistema analítico adecuado para su ejecución (ICH-Q2; USP 37, 2014).

5.2.1.1. Adecuabilidad del sistema

Este parámetro se determinó mediante el análisis, por quintuplicado, de una solución estándar a una concentración de 61.2 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos (Tablas 23 y 24) permitieron estimar que la resolución entre las señales es mayor a 2.0; el factor de coeleo menor a 2.0; el factor de capacidad mayor a 2; el número de platos teóricos mayor a 2000 y el coeficiente de variación entre las réplicas es menor a 2.0%. Por lo tanto, el sistema es adecuado para la ejecución de los análisis.

Tabla 23. Adecuabilidad del sistema.

ÁREA BAJO LA CURVA				
Inyección	CUR	DMC	BDMC	∑ Áreas
1	1706157	114299	51170	1871626
2	1717082	115676	51933	1884691
3	1730425	117304	51853	1899582
4	1744453	116558	52933	1913944
5	1755595	115157	52555	1923307
PROM	1730742	115799	52089	1898630
DE	19979.87	1174.56	680.82	21023.15
CV (%)	1.2	1.0	1.3	1.1
Criterio de aceptación: CV ≤ 2.0 %				

Tabla 24. Parámetros registrados en la evaluación de la adecuabilidad del sistema.

Pico	Inyección	R	T	k'	N
CUR	1	3.356	1.147	2.219	3807.039
	2	3.503	1.169	2.175	3779.447
	3	3.161	1.157	2.178	3848.795
	4	3.520	1.162	2.181	3724.079
	5	3.199	1.156	2.190	3789.264
DES	1	2.823	1.406	2.629	4109.513
	2	2.763	1.237	2.768	4365.136
	3	2.743	1.248	2.732	4300.163
	4	2.635	1.191	2.593	4284.439
	5	2.746	1.110	2.783	4201.187
BIS	1	2.562	1.235	2.631	5610.162
	2	2.919	1.132	2.676	5621.614
	3	2.791	1.247	2.688	5631.088
	4	2.936	1.195	2.606	5579.471
	5	2.691	1.427	2.669	5507.790
CRITERIO DE ACEPTACIÓN		R > 2	T < 2	k' > 2	N > 2000

5.2.1.2. Precisión del sistema

La precisión del sistema se evaluó a través del coeficiente de variación obtenido de la respuesta analítica de seis soluciones. Este parámetro representa la variabilidad inherente asociada con la respuesta analítica que puede originarse por el analista, el equipo y los instrumentos de medición, entre otros (USP 37, 2014). En la Tabla 25 se observa que el coeficiente de variación obtenido es menor al 2.0%; por lo tanto, el sistema es preciso.

Tabla 25. Precisión del sistema para la cuantificación de curcuminoides.

ÁREA BAJO LA CURVA				
Solución	CUR	DMC	BDMC	Σ Áreas
1	1702128	114528	51927	1868583
2	1715942	114637	52541	1883120
3	1718173	114786	52590	1885549
4	1723022	115569	53521	1892112
5	1731102	116658	54301	1902061
6	1740354	114590	53032	1907976
PROMEDIO	1721787	115128	52985	1889900
DE	13166.09	841.77	835.93	14133.92
CV (%)	0.8	0.7	1.6	0.8
Criterio de aceptación: CV ≤ 2.0 %				

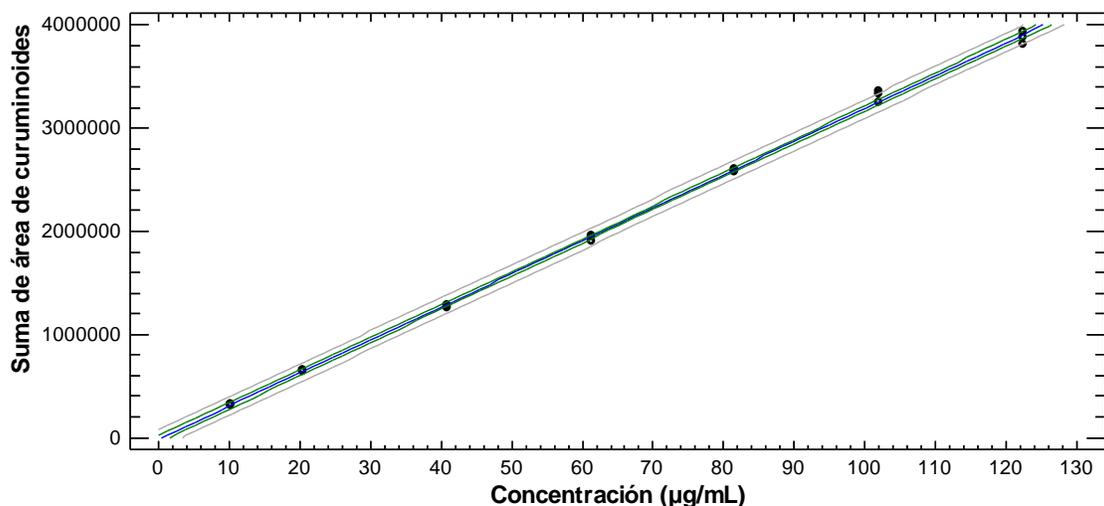
5.2.1.3. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó mediante el análisis de tres curvas de calibración con siete niveles de concentración. El ajuste de la respuesta obtenida, en función de la concentración, se llevó a cabo por medio de una regresión lineal simple mediante el uso del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. El comportamiento observado al relacionar la concentración con la respuesta obtenida, se ilustra en la Figura 24.

Los resultados obtenidos permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

$$SUMA DE \text{ \textit{ÁREA DE CURCUMINOIDES}} = -16556.6 + 32071.8 * \text{ \textit{CONCENTRACIÓN}}$$

Como se deduce del análisis estadístico el valor del coeficiente de correlación sugiere una relación lineal fuerte entre el área y la concentración. El coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 99.9 % de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por el modelo. Finalmente, en las Tablas 26 y 27 se resumen los intervalos de confianza al 95 % de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente. Para el caso de la ordenada al origen el intervalo de confianza del coeficiente de regresión incluye el cero y su valor, mientras que, para la pendiente, incluye el valor del coeficiente y no el cero.



$$\text{Suma de área de curuminoides} = -16556.6 + 32071.8 * \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})$$

Figura 24. Linealidad del sistema.

Tabla 26. Parámetros de linealidad del sistema.

ECUACIÓN Suma de área de curuminoides = -16556.6 + 32071.8 * Concentración		
PARÁMETRO		ESPECIFICACIÓN
Ordenada al origen (β_0)	-16556.6	$\beta_0 = \{0\}$
Pendiente de la recta (β_1)	32071.8	$\beta_1 \neq 0$
Coefficiente de correlación (r)	0.9995	$r \geq 0.999$
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9990	$r^2 > 0.98$

Tabla 27. Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y pendiente.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
β_0	-16556.6	16969.07	-52073.2814	18960.068
β_1	32071.83	230.3883	31589.6238	32554.0405

Por otra parte, el análisis de varianza para este modelo, permitió calcular un valor P menor a 0.05 (Tabla 28, Modelo: valor-P = 0.0), corroborando, con ello, que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área de los picos cromatográficos y la concentración.

Tabla 28. Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3.23799E13	1	3.23799E13	19378.79	0.0000
Residuo	3.1747E10	19	1.6709E9		
Carencia de Ajuste	1.53139E10	5	3.06277E9	2.61	0.0420
Error Puro	1.64331E10	14	1.1738E9		
Total (Corr.)	3.24117E13	20			

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones establecido (10.2 a 122.4 µg/mL).

5.2.2. Validación del método analítico

La validación del método se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos analíticos emitida por la ICH y en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP, Edición 42).

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados.

5.2.2.1. Precisión del método

La precisión del método se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. En la Tabla 29 se observa que el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2.0%.

