



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Evaluación del efecto de la curcumina sobre la farmacocinética  
del paracetamol”**

**T E S I S**

Que presenta

**LORENA IVETTE MEDINA AYMERICH**

Para Obtener el Grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**FARMACOLOGÍA**

Director de la tesis:  
Dr. Gilberto Castañeda Hernández

**El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. Gilberto Castañeda Hernández. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio 34 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.**

## *Dedicatorias*

*A mis padres Lorena y Ariel, por su apoyo incondicional en todo momento y a lo largo del camino. Gracias por confiar siempre en mí, los amo mucho.*

*A mis hermanos Edgar y Arturo, quienes me motivan a ser mejor cada día. Recuerden que no hay límites, siempre luchan por lo que quieran, aun cuando les digan que es imposible. Siempre estaré para ustedes, los amo.*

*A mi familia, a todos gracias por su apoyo, pero principalmente a mis abuelos: mamá Esther, papá Ariel y Manón, que han sido un ejemplo de vida.*

## *Agradecimientos*

*A mí jefe el Dr. Castañeda, por ser el mejor guía y por darme la oportunidad de crecer tanto profesional como personalmente en su laboratorio, gracias por su confianza.*

*A mi comité tutorial, a la Dra. Favari, a la Dra. Lety Cruz A., y al Dr. Cerda, especialmente gracias por su tiempo, por sus observaciones y por sus sugerencias que hicieron de éste, un mejor trabajo.*

*A Lulú, muchas gracias por tu paciencia y por tu tiempo, por esos jalones de orejas que me han hecho ser mejor persona. Sin ti este trabajo no hubiera sido posible, sabes que te quiero.*

*A Rodrigo, gracias por tus aportaciones a mi trabajo, por los regaños y las buenas ideas, pero sobre todo muchas gracias por haberte convertido en un gran apoyo, eres muy importante para mí.*

*Al laboratorio 34, a Paty y a todos mis compañeros, los nuevos y los no tan nuevos. Sigamos siendo lo mejor de los mejores.*

*Suset y Alan, particularmente muchas gracias a ustedes por su apoyo incondicional durante estos 6 meses de ausencia. Sin ustedes no me podría graduar, los quiero mucho amigos.*

*Lilí gracias por tu soporte a mi trabajo, sobre todo a tus recomendaciones y sugerencias.*

*A mis compañeros y amigos de la maestría, gracias por los buenos y los malos momentos, finalmente lo logramos.*

*A CONACYT, gracias por la beca otorgada para llevar a cabo este trabajo.*

---

---

<b>Índice.....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Farmacocinética.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Procesos farmacocinéticos (ADME).....</b>	<b>5</b>
<b>I. Absorción.....</b>	<b>5</b>
<b>II. Distribución.....</b>	<b>7</b>
<b>III. Metabolismo.....</b>	<b>8</b>
<b>IV. Excreción.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2 Interacciones farmacocinéticas.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Paracetamol.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2 Farmacología.....</b>	<b>16</b>
<b>I. Farmacocinética.....</b>	<b>16</b>
<b>II. Farmacodinamia.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Curcumina.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1 Propiedades fisicoquímicas.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2 Farmacología.....</b>	<b>21</b>
<b>I. Farmacocinética.....</b>	<b>21</b>
<b>II. Farmacodinamia.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Objetivo General.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Objetivos Particulares.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Diseño experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 Desarrollo del método analítico.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 Validación del método analítico.....</b>	<b>31</b>

5.3 Estudio de interacción farmacocinética.....	31
6. Resultados.....	33
6.1 Desarrollo del método analítico.....	33
6.1.1 Selección de las condiciones cromatográficas.....	33
6.1.2 Diseño de la curva de calibración.....	34
6.1.3 Tratamiento de la muestra.....	32
6.2 Validación del método analítico.....	36
6.2.1 Selectividad.....	36
6.2.2 Linealidad.....	39
6.2.3 Límite inferior de cuantificación.....	40
6.2.4 Precisión y exactitud .....	40
6.3 Estudio de interacción farmacocinética.....	41
7. Análisis de resultados.....	44
8. Conclusiones.....	54
9. Perspectivas.....	55
10. Referencias.....	56

### Lista de figuras

Figura 1. “Interrelación de los procesos farmacocinéticos”.....	1
Figura 2. “Importancia de los niveles plasmáticos de un fármaco”.....	2
Figura 3. “Perfil farmacocinético de un fármaco tras la administración de una dosis extravascular (A) y una intravenosa (B)” .....	3
Figura 4. “Esquema comparativo entre el NCA (A) y el análisis compartamental (B)”.....	4
Figura 5. “Comparación entre el NCA y análisis con compartimentos (análisis de regresión)”.....	5

---

---

<b>Figura 6. “Procesos fisiológicos que afectan la biodisponibilidad de los fármacos”</b> .....	<b>7</b>
<b>Figura 7. “Cinética de orden cero”</b> .....	<b>12</b>
<b>Figura 8. “Cinética de eliminación de primer orden. Escala lineal (A) escala semi-logarítmica (B)”</b> .....	<b>12</b>
<b>Figura 9. “Estructura química del paracetamol”</b> .....	<b>15</b>
<b>Figura 10. “Metabolismo del paracetamol”</b> .....	<b>17</b>
<b>Figura 11. “Bi-funcionalidad de la COX y el posible mecanismo de acción del paracetamol”</b> .....	<b>19</b>
<b>Figura 12. “Estructura cetónica de la curcumina”</b> .....	<b>20</b>
<b>Figura 13. “Estructura enólica de la curcumina”</b> .....	<b>20</b>
<b>Figura 14. “Principales metabolitos de la curcumina”</b> .....	<b>22</b>
<b>Figura 15. “Blancos moleculares de la curcumina”</b> .....	<b>23</b>
<b>Figura 16. “Curvas dosis-efecto antinociceptivo de la curcumina en la prueba de formalina al 1% correspondiente a la segunda fase de la prueba”</b> .....	<b>24</b>
<b>Figura 17. “Curvas dosis-efecto antinociceptivo (%) normalizada de los AINES, la curcumina y sus combinaciones”. Cada punto representa la media <math>\pm</math> EEM de 6 ratas”</b> .....	<b>24</b>
<b>Figura 18. “Estrategia experimental seguida para el desarrollo del método analítico”</b> .....	<b>30</b>
<b>Figura 19. “Parámetros evaluados durante la validación de la metodología analítica”</b> .....	<b>30</b>
<b>Figura 20. “Diseño del estudio farmacocinético”</b> .....	<b>31</b>



<b>Figura 21. “Canulación de la arteria caudal en la cola de la rata de la cual se obtuvieron las muestras de sangre en los diferentes tiempos de muestreo”</b> .....	<b>32</b>
<b>Figura 22. “Cromatograma del paracetamol y del 2-acetamidofenol (E.I.)”</b> .....	<b>33</b>
<b>Figura 23. “Esquema del tratamiento de la muestra previo a su análisis cromatográfico”</b> .....	<b>35</b>
<b>Figura 24. “Cromatogramas representativos obtenidos tras la inyección de la fase móvil (A), la curcumina (B), el paracetamol (C) y el E.I (D) ”</b> .....	<b>37</b>
<b>Figura 25. “Espectro de absorción y cromatograma representativo de la curcumina”</b> .....	<b>37</b>
<b>Figura 26. “Cromatogramas representativos obtenidos tras la inyección de un blanco de matriz biológica (A), una solución del paracetamol y del E.I. (B), y una muestra blanca adicionada con ambos compuestos (C)”</b> .....	<b>38</b>
<b>Figura 27. “Linealidad del método en el intervalo de 2 – 32 µg / mL”</b> .....	<b>39</b>
<b>Figura 28. “Curvas de concentración plasmática-tiempo del paracetamol en ratas después de la administración de una dosis oral de paracetamol sólo o con curcumina”</b> .....	<b>41</b>
<b>Figura 29. “Valores estimados para el ABC (A), la C<sub>max</sub> (B) y el t<sub>max</sub> (C)”</b> .....	<b>42</b>
<b>Figura 30. “Mapa de polaridad de una molécula de paracetamol”</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura 31. “Empaques comúnmente utilizados en la cromatografía fase reversa”</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 32. “Precisión y exactitud”</b> .....	<b>49</b>
 <b>LISTA DE TABLAS</b>	
<b>Tabla 1. “Propiedades fisicoquímicas del paracetamol” Parte I</b> .....	<b>16</b>