En la Tabla 30 se resumen los resultados obtenidos para la precisión intermedia. En todos los casos el coeficiente de variación es menor al 2.0 %, por lo que, la variación obtenida por cada analista y entre los analistas se encuentra dentro del límite establecido.

Con base en los resultados obtenidos se demuestra que el método analítico desarrollado es preciso para cuantificar curcuminoides.

Tabla 29. Repetibilidad del método.

Área				
Solución	CUR	DMC	BDMC	ΣÁreas
1	1794797	115889	58330	1969016
2	1802954	115782	59356	1978092
3	1805775	116330	58345	1980450
4	1806612	115475	59671	1981758
5	1818173	117889	58282	1994344
6	1840354	116549	59345	2016248
PROM	1811444	116319	58888	1986651
DE	16035.935	860.642	634.730	16624.128
C.V (%)	0.9	0.7	1.1	0.8
Criterio de aceptación: CV < 2.0 %				

Tabla 30. Precisión intermedia del método.

ÁREAS					
DÍA	CUR	DMC	BDMC	ΣÁreas	
Analista A	1	1794772	117014	59578	1971364
		1827547	115838	58596	2001981
		1831102	116343	59679	2007124
	2	1840176	117616	59747	2017539
		1845740	116549	61204	2023493
		1851992	116475	61368	2029835
PROMEDIO	1831888	116639	60029	2008556	
D.E	20306.6	609.8	1061.4	20905.2	
CV	1.1	0.5	1.8	1.0	
Analista B	1	1829942	117505	60150	2007597
		1829619	117439	59965	2007023
		1830022	116914	59801	2006737
	2	1833782	116981	59671	2010434
		1835076	116851	59845	2011772
		1836071	116902	59982	2012955
PROMEDIO	1832419	117099	59902	2009420	
D.E	2897.4	292.9	166.5	2658.0	
CV	0.2	0.3	0.3	0.1	
MEDIA TOTAL	1832153.4	116868.9	59965.5	2008987.8	
D.E TOTAL	13832.2	515.4	727.3	14214.9	
CV TOTAL	0.8	0.4	1.2	0.7	
Criterio de aceptación: CV < 2.0					

5.2.2.2. Linealidad y exactitud del método

El intervalo de concentraciones (19.7 a 111.5 µg/mL) en el que se evaluó la linealidad se estableció con base en la concentración máxima evaluada y la concentración mínima cuantificable en el equipo cromatográfico de manera exacta y precisa. Los resultados obtenidos indican que la respuesta obtenida es directamente proporcional a su concentración. En la Figura 25 se ilustra la gráfica obtenida para este parámetro de calidad. En las Tablas 31 y 32 se resumen los valores estimados del intercepto y de la pendiente, así como los intervalos de confianza obtenidos para cada uno.

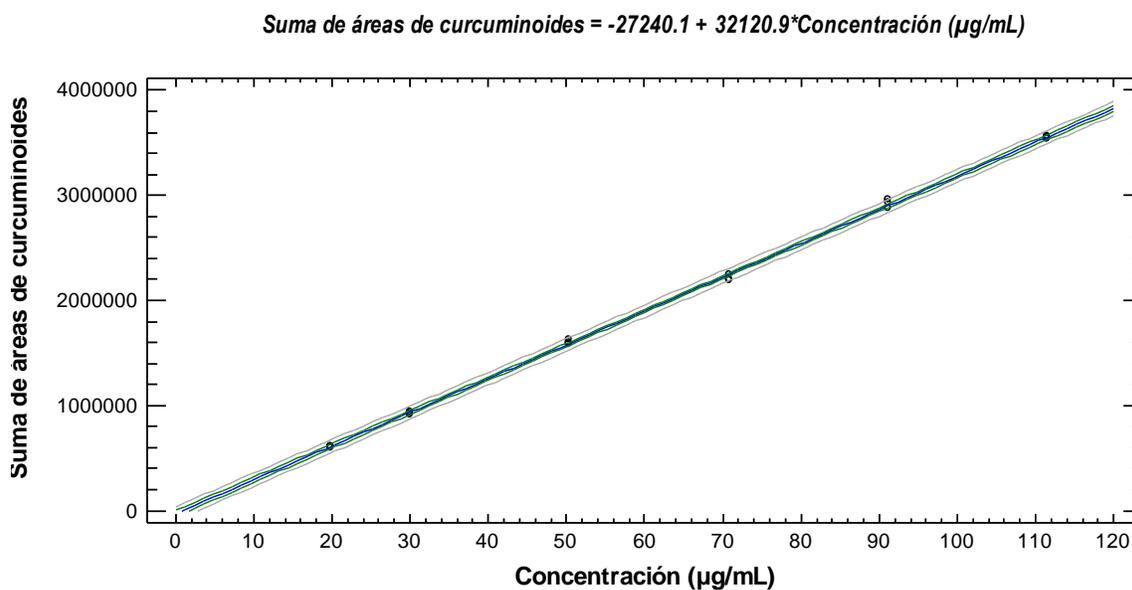


Figura 25. Linealidad del método.

Los datos obtenidos para la linealidad, permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

$$\Sigma \text{ ÁREA DE CURCUMINOIDES} = -27240.1 + 32120.9 * \text{CONCENTRACIÓN}$$

El análisis de los datos mediante una regresión lineal permitió estimar un coeficiente de correlación mayor a 0.999 para los curcuminoides, indicando una relación fuerte entre las variables. Asimismo, el análisis de varianza del modelo (Tabla 33), permitió calcular un valor P menor a 0.05 corroborando, con ello, que existe una relación lineal estadísticamente

significativa entre el área y la concentración. Finalmente, el coeficiente de determinación resultante del análisis estadístico indica que más del 99.9% de la variabilidad obtenida en la respuesta está explicada por el modelo de linealidad ajustado. Por lo tanto, el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende.

Tabla 31. Parámetros de linealidad del método.

ECUACIÓN Suma de área de curcuminoides = -27240.1 + 32120.9 * Concentración		
PARÁMETRO		ESPECIFICACIÓN
Ordenada al origen (β_0)	-27240.1	$\beta_0 \neq 0$
Pendiente de la recta (β_1)	32120.9	$\beta_1 \neq 0$
Coefficiente de correlación (r)	0.9997	$r \geq 0.999$
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9993	$r^2 > 0.98$

Tabla 32. Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y pendiente.

	Coeficientes	Error típico	Inferior 95%	Superior 95%
β_0	-27240.05506	14051.55374	-57028.01829	2547.90817
β_1	32120.93939	200.1722024	31696.59327	32545.2855

Tabla 33. Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.77898E13	1	1.77898E13	24285.06	0.0000
Residuo	1.17207E10	16	7.32541E8		
Carencia de Ajuste	6.32282E9	4	1.58071E9	3.51	0.0404
Error Puro	5.39784E9	12	4.4982E8		
Total (Corr.)	1.78015E13	17			

La exactitud de un método analítico debe determinarse en todas las metodologías de carácter cuantitativo (FEUM, 2019) debido a que se relaciona con el concepto de sesgo en las mediciones al establecer la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra (ICH Q2, 2005).

Esta característica de calidad se determinó por medio del cálculo de la diferencia entre el valor nominal de las concentraciones evaluadas y las recuperadas (Tabla 34). Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos (98.0% a 102.0%), por lo que, el método es exacto en el intervalo de concentraciones establecidas.

Tabla 34. Linealidad del método para determinar la exactitud.