<b>Tabla 2. “Propiedades fisicoquímicas de la curcumina”</b> .....	<b>21</b>
<b>Tabla 3. “Condiciones cromatográficas óptimas”</b> .....	<b>33</b>
<b>Tabla 4 “Preparación de la curva de concentraciones”</b> .....	<b>34</b>
<b>Tabla 5. “Preparación de puntos control”</b> .....	<b>35</b>
<b>Tabla 6 “Parámetros evaluados y sus criterios de aceptación”</b> .....	<b>36</b>
<b>Tabla 7. “Tiempos de retención”</b> .....	<b>39</b>
<b>Tabla 8. “Límite inferior de cuantificación”</b> .....	<b>40</b>
<b>Tabla 9. “Precisión y exactitud del método”</b> .....	<b>41</b>
<b>Tabla 10. “Parámetros de biodisponibilidad del paracetamol”</b> .....	<b>43</b>

## Resumen

La actividad terapéutica del paracetamol se ve limitada por lo que se conoce como **“techo analgésico”**, lo que significa que a partir de cierta dosis ya no se puede incrementar su efecto terapéutico, mientras que aumentan sus efectos adversos como el daño hepático y renal. Es por ello que se siguen buscando alternativas que mejoren su eficacia farmacológica y que al mismo tiempo no produzcan daño a la salud del paciente. Investigaciones recientes sugieren que la administración de paracetamol con curcumina podría mejorar la eficacia del tratamiento analgésico debido a un efecto sinérgico. Sin embargo, la coadministración de medicamentos también puede incrementar el riesgo de aparición de efectos no deseados. El objetivo del presente estudio fue evaluar el posible efecto de la curcumina sobre la biodisponibilidad del paracetamol, utilizando un modelo murino. Para ello, se desarrolló una metodología analítica por cromatografía de líquidos en alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) que permitió la cuantificación del paracetamol en plasma de rata. Además, el método se validó de acuerdo a lo descrito en la NOM177-SSA-2013. Para el estudio farmacocinético se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de entre 200 y 250 gramos ( $n=16$ ), y se dividieron en 2 grupos ( $n=8$ ). El primer grupo recibió una administración de 178mg/kg del paracetamol por vía oral, mientras que al segundo grupo se le administró una dosis oral de 30 mg/kg de curcumina 30 minutos antes del tratamiento con el paracetamol. Posteriormente se realizó un análisis farmacocinético del tipo no-compartimentar para obtener los parámetros de biodisponibilidad de cada grupo y se llevó a cabo la comparación estadística mediante la prueba de t de Student. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando el valor de “p” es menor a 0.05 ( $p<0.05$ ). En este caso no hubo diferencia significativa, por lo que los resultados obtenidos sugieren que la combinación entre el paracetamol y la curcumina es segura.

## **Abstract**

The therapeutic activity of paracetamol is limited by what is known as "analgesic ceiling", which means that after a certain amount its therapeutic effect cannot be increased, while their adverse effects do, such as liver and renal damage. Because of this, some alternatives that can improve their therapeutic efficacy and don't cause harm to the patient's health, are still investigated. Recent research suggests that administration of paracetamol with curcumin could improve the effectiveness of analgesic treatment due to a synergistic effect. However, it should be considered that co-administration of drugs can also increase the risk of unwanted effects. The aim of this study was to evaluate the possible effect of curcumin on the bioavailability of paracetamol, in a murine model. For this, an analytical methodology by High Resolution Liquid Chromatography (HPLC) was developed to allow the quantification of paracetamol in rat plasma. Furthermore, the method was validated in accordance to what is described by the NOM177-SSA-2013. For the pharmacokinetic study, male Wistar rats between 200 and 250 grams ( $n = 16$ ) were used and were divided into 2 groups ( $n = 8$ ). The first group received an oral single dose of 178mg/kg of paracetamol, while the second group received an oral dose of 30 mg/kg of curcumin 30 minutes before the treatment with paracetamol. Subsequently, a non-compartmental pharmacokinetic analysis was performed to obtain the bioavailability parameters of each group, the statistical comparison was performed using the Student's t-test. Results are considered statistically significant when the "p" value is less than 0.05 ( $p < 0.05$ ). In this case, there was not significant difference, so the results suggest that the combination between paracetamol and curcumin is safe.



# 1. Introducción

## 1.1 Farmacocinética.

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia el curso temporal de la concentración de un fármaco y sus metabolitos en el organismo. La absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación (ADME), son los mecanismos que controlan la velocidad del inicio de la acción de un agente, la intensidad de su acción y la duración de su efecto, (Brunton et al., 2011).

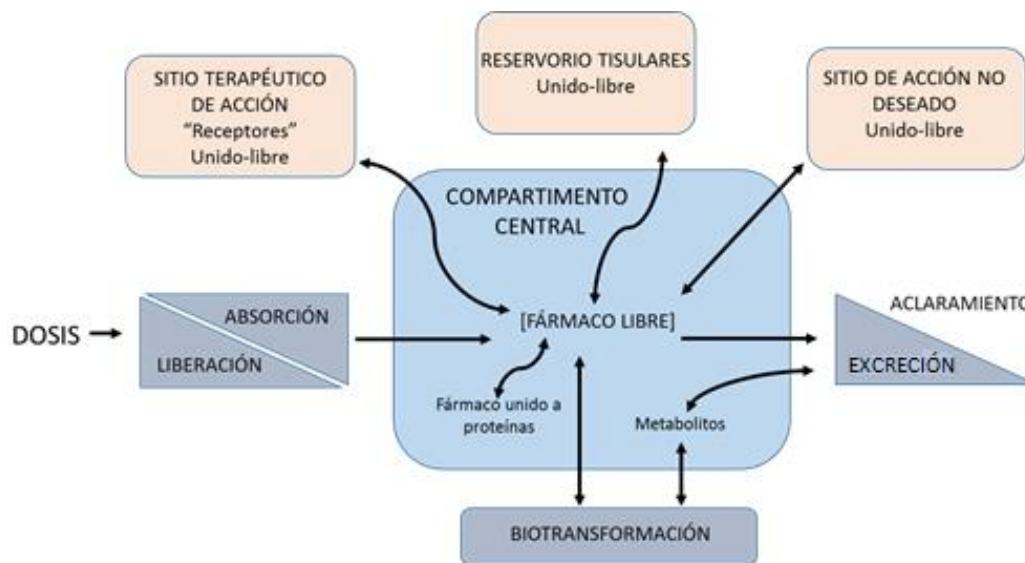


Figura 1. "Interrelación de los procesos farmacocinéticos". Adaptado de: Brunton et al., 2011

Por cuestiones éticas y prácticas, conocer la concentración del fármaco en el sitio de acción no siempre es posible, es por ello que a menudo se hace la suposición de que la concentración plasmática refleja la concentración del fármaco en dicho sitio.

La mayoría de los fármacos se administran por vía oral en forma de comprimidos. Una vez que se deglute un comprimido, el fármaco debe ser expuesto y liberarse. Para ello, la tableta debe primero desintegrarse en partículas pequeñas para permitir que el fármaco se disuelva en el fluido gastrointestinal, y así, tener la oportunidad de pasar a

través de la membrana de las células epiteliales del tracto gastrointestinal y llegar al sistema circulatorio. La velocidad y el grado de absorción del fármaco son determinantes muy importantes de sus concentraciones plasmáticas iniciales, por lo que una tasa de absorción rápida promoverá altas concentraciones en corto tiempo.

Por otro lado, una vez absorbido, el fármaco puede distribuirse en diferentes sitios, incluido el sitio de acción. Entre mayor sea la distribución en los tejidos, menor será la concentración del fármaco en el plasma.

La concentración plasmática también depende de la eliminación del fármaco, las principales vías de eliminación son el metabolismo hepático y la excreción renal (Rosenbaum, 2012).



Figura 2. “Importancia de los niveles plasmáticos de un fármaco”.

Las concentraciones plasmáticas de los fármacos están estrechamente relacionadas con la seguridad y la eficacia de los tratamientos, de tal forma que el objetivo de la farmacoterapia es alcanzar concentraciones plasmáticas efectivas, y que no produzcan toxicidad. Dichas concentraciones corresponden a aquellas que se encuentren dentro de la ventana terapéutica. En la figura 2 se puede observar la ventana terapéutica de un

fármaco, esta delimitada por la concentración mínima efectiva (CME) y la concentración máxima tolerada (CMT). También se muestran tres perfiles farmacocinéticos (A, B y C) que fueron obtenidos tras la administración de una dosis extravascular. Como se puede observar, los perfiles A y C no se encuentran dentro del rango terapéutico, por lo que ambas situaciones representan casos en los que se pueden tener implicaciones clínicas no deseadas.

Los parámetros farmacocinéticos son aquellos que permiten describir los procesos de ADME de los fármacos. La concentración máxima ( $C_{max}$ ), el tiempo requerido para alcanzar dicha concentración ( $t_{max}$ ), y el área bajo la curva (ABC), son parámetros que se pueden obtener fácilmente tras una administración extravascular (figura 3 A), mientras que el aclaramiento (Cl), y el volumen de distribución (Vd) sólo pueden estimarse de manera precisa cuando el fármaco se administra de forma intravenosa (figura 3 B) (Kalant et al., 2007).

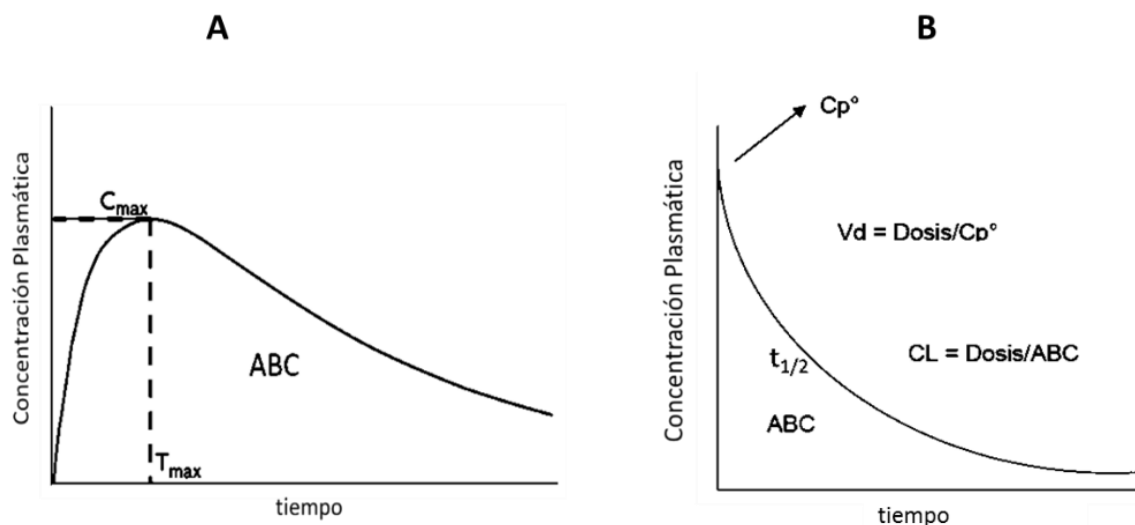


Figura 3. "Perfil farmacocinético de un fármaco tras la administración de una dosis extravascular (A) y una intravenosa (B)" Adaptado de: Shargel et al., 2007

La biodisponibilidad es la cantidad y la velocidad a la cual la dosis administrada de un fármaco es absorbida. La magnitud de la absorción se relaciona con el cálculo matemático del ABC, mientras que la velocidad de la absorción está descrita por la  $C_{max}$



y el  $t_{max}$ . Por otro lado, el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) se define como el tiempo que se requiere para que la concentración del fármaco disminuya al 50% y está ampliamente relacionado en la duración del efecto. Los parámetros de  $V_d$  y  $Cl$  se refieren, respectivamente, a la distribución del fármaco en el organismo y al volumen de sangre depurado del fármaco por unidad de tiempo (Jambhekar & Breen, 2009).

La representación de modelos matemáticos permite describir el curso temporal de los fármacos dentro del organismo. En general, dependiendo de los objetivos del estudio, así como de características del fármaco y de la cinética que presenta, se pueden realizar análisis farmacocinéticos no-compartimentares (NCA por sus siglas en inglés), o análisis con modelos compartimentares o de regresión. Ambos tipos de análisis permiten llevar a cabo la estimación de los parámetros anteriormente mencionados. La información obtenida a través de dichos análisis, resulta útil para el manejo terapéutico de los fármacos (Gabrielsson & Weiner, 2001).

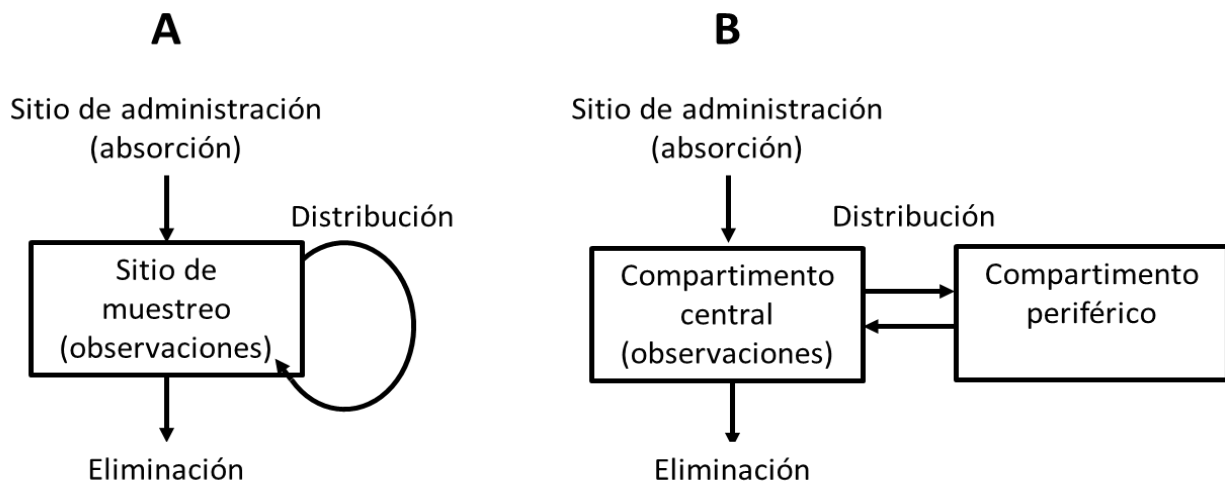


Figura 4. "Esquema comparativo entre el NCA (A) y el análisis con compartimentos (B)". Adaptado de Bulitta & Holford, 2008

La principal característica del NCA es que no se asume una estructura compartimentar específica y supone una cinética de primer orden (lineal). En las figuras 4 y 5 se muestran imágenes esquemáticas del NCA, que implica la aplicación de la regla de los trapecoides

para el cálculo del ABC del perfil concentración-tiempo, y del análisis con compartimentos, que emplea una función con parámetros de regresión (Gabrielsson & Weiner, 2012).