Concentración adicionada (µg/mL)	∑ Área curcuminoides	Concentración recuperada (µg/mL)	% Recobro	$\bar{X}\%$ Recobro	DE	CV (%)
19.7	612231	19.9	100.9			
19.7	603666	19.6	99.5	100.2	0.68	0.7
19.7	607151	19.8	100.1			
29.9	934632	29.9	100.0			
29.9	921022	29.5	98.6	99.9	1.17	1.2
29.9	943325	30.2	100.9			
50.3	1582341	50.1	99.6			
50.3	1595630	50.5	100.4	100.7	1.31	1.3
50.3	1623727	51.4	102.1			
70.7	2190766	69.1	97.6			
70.7	2253810	71.0	100.4	98.7	1.47	1.5
70.7	2203447	69.4	98.2			
91.1	2877950	90.4	99.2			
91.1	2960811	93.0	102.1	100.8	1.4	1.4
91.1	2933220	92.2	101.1			
111.5	3550174	111.4	99.9			
111.5	3564324	111.8	100.3	99.8	0.44	0.4
111.5	3532525	110.8	99.4			
Especificación				% Recobro: 98.0-102.0 % CV: ≤ 2.0%		

5.2.2.3. Límites de cuantificación y detección

Los límites de cuantificación y detección son una característica del desempeño analítico que determina la capacidad cuantitativa del método a concentraciones bajas del analito en la muestra (FEUM, 2019). Estos límites se definieron empleando el método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración. La concentración mínima a la cual fue posible cuantificar los curcuminoides de manera reproducible y exacta fue de 18.6 µg/mL y la concentración mínima para detectar la señal de los analitos fue de 6.1 µg/mL.

5.2.2.4. Especificidad del método

La especificidad del método se evaluó mediante la generación de los productos de degradación obtenidos mediante reacciones de oxidación e hidrólisis (básica y ácida) con soluciones del estándar de curcuminoides y con el producto prueba. En las Tablas 35 y 36 se resumen los resultados obtenidos. De acuerdo con los porcentajes de degradación estimados (Tablas 37 y 38) es posible concluir que todas las reacciones presentan un porcentaje mayor al 50.0%, siendo la más significativa la reacción de oxidación (más del 75%).

En este sentido, Nimiya, 2016 y Zhu, 2017 sugieren que el mecanismo más crítico en la degradación de la curcumina es el mecanismo de radicales fenólicos (oxidación) en lugar, del mecanismo de los iones hidroxilo (hidrólisis básica). Con base en los resultados obtenidos existe una armonía entre los resultados obtenidos con lo reportado en la literatura (oxidación> hidrólisis básica>hidrólisis ácida).

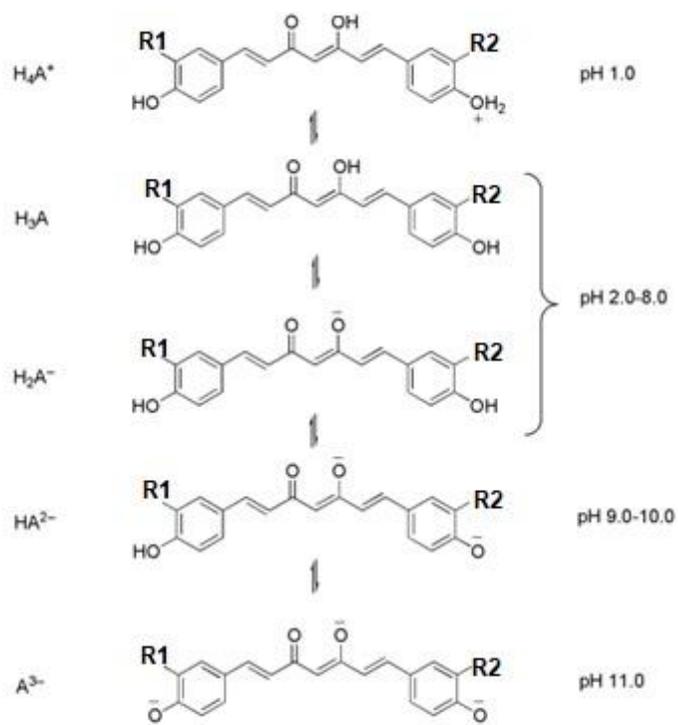
En un rango de pH de 2.0 a 8.0 existe una estabilidad causada por el equilibrio entre la estructura del dieno conjugado y el hidroxilo fenólico desprotonado (Figura 26); a pH mayores o menores de este rango los curcuminoides pierden su estabilidad debido a que en ambos medios la cetona y los hidroxilos se hidrolizan (Tomren, 2007).

Los curcuminoides son inestables a pH > 8.0 debido a que su estructura de dieno conjugado se hidroliza al ser desprotonado el OH fenólico. Además de la hidrólisis en medio básico, la curcumina, también puede degradarse mediante un proceso de auto oxidación de acuerdo con lo descubierto por Griesser, 2011. Este hallazgo explica porque una hidrólisis básica presenta mayor porcentaje de degradación que una hidrólisis en medio ácido.

Por otra parte, los aldehídos y las cetonas pueden formar productos de condensación en solución alcalina, por lo tanto, los curcuminoides después de una hidrólisis básica presentan mayor número de picos en el cromatograma (Figuras 27 y 28). Es importante mencionar que en todos los casos se observa que la respuesta generada por los productos de degradación y los aditivos no interfieren con la respuesta atribuida a los curcuminoides.

El criterio de aceptación para este parámetro establece que la respuesta debe corresponder únicamente al analito de interés, es decir, los productos de degradación no deben interferir con el tiempo de retención ni con el pico de curcumina. (USP 37, 2014).

Con base en estos hallazgos se deduce que el método es específico para cuantificar curcuminoides en diferentes suplementos alimenticios.



R1	R2	Curcuminoide:
OMe	OMe	Curcumina
H	OMe	Desmetoxicurcumina
H	H	Bidesmetoxicurcumina

Figura 26. Equilibrio ácido-base de los curcuminoides.

Tabla 35. Resultados obtenidos durante la degradación forzada del estándar de curcuminoides.

Condición experimental	CUR	DMC	BDMC	Σ Áreas	\bar{x}	DE	CV (%)
Sin tratamiento	1918092	117193	60128	2095413	2075923	27563.73	1.3
	1879619	116819	59994	2056432			
Hidrólisis ácida	790170	48195	24733	863098	855668	10508.31	1.2
	775194	48259	24784	848237			
Hidrólisis básica	720457	44066	37276	801799	796704	7205.42	0.9
	710252	44089	37268	791609			
Oxidación	454028	28499	14633	497160	501387	5977.88	1.2
	462477	28511	14626	505614			

Tabla 36. Resultados obtenidos durante la degradación forzada del producto prueba.

Condición experimental	CUR	DMC	BDMC	Σ Áreas	\bar{x}	DE	CV (%)
Sin tratamiento	277383	8958	6979	293320	293406	120.92	0.1
	277612	8911	6968	293491			
Hidrólisis básica	92749	3010	2423	98182	99124	1331.48	1.3
	94604	3023	2438	100065			
Hidrólisis ácida	102968	3315	2590	108873	108722	213.55	0.2
	102687	3306	2578	108571			
Oxidación	62042	2010	1569	65621	66197	813.88	1.2
	63173	2022	1577	66772			

Tabla 37. Porcentaje de degradación del estándar de curcuminoides.

Tratamiento	Área total curcuminoides	% Degradación	\bar{x}	DE	CV (%)
Hidrólisis ácida	863098	58.4	58.8	0.51	0.9
	848237	59.1			
Hidrólisis básica	801799	61.4	61.6	0.35	0.6
	791609	61.9			
Oxidación	454028	76.1	75.8	0.29	0.4
	462477	75.6			

Tabla 38. Porcentaje de degradación del producto prueba.