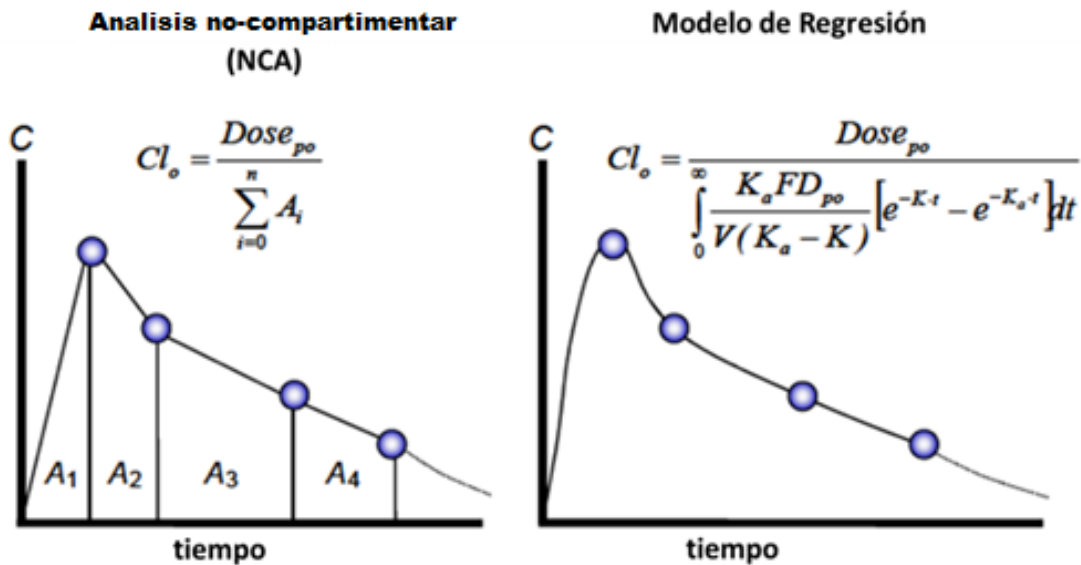


Figura 5. “Comparación entre el NCA y el análisis con compartimentos o de regresión” Adaptado de: Gabrielsson & Weiner, 2012.

El NCA es el método de análisis de datos farmacocinéticos mayormente utilizado en ciertos tipos de estudios como los de bioequivalencia, linealidad de la dosis e interacciones farmacocinéticas (Bulitta & Holford, 2008).

### 1.1.1 Procesos Farmacocinéticos (ADME)

#### I. Absorción

La absorción se define como el paso del fármaco de su sitio de administración a la circulación sistémica.

Cuando un fármaco es administrado por vía intravenosa se dice que su biodisponibilidad es del 100%. Sin embargo, cuando la vía de administración es extravascular, los fármacos deben atravesar varias barreras biológicas con el fin de llegar al torrente sanguíneo y posteriormente al sitio donde ejercerán su acción. El movimiento a través de las membranas celulares es crucial durante la absorción y está influenciado por las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la naturaleza de la membrana, la perfusión del sitio de absorción, el pH, entre otras (Avdeef, 2012).

Como se mencionó anteriormente, la vía de administración extravascular más ampliamente utilizada es la vía oral. En este caso, el medicamento alcanza el lumen gástrico donde se desintegra y el fármaco se disuelve para posteriormente ser absorbido. La absorción de casi todos los fármacos se lleva a cabo mediante procesos de difusión pasiva, por lo que los más lipofílicos y en su estado no ionizado serán absorbidos más fácilmente. El sitio principal de absorción, debido a su permeabilidad, gran superficie de contacto y flujo sanguíneo, es el intestino delgado, así, el vaciado gástrico y los mecanismos que lo regulan, son factores importantes que influyen en la absorción de los fármacos (Dressman & Reppas, 2016).

Además de lo ya mencionado, la biodisponibilidad también puede ser modificada por otros factores fisiológicos (figura 6) como por ejemplo la acción de transportadores activos como la P-glicoproteína (P-gP), y el metabolismo, tanto intestinal como hepático.

Los parámetros que permiten estudiar a la biodisponibilidad de los fármacos son el área bajo la curva de la concentración plasmática en función del tiempo (ABC), la máxima concentración plasmática ( $C_{max}$ ), así como el tiempo necesario para alcanzar esta concentración ( $t_{max}$ ) (Jambhekar & Breen, 2009).

El ABC representa la cantidad del fármaco absorbido, mantiene una relación directa con la dosis y una relación inversa con el aclaramiento (Cl). La determinación de este parámetro se puede realizar aplicando la regla de los trapezoides, lo que es equivalente a la resolución matemática de la integral de la curva que describe el comportamiento cinético del fármaco. Además, si se conoce la biodisponibilidad de un fármaco y la dosis administrada, el ABC también puede utilizarse para estimar el Cl.

La  $C_{max}$ , como su nombre lo indica, representa la concentración más alta del fármaco en la sangre o en plasma después de su administración extravascular. Este parámetro es proporcional a la fracción del fármaco absorbido.

El  $t_{max}$ , junto con la  $C_{max}$ , está estrechamente relacionado con la velocidad de absorción. Los fármacos con valores pequeños de  $t_{max}$  presentan la respuesta farmacológica en tiempos más cortos.

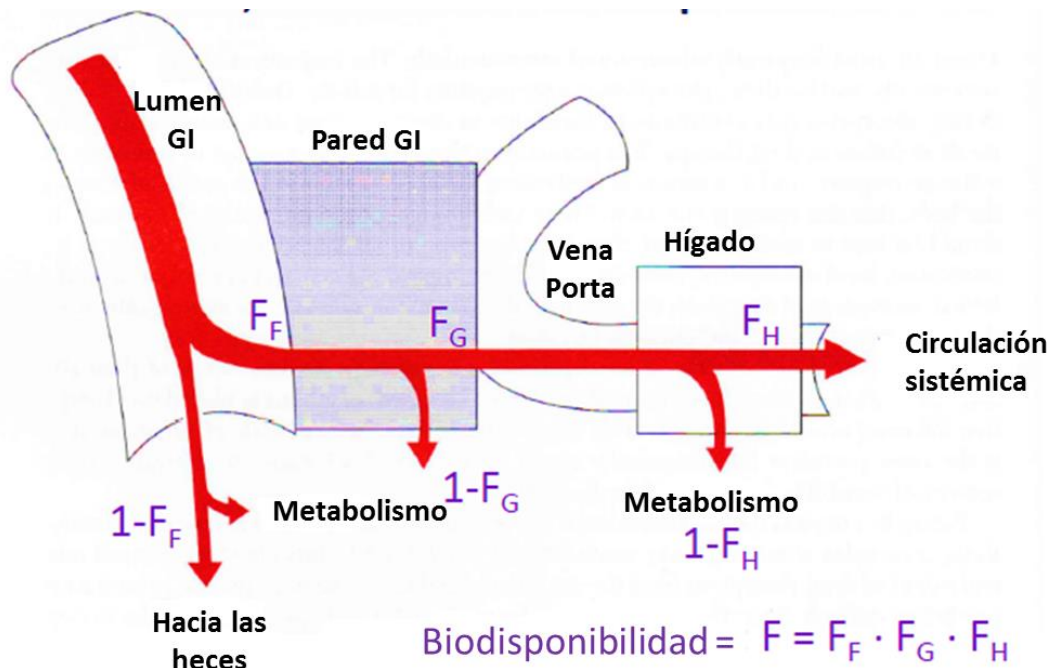


Figura 6. "Procesos fisiológicos que afectan la biodisponibilidad de los fármacos" Adaptado de: Rowland & Tozer, 2005