Tratamiento	Área total curcuminoides	% Degradación	\bar{x}	DE	CV (%)
Hidrólisis básica	98182	66.5	66.2	0.45	0.7
	100065	65.9			
Hidrólisis ácida	108873	62.9	62.9	0.07	0.1
	108571	63.0			
Oxidación	65621	77.6	77.4	0.28	0.4
	66772	77.2			

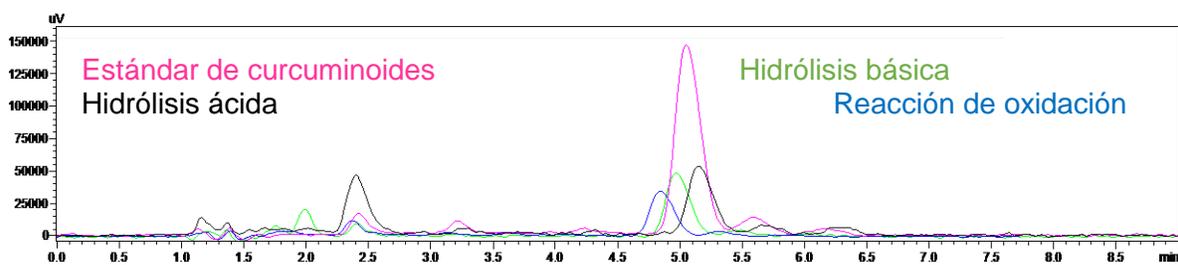


Figura 27. Comparación de cromatogramas obtenidos con el estándar de curcuminoides a una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ y la degradación forzada

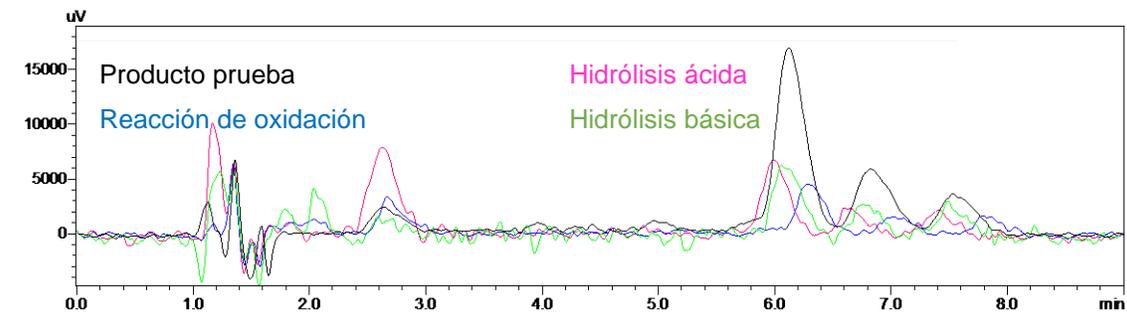


Figura 28. Comparación de cromatogramas obtenidos con el producto prueba a una concentración de 306 µg/mL y la degradación forzada.

5.2.2.5. Robustez del método

La robustez del método analítico se evaluó a través de un diseño factorial 2³. Los factores que se modificaron fueron el pH de la fase móvil, el flujo y la proporción de componentes en la fase móvil. El efecto de cada factor se evaluó sobre la amplitud y la resolución del pico principal en la matriz de trabajo. La respuesta obtenida se analizó empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

Los resultados obtenidos para evaluar la amplitud del pico, en las diferentes condiciones de análisis, se describen en la sección 5.1.2.3. *Diseño factorial 3*.

Los resultados generados para evaluar el efecto de los factores en la resolución de los picos se resumen en la Tabla 39. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación que describe el modelo factorial:

$$\text{Resolución} = 0.917156 + 7.62687 \cdot \text{pH} - 0.0318469 \cdot \text{ACN} + 0.229875 \cdot \text{Flujo} - 0.0968125 \cdot \text{pH} \cdot \text{ACN} - 2.3375 \cdot \text{pH} \cdot \text{Flujo} + 0.069325 \cdot \text{ACN} \cdot \text{Flujo}$$

El análisis de varianza del modelo (Tabla 40) permitió calcular un valor P estimado menor a 0.05 indicando que la diferencia entre los valores es estadísticamente significativa. Ninguna interacción de los factores, ni el pH, presentan influencia significativa sobre la respuesta evaluada.

En la Figura 29 el diagrama de Pareto muestra los efectos estimados para cada factor en orden decreciente de importancia, se observa que el porcentaje de ACN y el flujo tienen un efecto estadísticamente significativo en la amplitud del pico.

Finalmente, en la Figura 30 se ilustran los principales efectos que presentan los factores analizados; se observa que entre mayor sea la pendiente de la recta para cada factor, mayor es la influencia sobre la respuesta evaluada. Con base en los resultados descritos es posible concluir, con el 95% de confianza, que los factores ACN y flujo afectan significativamente la resolución del pico.

Tabla 39. Aleatorización y resultados para evaluar la resolución.

pH	ACN	Flujo (mL/min)	Resolución	pH	ACN	Flujo (mL/min)	Resolución
2.55	60	1	2.102	2.55	60	1	2.023
2.35	40	1.5	3.940	2.35	40	1.5	5.539
2.55	40	1	6.141	2.55	40	1	6.395
2.35	60	1	2.369	2.35	60	1	1.999
2.35	60	1.5	1.767	2.35	60	1.5	1.462
2.35	40	1	5.972	2.35	40	1	5.962
2.55	60	1.5	1.285	2.55	60	1.5	1.304
2.55	40	1.5	5.044	2.55	40	1.5	4.499

Tabla 40. Análisis de varianza para resolución.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	0.00294306	1	0.00294306	0.02	0.9052
B:ACN	53.2207	1	53.2207	273.12	0.0000
C:Flujo	4.12395	1	4.12395	21.16	0.0018
AB	0.149963	1	0.149963	0.77	0.4059
AC	0.0546391	1	0.0546391	0.28	0.6108
BC	0.480596	1	0.480596	2.47	0.1550
bloques	0.0198106	1	0.0198106	0.10	0.7580
Error total	1.55892	8	0.194865		
Total (corr.)	59.6115	15			

Diagrama de Pareto Estandarizada para Resolución

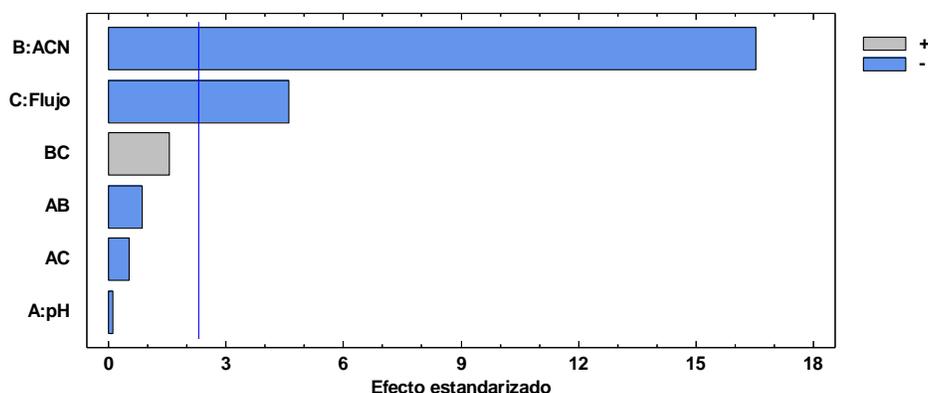


Figura 29. Diagrama de Pareto de los factores evaluados para la resolución.

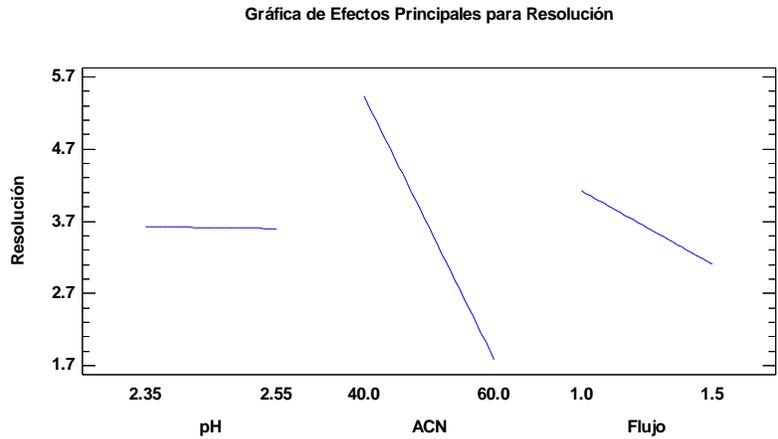


Figura 30. Gráfica de efectos principales para la resolución.