## II. Distribución

La distribución se refiere a la velocidad y la magnitud en que los fármacos son transportados del compartimento central a los diferentes tejidos del organismo, es un paso crucial para que el fármaco alcance su sitio de acción terapéutica (Kalant et al., 2007).

El parámetro farmacocinético que cuantifica el grado en que el fármaco se distribuye más allá del sistema circulatorio es el volumen de distribución ( $V_d$ ). El  $V_d$  es un parámetro

virtual que permite describir la relación entre la concentración plasmática y la cantidad del fármaco en el organismo. La extensión de la distribución determina la dosis que debe ser administrada para alcanzar la concentración plasmática a la que se obtiene el efecto deseado.

Es común distinguir 3 volúmenes físicos basados en algunos principios de anatomía y fisiología. El volumen vascular, en el que se encuentran confinadas moléculas grandes como proteínas y otros componentes sanguíneos y que corresponde al volumen total de sangre. El compartimento extracelular, en el que se encuentran las moléculas que pueden dejar el espacio vascular pero que no pueden cruzar las membranas fácilmente como, por ejemplo, las moléculas ionizadas. Finalmente, las moléculas que puedan cruzar fácilmente las membranas comparten el mismo volumen físico que el agua total del organismo (Holford & Yim, 2016).

Sin embargo, el Vd aparente adquiere ese nombre debido a que no corresponde necesariamente a cualquier compartimento físico, ya que el fármaco se puede unir a proteínas plasmáticas y tisulares, e incluso puede acumularse en la grasa del organismo por una mayor afinidad a los lípidos, lo que puede modificar el valor de este parámetro.

La relación que tiene el Vd con la concentración plasmática es inversa, es decir que cuando el fármaco se encuentra distribuido en los componentes tisulares o en los depósitos de grasa, la concentración en el plasma disminuye y el Vd aumenta, así cuando el fármaco NO es capaz de atravesar las barreras celulares o presenta una mayor afinidad a los componentes sanguíneos, la concentración plasmática es mayor. El Vd se puede determinar mediante la relación entre la dosis administrada y la concentración plasmática inicial (al tiempo 0), tras una administración intravenosa (Bauer, 2001).

### III. Metabolismo

Una vez que el fármaco en el plasma y los tejidos se han alcanzado el equilibrio, la disminución de la concentración plasmática está dada por la eliminación del fármaco del

organismo. La eliminación de los fármacos considera tanto al metabolismo como a la excreción de los mismos.

El metabolismo, también conocido como biotransformación, es el proceso por el cual el fármaco es modificado a compuestos más polares que se excretan con mayor facilidad (Tomlin, 2010).

Las transformaciones metabólicas son reacciones que pueden ocurrir desde la absorción de un fármaco hasta su excreción. Estas modificaciones pueden producir metabolitos activos, metabolitos inactivos, así como metabolitos con menor, mayor, o distinta actividad farmacológica.

El metabolismo generalmente ocurre en el hígado, pero ocasionalmente, el fármaco también puede ser biotransformado en otros órganos como el intestino, los pulmones, el riñón e incluso el plasma.

Los tipos de reacciones metabólicas son:

- Reacciones de Fase I: transformación del fármaco mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, que introducen en su estructura un grupo reactivo que lo hace químicamente más polar y soluble (Coleman, 2010).
- Reacciones de Fase II: suelen ser reacciones de conjugación, que por regla general inactivan al fármaco y facilitan su excreción por el incremento en su polaridad. Suelen actuar sobre el grupo reactivo introducido en la fase I (Coleman, 2010).

Las reacciones más comunes de la primera fase son las de oxidación. Este tipo de reacciones generalmente se catalizan en el sistema de oxigenasa de función mixta, cuyo sistema más importante es el Citocromo P450. Esta familia de enzimas se localiza principalmente en los microsomas hepáticos, mientras que las enzimas que catalizan las reacciones de conjugación como las glucuroniltransferasas (UGT), la N-acetiltransferasa (NAT), las sulfotransferasas (ST) y las metiltransferasas (MT) se encuentran en el citoplasma de los hepatocitos.

El aclaramiento hepático ( $Cl_H$ ) se refiere al volumen de plasma que el hígado puede depurar de una sustancia determinada por unidad de tiempo. La eficiencia del sistema hepático para metabolizar los fármacos depende de 3 principales factores: el flujo sanguíneo hepático, que participa en el transporte del fármaco al hígado, el grado de unión a proteínas, que se expresa como la fracción libre del fármaco capaz de entrar a los hepatocitos, y la actividad intrínseca del sistema enzimático que está implicado en el metabolismo hepático del fármaco (Rowland & Tozer, 2005).

La relación de la extracción hepática es la medida que permite evaluar la eficiencia de eliminación del hígado. Los valores que puede adquirir van del 0 al 1, aquéllos cercanos a 0 indican que la mayor parte del fármaco se “escapa” de la eliminación durante una sola pasada a través del órgano, mientras que valores cercanos a 1 indican que la mayor parte del fármaco se elimina.

Con base en lo anteriormente mencionado, los fármacos se pueden clasificar como de alta o baja extracción. En el primer caso, el  $Cl_H$  del fármaco va a depender del flujo sanguíneo hepático. Sin embargo, en los fármacos de baja extracción, el aclaramiento es independiente del flujo y está determinado por la capacidad metabólica intrínseca del hígado y la fracción del fármaco libre.

Las enfermedades hepáticas, la disminución del flujo sanguíneo hepático por alguna fisiopatología, así como, la administración concomitante de medicamentos, son algunos de los factores que pueden disminuir el  $Cl_H$  de los fármacos, lo que puede incrementar su exposición y el riesgo de toxicidad.

#### IV. Excreción

La excreción se define como la combinación de mecanismos por los cuales un fármaco y/o sus metabolitos son transferidos irreversiblemente del sistema circulatorio a los fluidos extracorporales, como la bilis y la orina.

Los principales órganos responsables de la excreción son los riñones (excreción renal) y el hígado (excreción biliar). Otros órganos que pueden estar involucrados en la excreción, principalmente de agentes gaseosos y volátiles, son los pulmones. Además, los fármacos también pueden ser excretados parcialmente en sudor, saliva y lágrimas.

Los fármacos que se excretan en la orina o la bilis son hidrosolubles, aquellos que son más lipofílicos no pueden ser excretados sin antes ser metabolizados a compuestos con características de mayor polaridad.