En la Figura 31 se muestra la gráfica de malla de superficie de la respuesta analizada. Con base en esta gráfica es posible estimar las condiciones necesarias para que dicha respuesta sea óptima: ACN 40-52, flujo de 1.0 a 1.5 mL/min y pH de 2.35 a 2.55.

Considerando que el valor de pH de la fase móvil presenta una influencia nula sobre la respuesta evaluada en la gráfica de contornos de superficie (Figura 32) este factor se fijó a su nivel medio (valor de 2.45). De esta manera fue posible establecer que las condiciones para lograr la mejor resolución del pico son: ACN de 40 a 54 y flujo de 1.0 a 1.3 mL/min.

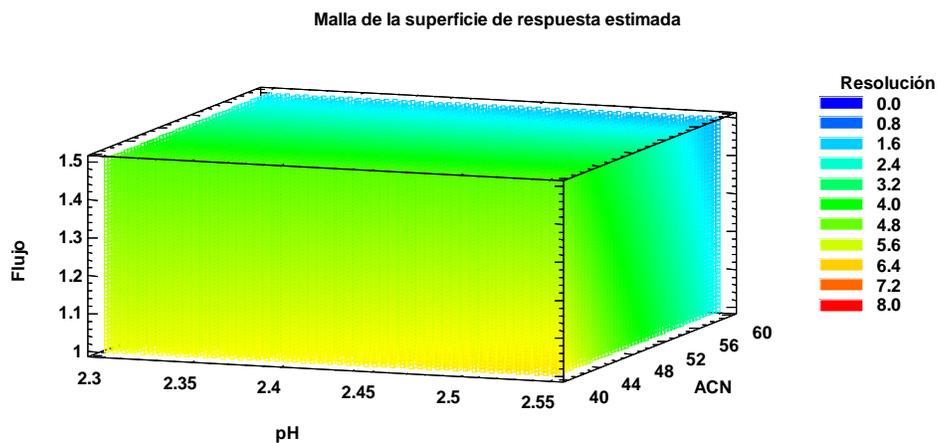


Figura 31. Gráfica de malla de superficie de la respuesta estimada para la resolución.

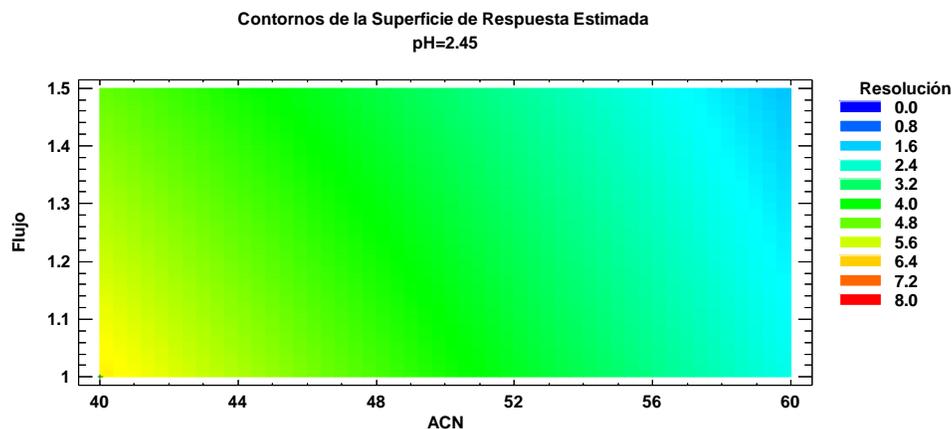


Figura 32. Gráfica de contornos de superficie de la respuesta estimada fijando el pH a 2.45 para la resolución.

De acuerdo con el modelo establecido las condiciones óptimas de trabajo para obtener una máxima **resolución del pico (6.259)** son: fase móvil **ACN: agua acidificada a pH de 2.55 [40:60] con flujo de 1.0 mL/min.**

La robustez es la capacidad de un método analítico para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método (FEUM, 2014). Con base en los efectos evaluados sobre la amplitud y resolución del pico, el método analítico desarrollado es robusto en el intervalo de pH pero no puede modificarse el flujo y la proporción de ACN en la fase móvil.

5.3. Cuantificación de curcuminoides en suplementos alimenticios por HPLC

Una vez validada la metodología analítica se analizaron dos muestras (cápsulas y polvo). Los resultados obtenidos (Tablas 41 y 42) indicaron que ambas muestras contienen el porcentaje de curcuminoides dentro del rango reportado por Nelson y colaboradores en 2017 (CUR: 60–70%, DMC: 20–27%, BDMC: 10–15%).

Por otra parte, la especificación descrita en la monografía USP para *C. longa* define que las cápsulas y el polvo derivado de este recurso natural contienen no menos de 90.0% y no más de 110.0% de la cantidad declarada de curcuminoides. En la Tabla 42, se muestra que las cápsulas analizadas contienen 100.9% de curcuminoides totales y cumplen con la

especificación indicada. En contraste, el polvo solo contiene 5.4% de curcuminoides totales (Tabla 41): porcentaje menor que la especificación farmacopeica. Este hallazgo es relevante ya que el uso destinado para este polvo es como especia y no es requisito oficial cumplir con los criterios farmacéuticos.

Tabla 41. Resultados de cuantificación por HPLC de curcuminoides en polvo.

Muestra	ΣÁREAS	Concentración (µg/mL)	%CUR	%DMC	%BDMC	µg curcuminoides / mg muestra	% curcuminoides totales
1	1584668	50.2	61.4	22.4	14.8	6.7	5.4
2	1591652	50.4	61.2	22.6	14.3	6.7	5.4
3	1615193	51.1	61.2	22.4	14.5	6.8	5.5
X	1597171.00	50.57	61.3	22.4	14.6	6.7	5.4
DE	15993.39	0.5	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1
CV (%)	1.0	1.0	0.1	0.5	1.8	1.0	1.0

Tabla 42. Resultados de cuantificación por HPLC de curcuminoides en cápsulas.

Muestra	ΣÁREAS	Concentración (µg/mL)	% CUR	% DMC	% BDMC	µg curcuminoides /mg muestra	% curcuminoides totales
1	2578092	81.11	61.79	22.99	15.23	10.54	98.74
2	2643156	83.14	62.39	22.37	15.23	10.80	101.22
3	2649802	83.34	62.29	22.61	15.10	10.82	101.47
4	2335303	73.55	62.42	22.55	15.03	10.51	98.37
5	2389683	75.24	62.62	22.32	15.06	10.75	100.66
6	2397142	75.48	62.43	22.65	14.92	10.78	100.97
7	2181440	68.76	61.70	23.28	15.01	10.91	102.09
8	2173246	68.51	62.13	23.25	14.62	10.87	101.66
9	2201343	69.38	62.83	22.55	14.62	11.01	103.03
		X	62.3	22.7	15.0	10.8	100.9
		DE	0.4	0.4	0.2	0.2	1.5
		CV (%)	0.6	1.6	1.5	1.5	1.5

6. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para identificar y cuantificar a los curcuminoides en dos diferentes insumos. El método cumple con los criterios emitidos en la guía de validación para métodos analíticos ICH Q2.

El método analítico propuesto es sencillo, exacto, preciso y rentable y puede considerarse para su publicación en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).

Se identificó la presencia de *Curcuma longa* L. en el suplemento alimenticio analizado. El contenido estimado de curcuminoides en las cápsulas fue de 100.9% y de 5.4% en el polvo. Estos resultados permiten concluir que las cápsulas cumplen con las especificaciones reportadas en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP).

Finalmente, el método analítico permitió identificar la presencia de los curcuminoides en el polvo destinado para su uso como especia.

7. PERSPECTIVAS

Evaluar la estabilidad de la muestra, con el fin de establecer el tiempo de vida de anaquel de insumos que contengan *C. longa* L.