El aclaramiento (Cl) es el parámetro farmacocinético que refleja la eliminación del fármaco a través del metabolismo y la excreción. Describe la relación entre la concentración y la velocidad de eliminación de los fármacos. Cada órgano de eliminación tiene su propio aclaramiento por lo que el aclaramiento total es igual a la sumatoria de todos los aclaramientos.

El aclaramiento renal ( $Cl_R$ ) se debe principalmente a la excreción del fármaco en la orina por los riñones mediante los procesos de filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción tubular pasiva. Por lo tanto, además de la variación del flujo sanguíneo renal y la concentración de fármaco libre en plasma, cualquier factor que regule o actúe directamente sobre estos, también podrá modificar el  $Cl_R$  de los fármacos.

El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) es el parámetro farmacocinético que describe la fase de eliminación de un fármaco. Se define como el tiempo que se requiere para reducir a la mitad la concentración plasmática del fármaco. Cuando la cinética de eliminación del fármaco es de primer orden, su valor depende de la constante de eliminación ( $k_e = Cl/V_d$ ) y es independiente de la cantidad del fármaco en el organismo. El tiempo de vida media determina la duración del efecto farmacológico.

La eliminación sigue una cinética de orden cero cuando la cantidad del fármaco eliminado por unidad de tiempo es constante y es independiente de la concentración en el organismo. El perfil de concentración-tiempo durante la fase de eliminación es lineal (figura 7). Por lo general, este tipo de cinéticas ocurren cuando el sistema de eliminación se satura. El etanol es un ejemplo de un agente que presenta este tipo de eliminación.



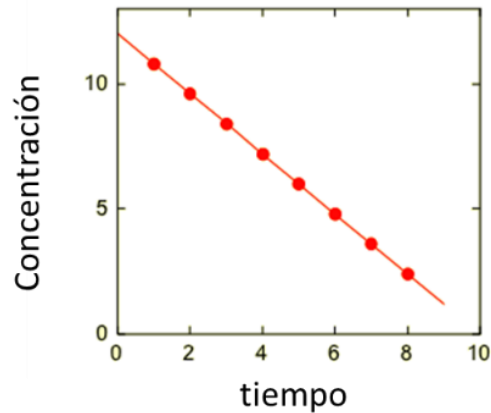


Figura 7. “Cinética de orden cero” Disponible en: <http://sepia.unil.ch/pharmacology/index.php?id=94>

Durante la cinética de eliminación de primer orden, una **fracción constante** del fármaco es eliminado por unidad de tiempo y es proporcional a la concentración del fármaco en el organismo.

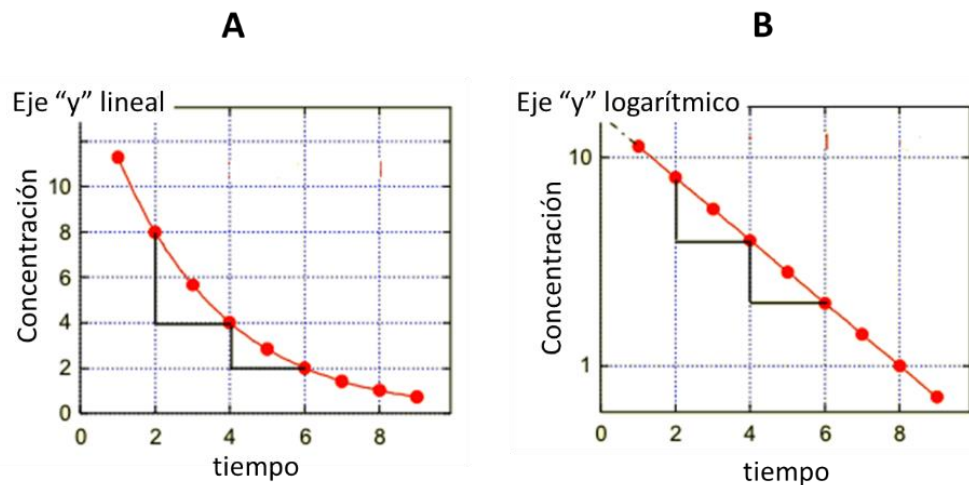


Figura 8. “Cinética de eliminación de primer orden. Escala lineal (A) escala semi-logarítmica (B)”

Disponible en: <http://sepia.unil.ch/pharmacology/index.php?id=94>

La curva de concentración-tiempo muestra un decremento exponencial cuando se grafica en escala lineal (figura 8 A) y un decremento lineal cuando se grafica en escala semi-logarítmica (figura 8 B). La mayoría de los fármacos se eliminan siguiendo una cinética

de primer orden y la ecuación que permite describir la concentración del fármaco a través del tiempo, después de una administración intravenosa, se muestra a continuación:

$$C_p(t) = C_0 e^{-k_e t}$$

Donde  $C_p$  es la concentración plasmática,  $C_0$  es la concentración matemática al tiempo cero,  $k_e$  es la constante de eliminación y “t” es el tiempo.

### 1.1.2 Interacciones Farmacocinéticas

El administrar a los pacientes la mejor terapia posible es una de las obligaciones de los profesionales de la salud. Pero para conseguir la máxima efectividad terapéutica es necesario, en muchas ocasiones, administrar más de un medicamento, aumentando así, el riesgo de aparición de efectos adversos como consecuencia de alguna interacción farmacológica (Girona Brumós, 2013).

Las interacciones farmacológicas se producen, en general, por dos mecanismos diferentes, y con base en ello se clasifican en interacciones farmacodinámicas y en interacciones farmacocinéticas (De Cos, 2003).

Las interacciones farmacocinéticas incluyen alteraciones en los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).

Las interacciones farmacocinéticas relacionadas con la absorción, suelen modificar la biodisponibilidad del fármaco, por la cantidad total del medicamento absorbido, o por la variación de la velocidad con que lo hace. Estos cambios pueden deberse a modificaciones en el pH gastrointestinal, a la formación de compuestos no absorbibles, a alteraciones en el vaciamiento gástrico, etc. (Hansten & Horn, 2007).

Una vez que han alcanzado el torrente circulatorio, los fármacos se desplazan de forma libre o unidos a proteínas plasmáticas. De todas las proteínas en el sistema circulatorio, la albúmina es la principal transportadora de fármacos ya que, constituye más de la mitad de las proteínas en la sangre. La unión fármaco-proteína depende de su afinidad.

Solamente el fármaco libre es activo, puesto que es el único capaz de atravesar barreras celulares y difundir hacia los tejidos. Cuando se lleva a cabo la coadministración de medicamentos los fármacos compiten por esta unión a proteínas, por lo que la administración de 2 o más fármacos con un alto grado de unión a proteínas puede incrementar la fracción libre de alguno y aumentar el riesgo de toxicidad (Girona Brumós, 2013).

Como ya se ha mencionado, el metabolismo y la excreción son los responsables de la eliminación de los fármacos del organismo. Las interacciones en el metabolismo, principalmente se deben a la inducción o inhibición de la familia de enzimas del Citocromo P450 y de las que catalizan las reacciones de conjugación. La inducción enzimática tiende a disminuir la exposición de los fármacos, mientras en el caso de la inhibición, el metabolismo se ve comprometido y la exposición farmacológica suele incrementarse (Del Arco, 1997).

Otra proteína que juega un papel importante durante las interacciones farmacocinéticas es la glicoproteína P (Gp-P), ya que tiene la capacidad de expulsar fármacos y metabolitos endógenos fuera de las células modificando así su distribución en el organismo. Al igual que con las enzimas metabólicas, su actividad puede ser inducida o inhibida por la acción de otros agentes farmacológicos. Su acción puede modificar tanto la absorción como la eliminación de los fármacos (Yu, 1999).