Aplicar la metodología desarrollada y validada para analizar productos farmacéuticos comerciales, con diferente formulación. Esta actividad permitirá demostrar que los excipientes no interfieren con la cuantificación de los curcuminoides.

8. ANEXO

Tabla 43. Evaluación de diferentes sistemas cromatográficos

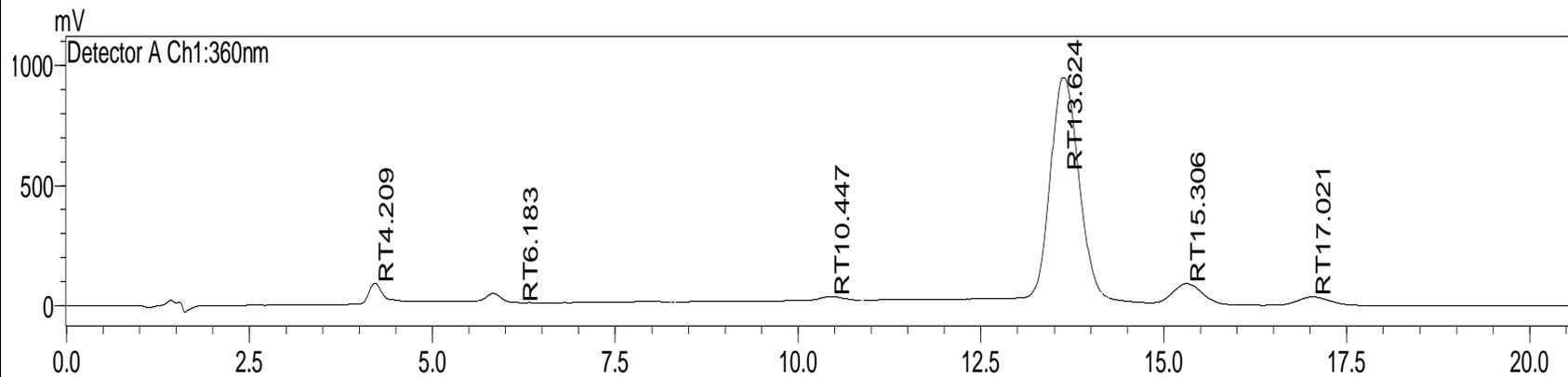
Sistema cromatográfico.		Cromatograma.
Fase estacionaria (F.E)	Fase móvil (F.M)	
Columna Symmetry Shield RP8 marca Waters (C-8)	MeOH: ACN: Ác. Acético 2% v/v [15:35:50]	<p>Detector A Ch1:360nm</p>
Columna Purospher STAR marca MERCK (C-18)	MeOH: ACN: Ác. Acético 2%v/v [15:35:50]	<p>Detector A Ch1:360nm</p>
Columna Symmetry Shield RP8 marca Waters (C-8)	MeOH: ACN: Ác. Acético 2% v/v [15:40:45]	<p>Detector A Ch1:360nm</p>

Continuación Tabla 43. Evaluación de diferentes sistemas cromatográficos

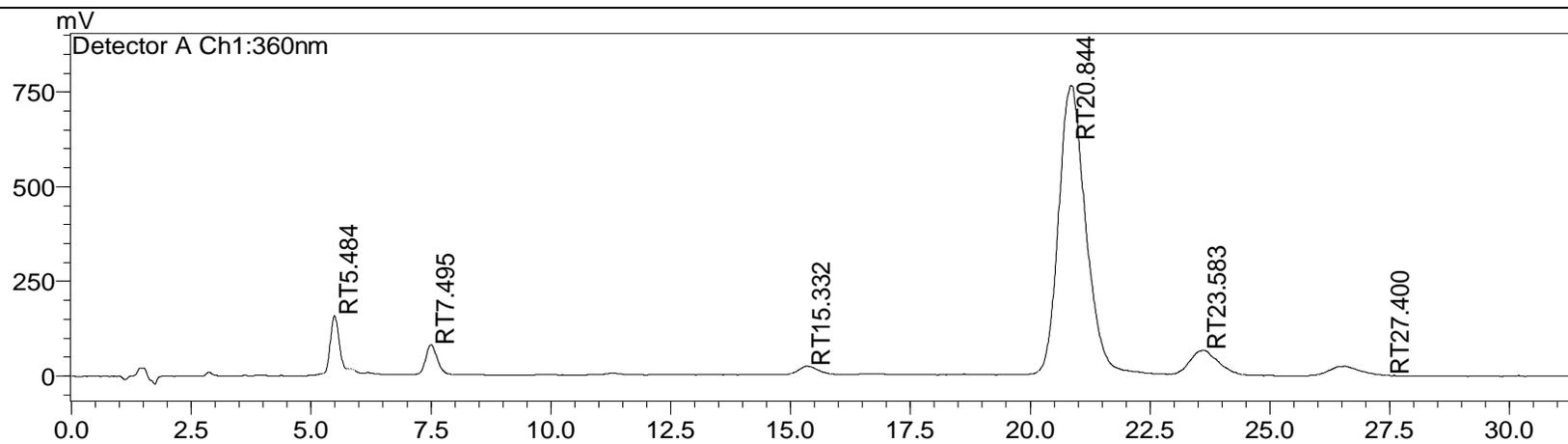
Sistema cromatográfico.		Cromatograma.
Fase estacionaria (F.E)	Fase móvil (F.M)	
Columna Purospher STAR marca MERCK (C-18)	MeOH: ACN: Ác. Acético 2% v/v [15:40:45]	
Columna Symmetry Shield RP8 marca Waters (C-8)	MeOH: ACN: Ác. Acético 2%v/v [15:45:40]	
Columna Purospher STAR marca MERCK (C-18)	MeOH: ACN: Ác. Acético 2%v/v [15:45:40]	

Tabla 44. Soluciones empleadas para el ajuste de pH a 2.45 de una disolución de ácido acético al 3% v/v.

Cromatograma.

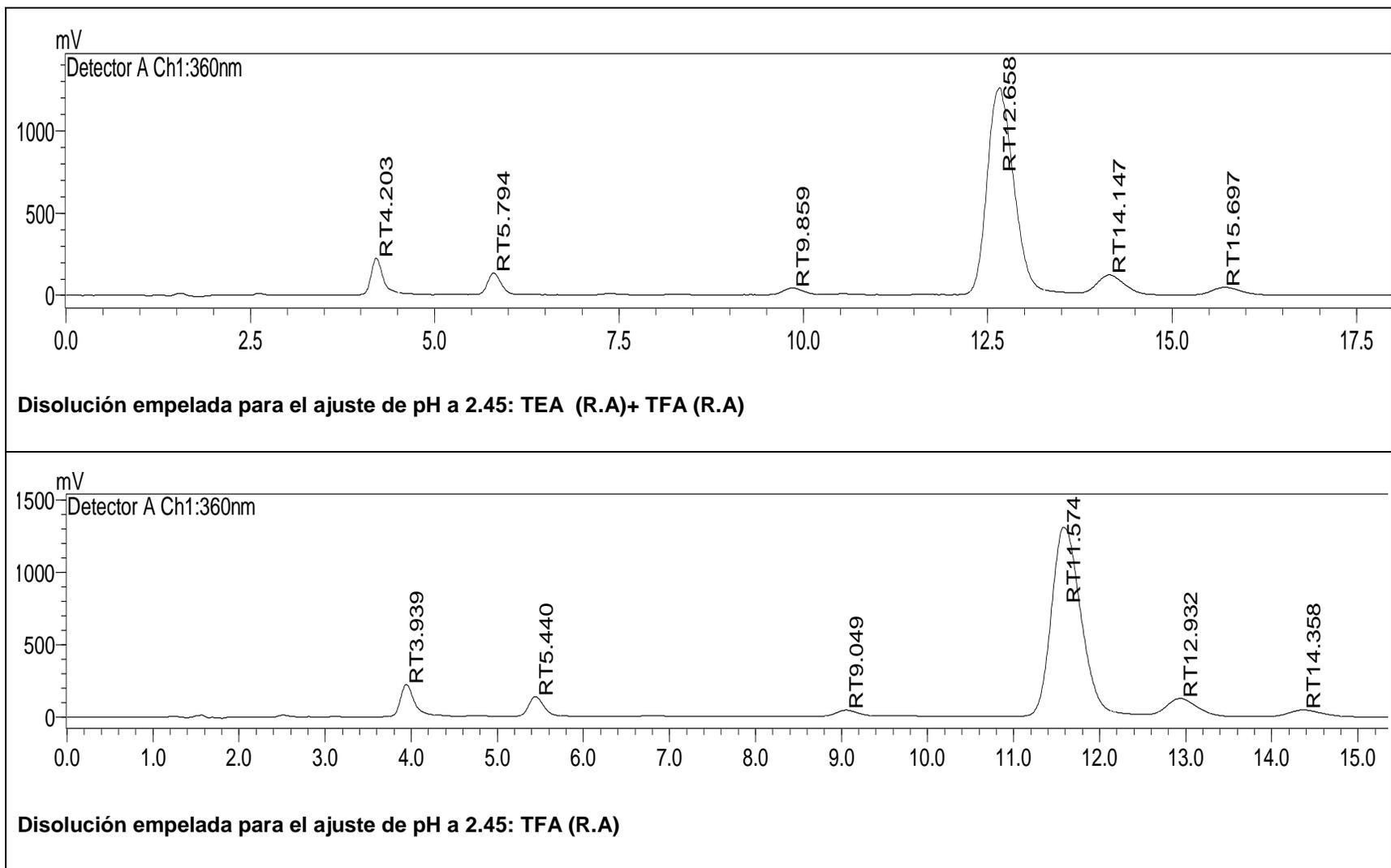


Disolución empleada para el ajuste de pH a 2.45: NaOH 1 M



Disolución empleada para el ajuste de pH a 2.45: TEA (R.A) + H₃PO₄ (R.A)

Continuación Tabla 44. Soluciones empleadas para el ajuste de pH a 2.45 de una disolución de ácido acético al 3% v/v.



Diseño factorial 3. Comparación de cromatogramas

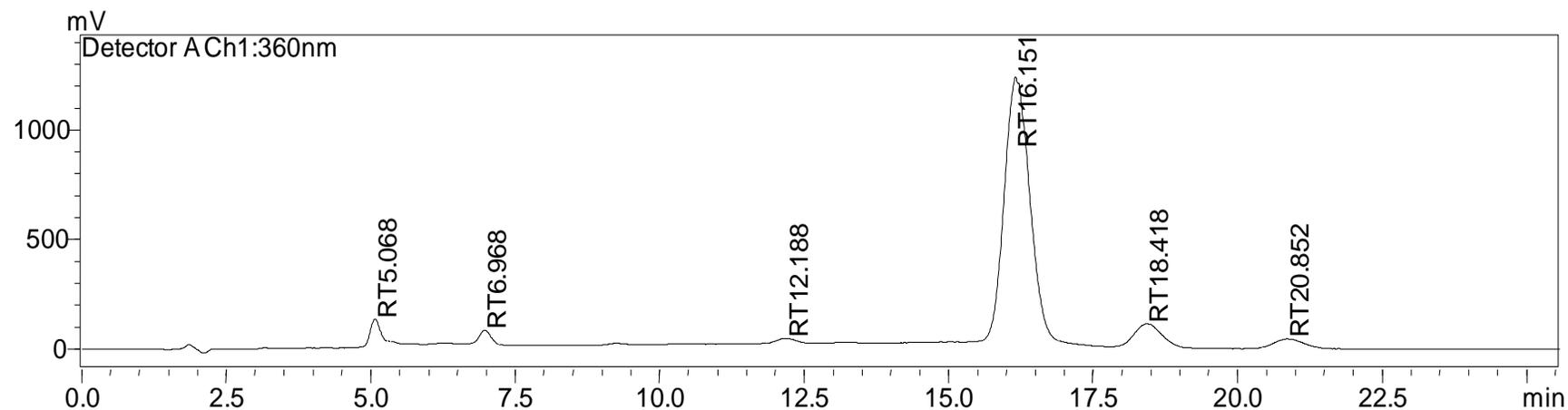


Figura 33. Cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico de ACN: agua acidificada a pH de 2.55 [40:60] con flujo de 1.0 mL/min

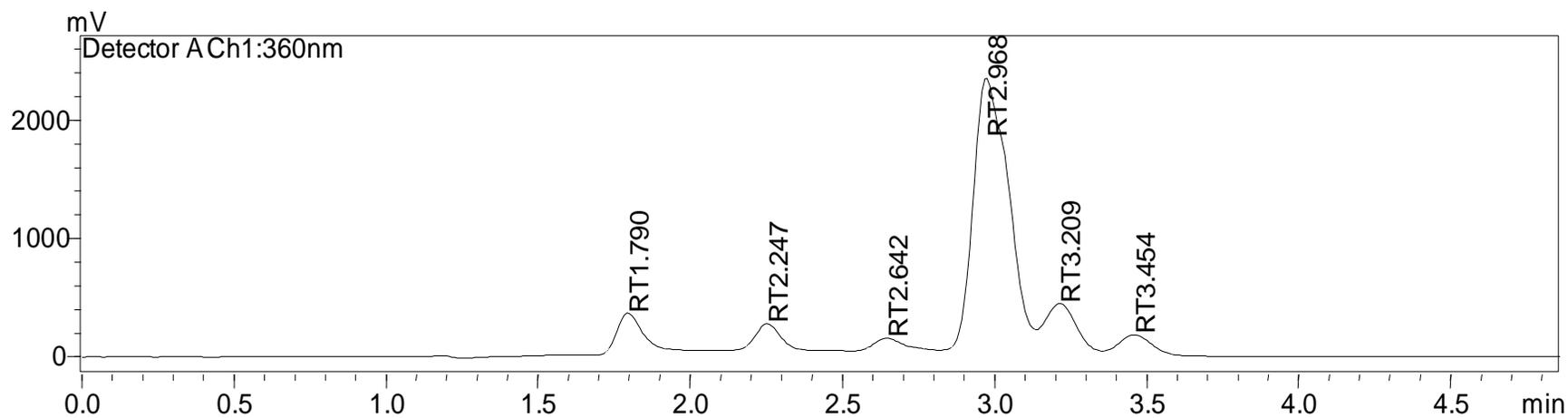


Figura 34. Cromatograma obtenido con el sistema cromatográfico de ACN: agua acidificada a pH de 2.35 [60:40] con flujo de 1.5 mL/min

9. REFERENCIAS

- Amanolahi, F., Mohammadi, A., Kazemi Oskuee, R., Nassirli, H., & Malaekheh-Nikouei, B. (2017). A simple, sensitive and rapid isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography method for determination and stability study of curcumin in pharmaceutical samples. *Avicenna journal of phytomedicine*, 7(5), 444–453.
- Ang, L. F., Yam, M. F., Fung, Y. T., Kiang, P. K., & Darwin, Y. (2014). HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional chinese medicines. *Journal of pharmacopuncture*, 17(4), 36–49.
- Ayati, Z., Ramezani, M., Amiri, M. S., Moghadam, A. T., Rahimi, H., Abdollahzade, A., Sahebkar, A., & Emami, S. A. (2019). Ethnobotany, Phytochemistry and Traditional Uses of *Curcuma* spp. and Pharmacological Profile of Two Important Species (*C. longa* and *C. zedoaria*): A Review. *Current pharmaceutical design*, 25(8), 871–935.
- Burapan, S., Kim, M., & Han, J. (2017). Curcuminoid Demethylation as an Alternative Metabolism by Human Intestinal Microbiota. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(16), 3305–3310.
- Caballero-Casero, N., Ocak, M., Ocak, Ü., & Rubio, S. (2014). Quick supramolecular solvent-based microextraction for quantification of low curcuminoid content in food. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(8), 2179–2187.
- Chao, I. C., Wang, C. M., Li, S. P., Lin, L. G., Ye, W. C., & Zhang, Q. W. (2018). Simultaneous Quantification of Three Curcuminoids and Three Volatile Components of *Curcuma longa* Using Pressurized Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1568.
- Cheng J., Weijun K., Yun L., Jiabo W., Haitao W., Qingmiao L., Xiaohe X. (2010) Development and validation of UPLC method for quality control of *Curcuma longa* Linn: Fast simultaneous quantitation of three curcuminoids. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 53:43–49.
- Cheng, D., Li, W., Wang, L., Lin, T., Poiani, G., Wassef, A., Hudlikar, R., Ondar, P., Brunetti, L., & Kong, A. N. (2019). Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and PKPD

Modeling of Curcumin in Regulating Antioxidant and Epigenetic Gene Expression in Healthy Human Volunteers. *Molecular pharmaceutics*, 16(5), 1881–1889.