La alteración en la excreción renal de medicamentos se puede deber a la variación del pH de la orina (reabsorción pasiva), a variaciones de la secreción tubular de fármacos (activa) y a la variación del flujo renal. Las interacciones referentes a la excreción son menos frecuentes e importantes que las relacionadas con el metabolismo, o con la absorción, ya que las interacciones clínicamente significativas sólo se producirán si afectan a la molécula activa (Cozza et al., 2006; Girona Brumós, 2013).

## 1.2 Paracetamol

El paracetamol, también conocido como acetaminofén, es un analgésico paraaminofenólico que posee propiedades analgésicas y antipiréticas (Ameer & Greenblatt, 1977; Graham et al., 2013), carece de actividad antiinflamatoria periférica, y no afecta la función plaquetaria (Cronberg et al., 1984). El paracetamol se encuentra dentro de los analgésicos más utilizados en el mundo, y está en la clasificación de fármacos de primera elección indicados contra el dolor de intensidad moderada (Esteva, 2008).

### 1.2.1 Propiedades fisicoquímicas

La estructura química del paracetamol se muestra en la figura 9. La molécula pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como acetanilidas, los cuales contienen un grupo acetamida conjugado con un grupo fenilo.

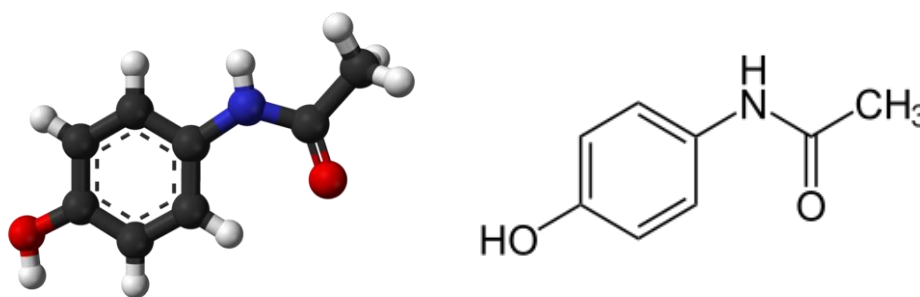


Figura 9. "Estructura química del paracetamol" Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Paracetamol>

En la tabla 1 se mencionan las principales características fisicoquímicas del paracetamol.

Tabla 1. “Propiedades fisicoquímicas del paracetamol”

<b>Densidad</b>	1.263 g/cm <sup>3</sup>
<b>Ácido débil p<sub>k</sub>a</b>	9.5
<b>λ<sub>max</sub> en metanol</b>	254 nm
<b>Solubilidad en H<sub>2</sub>O (20°C)</b>	1.4 g/100mL (moderada)
<b>Log P</b>	0.46
<b>Formula Química</b>	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Masa Molar</b>	151.17 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	169 °C

Información disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00316>

## 1.2.2 Farmacología

### I. Farmacocinética

El paracetamol es comúnmente administrado en comprimidos orales, en suspensión o en supositorios. En dosis adecuadas es considerado un medicamento eficaz y seguro. Sin embargo, debido a su bajo precio y a su amplia disponibilidad, las sobredosis accidentales e incluso deliberadas, son bastante frecuentes (Gunnell, Murray, & Hawton, 2000).

El paracetamol se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal (GI) alcanzando concentraciones máximas dentro de los primeros 60 minutos tras la administración de la dosis. Su biodisponibilidad por vía oral es muy elevada, va del 75-85%. La presencia de alimento en el estómago puede retrasar la aparición del pico, pero no su grado de absorción (Forrest, Clements, & Prescott, 1982).

A dosis terapéuticas su distribución es rápida y tiene un volumen de distribución (Vd) de aproximadamente 0.9 L/kg con una unión a proteínas de alrededor del 20%. En humanos, el tiempo de vida media del paracetamol es de 2 a 2.5 horas, pero en pacientes con daño hepático se puede prolongar hasta 4 horas (Prescott, 1996).

El hígado, y en menor medida el riñón y el intestino, son los principales órganos implicados en el metabolismo de paracetamol (Bessems & Vermeulen, 2001). Después de la administración de una dosis terapéutica, la mayoría del fármaco es transformado a



Un incremento en la dosis o en la exposición del paracetamol, como consecuencia de la inhibición de las enzimas que se encargan de su inactivación, puede conducir a una mayor producción del NAPQI, lo cual agota los niveles hepáticos de glutatión. El metabolito puede entonces reaccionar covalentemente con las enzimas y proteínas hepáticas llegando a provocar necrosis hepática aguda. En estudios en animales, debe consumirse el 70% del glutatión hepático antes de que se dé hepatotoxicidad (Davis et al., 1974).

## II. Farmacodinamia

En su trabajo ganador del Premio Nobel sobre el mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico (AAS) y otros AINEs, Vane demostró que estos fármacos disminuyen la formación de prostaglandinas (PGs) asociadas con el dolor, la fiebre y la inflamación, a través de la inhibición de la enzima cicloxigenasa (COX) (Vane, 1971).

Durante mucho tiempo se creyó que el mecanismo de acción del paracetamol era similar al del AAS. Sin embargo, hay diferencias importantes entre los efectos de ambos fármacos. Por ejemplo, las prostaglandinas participan en los procesos inflamatorios, pero el paracetamol no presenta actividad antiinflamatoria apreciable. Además, la COX también participa en la síntesis de tromboxanos que favorecen la coagulación de la sangre, por lo que el AAS tiene efectos anticoagulantes, pero el paracetamol no. También está demostrado que el AAS y otros AINEs son perjudiciales para la mucosa gástrica, donde las prostaglandinas desempeñan un papel gastroprotector, pero en este caso el paracetamol es seguro.

Actualmente, el mecanismo por el cual el paracetamol ejerce su efecto farmacológico sigue siendo desconocido. Sin embargo, en los últimos años se han logrado esclarecer los posibles mecanismos. Hay evidencia que lo reconoce como un inhibidor de la síntesis de PGs pero en ciertos sistemas celulares y bajo condiciones muy específicas. Aparentemente, tiene selectividad por la COX-2 (Graham et al., 2013), la isoforma de la enzima que sintetiza las prostaglandinas que regulan los procesos dolorosos e inflamatorios (Crofford, 1997).

Con el fin de comprender el mecanismo de acción del paracetamol, es necesario conocer la enzimología de la COX-1 y de la COX-2. Ambas enzimas son bifuncionales, ya que cada enzima posee actividad dual: la de ciclooxigenasa y la de peroxidasa (figura 11). La función de ciclooxigenasa de la COX depende de la formación de un radical fenoxilo en uno de sus residuos de tirosina, dicha reacción está catalizada por la acción de su peroxidasa (Morita, 2002).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la actividad de ciclooxigenasa es dependiente de la función de peroxidasa, pero la de peroxidasa puede funcionar de manera independiente y oxidar otros sustratos, incluido el paracetamol (Potter & Hinson, 1987), el cual inhibe competitivamente la activación de la función de ciclooxigenasa (figura 11), disminuyendo así, la síntesis de prostaglandinas.