Dall'Acqua, S., Stocchero, M., Boschiero, I., Schiavon, M., Golob, S., Uddin, J., Voinovich, D., Mammi, S., & Schievano, E. (2016). New findings on the in vivo antioxidant activity of Curcuma longa extract by an integrated (1)H NMR and HPLC-MS metabolomic approach. *Fitoterapia*, 109, 125–131.

Dei Cas, M., & Ghidoni, R. (2019). Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. *Nutrients*, 11(9), 2147.

González-Albadalejo, J., Sanz Dionisia, Claramunt Rosa M., Lavandera José Luis, Alkorta Ibon y Elguero José. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *An. Real Acad. Farm.*, 81(4), 278-310.

Griesser, M., et al. (2011). Autoxidative and cyclooxygenase-2 catalyzed transformation of the dietary chemopreventive agent curcumin. *Journal of Biological Chemistry*. 286(2), 1114-1124.

International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [ICH]. (2005). *Guideline Q2 (R1) Validation of analytical procedures*. Recuperado el 30 de abril de 2020, de <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.

Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2002). Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3668–3672.

Kotha, R. R., & Luthria, D. L. (2019). Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16), 2930.

Kunati, S. R., Yang, S., William, B. M., & Xu, Y. (2018). An LC-MS/MS method for simultaneous determination of curcumin, curcumin glucuronide and curcumin sulfate in a phase II clinical trial. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 156, 189–198.

Lao, C. D., Ruffin, M. T., 4th, Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., & Brenner, D. E. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 10.

Ley General de Salud. (1984). Recuperado el 10 de agosto de 2020, de http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/142_240120.pdf

Macías-Pérez, J. R., Aldaba-Muruato, L. R., Martínez-Hernández, S. L., Muñoz-Ortega, M. H., Pulido-Ortega, J., & Ventura-Juárez, J. (2019). Curcumin Provides Hepatoprotection against Amoebic Liver Abscess Induced by *Entamoeba histolytica* in Hamster: Involvement of Nrf2/HO-1 and NF- κ B/IL-1 β Signaling Pathways. *Journal of immunology research*, 74,316-352.

Mahale, J., Howells, L. M., Singh, R., Britton, R. G., Cai, H., & Brown, K. (2018). An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of curcumin and its metabolites in plasma and lung tissue: Potential for preclinical applications. *Biomedical chromatography: BMC*, 42, 80-90.

Market Research (2020). Herbal Supplements and Remedies. *Global Industry Analysts*. Recuperado el 25 de agosto de 2020, de <https://www.marketresearch.com/Global-Industry-Analysts-v1039/Herbal-Supplements-Remedies-13492990/>

Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed research international*, 18,68-74.

Muhammad, I., Wang, X., Li, S., Li, R., & Zhang, X. (2018). Curcumin confers hepatoprotection against AFB₁-induced toxicity via activating autophagy and ameliorating inflammation involving Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Molecular biology reports*, 45(6), 1775–1785.

Muschiatti, L., Redko, F., & Ulloa, J. (2020). Adulterants in selected dietary supplements and their detection methods. *Drug testing and analysis*, 12(7), 861–886.

Nair, K. (2019). *Turmeric (Curcuma longa L.) and ginger (Zingiber officinale Rosc.) - world's invaluable medicinal spices*. Switzerland: Springer Nature Switzerland.1st ed., pp. 195-216

Nasr, M., & Abdel Rahman, M. H. (2019). Simultaneous Determination of Curcumin and Resveratrol in Lipidic Nanoemulsion Formulation and Rat Plasma Using HPLC: Optimization and Application to Real Samples. *Journal of AOAC International*, 102(4), 1095–1101.

National Center for Biotechnology Information (2020). *PubChem Compound Summary for CID 969516, Curcumin*. Consultado el 7 Agosto de 2020, en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>.

National Center for Biotechnology Information (2020). *PubChem Compound Summary for CID 5469424, Demethoxycurcumin*. Consultado el 7 de Agosto de 2020, en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Demethoxycurcumin>.

National Center for Biotechnology Information (2020). *PubChem Compound Summary for CID 5315472, Bisdemethoxycurcumin*. Consultado el 7 de Agosto de 2020, en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisdemethoxycurcumin>

Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of medicinal chemistry*, 60(5), 1620–1637.

Nimiya, Y., Wang, W., Du, Z., Sukamtoh, E., Zhu, J., Decker, E., & Zhang, G. (2016). Redox modulation of curcumin stability: Redox active antioxidants increase chemical stability of curcumin. *Molecular nutrition & food research*, 60(3), 487–494.

Nutrition Business Journal. (2020). Supplement Business Report. *New Hope Network*. Recuperado el 25 de agosto de 2020, de <https://store.newhope.com/collections/reports/products/2020-supplement-business-report>

Pistelli, L., Bertoli, A., Gelli, F., Bedini, L., Ruffoni, B., & Pistelli, L. (2012). Production of Curcuminoids in different in vitro organs of *Curcuma longa*. *Natural product communications*, 7(8), 1037–1042.

Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios (1999). Recuperado el 10 de agosto de 2020, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ris.html>

Reglamento de Insumos para la Salud. (1998). Recuperado el 03 de julio de 2020, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ris.html>

Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., Marczylo, T. H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S. M., Pirmohamed, M., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(20), 6847–6854.

Silva, J., Basso, J., Sousa, J., Fortuna, A., & Vitorino, C. (2019). Development and full validation of an HPLC methodology to quantify atorvastatin and curcumin after their intranasal co-delivery to mice. *Biomedical chromatography: BMC*, 33(10), e4621.

Tan, S., Rupasinghe, T. W., Tull, D. L., Augustin, M. A., & Gras, S. L. (2015). Liquid-liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry detection of curcuminoids from bacterial culture medium. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 988, 116–120.

Tomren, M. A., Másson, M., Loftsson, T., & Tønnesen, H. H. (2007). Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. *International journal of pharmaceutics*, Oslo, Noruega, 338(1-2), 27–34.

Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 180(5), 402–404.

United States Pharmacopeia. (2014). USP 37-NF 32.

Velázquez García, Ofelia. (2016). *Cuantificación de curcuminas con actividad antiparasitaria en insumos de uso veterinario* (Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Biológica). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Vijaya Saradhi, U. V., Ling, Y., Wang, J., Chiu, M., Schwartz, E. B., Fuchs, J. R., Chan, K. K., & Liu, Z. (2010). A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantification of curcuminoids in cell medium and mouse plasma. *Journal of*

chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 878(30), 3045–3051.

Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., & Rojsitthisak, P. (2009). A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical analysis: PCA*, 20(4), 314–319.

Zhu, J., Sanidad, K. Z., Sukamtoh, E., & Zhang, G. (2017). Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin. *Food & function*, 8(3), 907–914.