La formación del radical del paracetamol sólo se lleva a cabo cuando los niveles celulares de peróxido son bajos. Esto podría explicar por qué el paracetamol es eficaz en el sistema nervioso central y en células endoteliales, pero no en plaquetas y células del sistema inmunitario, las cuales tienen altos niveles celulares de peróxido (Graham et al., 2013)

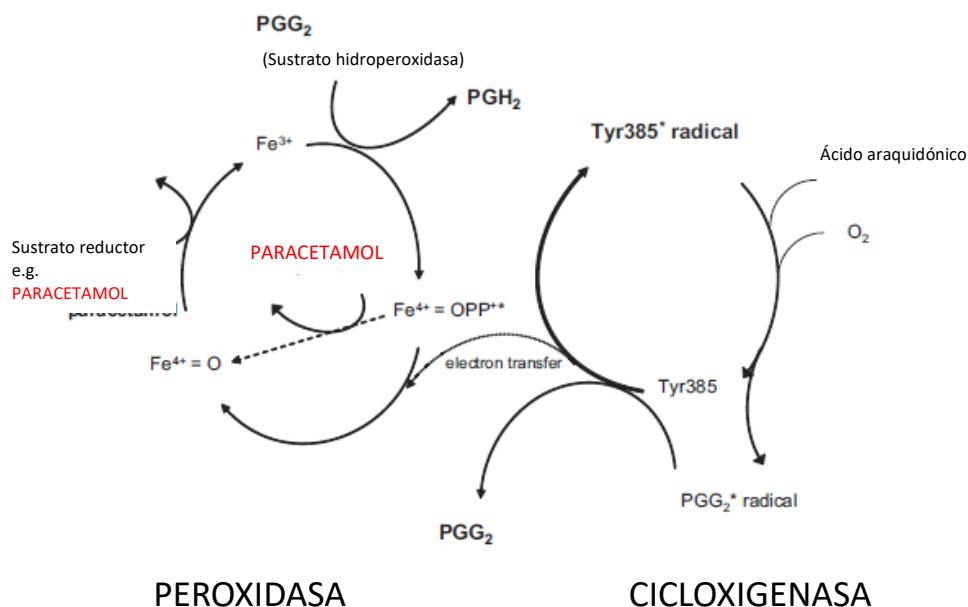


Figura 11. "Bi-funcionalidad de la COX y el posible mecanismo de acción del paracetamol" Adaptado de: Anderson, 2008



### 1.3 Curcumina

La *Curcuma Longa* es una planta de origen asiático usada comúnmente como especia, colorante y remedio medicinal. La curcumina, es el principal ingrediente activo responsable de su actividad biológica (Chainani-Wu, 2003) y es obtenida de la raíz de la planta. Es un compuesto que ha demostrado tener mucho potencial terapéutico debido a que es capaz de actuar sobre muchos blancos moleculares (Aggarwal et al., 2005).

#### 1.3.1 Propiedades fisicoquímicas

La curcumina es un polifenol cuya estructura fue descrita por primera vez en 1910 por Lampe y Milobedeska y fue denominada “diferuloylmetano”. Existen al menos dos formas de la curcumina, los tautómeros *ceto* y *eno* (figuras 12 y 13, respectivamente). La forma cetónica se encuentra en estado sólido y la enólica en estado líquido (Manolova et al., 2014).

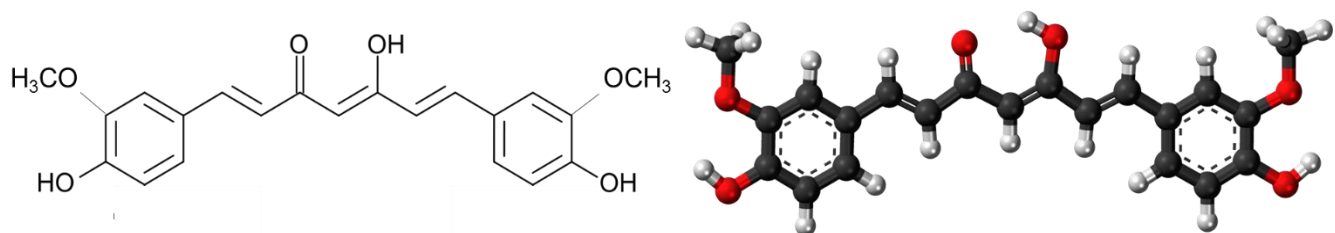


Figura 12. “Estructura cetónica de la curcumina”. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Curcumin>

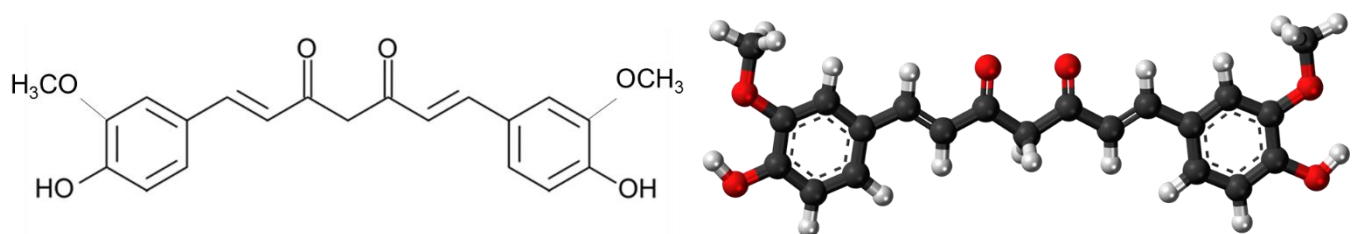


Figura 13. “Estructura enólica de la curcumina”. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Curcumin>

Algunas de las principales características fisicoquímicas de la curcumina se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. "Propiedades fisicoquímicas de la curcumina"

<b>Formula Química</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
<b>Masa Molar</b>	368.39 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	183 °C
<b>Densidad</b>	0.9348 g/cm <sup>3</sup>
<b>λ<sub>max</sub> en metanol</b>	420 nm
<b>Solubilidad en H<sub>2</sub>O (20°C)</b>	no soluble
<b>Log P</b>	3.2

Información disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/curcumin>

### 1.3.2 Farmacología

#### I. Farmacocinética

Actualmente, la curcumina se encuentra disponible en el mercado como alimento. Sin embargo, también se encuentra a la venta en comprimidos y polvo. Dichas presentaciones no cuentan con registro como medicamentos ya que son consideradas suplementos dietarios. La FDA la enlista como "**generalmente segura**" (Chainani-Wu, 2003), y se pueden utilizar hasta **12 g / día** sin presentar efectos no deseados (Aggarwal et al., 2007).

Datos preclínicos de modelos animales y estudios clínicos de fase I han demostrado una baja biodisponibilidad sistémica de la curcumina después de una dosificación oral (Sharma et al., 2007).

La absorción, distribución, metabolismo y excreción de la curcumina se han descrito en al menos 10 estudios durante las últimas tres décadas. Colectivamente, estos estudios apoyan la idea de que la curcumina es rápidamente sometida a un eficiente metabolismo de primer paso que disminuye severamente la disponibilidad del compuesto original en la biofase (Sharma et al., 2007).

Algunos investigadores han desarrollado estrategias que permiten mejorar la biodisponibilidad de la curcumina a través de distintos sistemas de entrega, incluyendo nanopartículas, liposomas, micelas, etc. (Yallapu et al., 2012). Estos métodos de entrega han demostrado una mejora significativa de su biodisponibilidad en comparación con los niveles detectados cuando se administra sola. Sin embargo, a pesar de la mejora en su biodisponibilidad, muchos estudios no muestran una mejora significativa de la eficacia farmacológica de la curcumina, (Ji & Shen, 2014).

Tras una administración oral de 1 mg/kg, el 75 % de la curcumina y de sus metabolitos fueron eliminados vía biliar como conjugados glucurónidos y sulfatados, mientras que sólo una pequeña cantidad pudo ser detectada en la orina (Wahlström & Blennow, 1978). La figura 14 muestra los principales metabolitos de la curcumina tanto en humanos como en roedores.

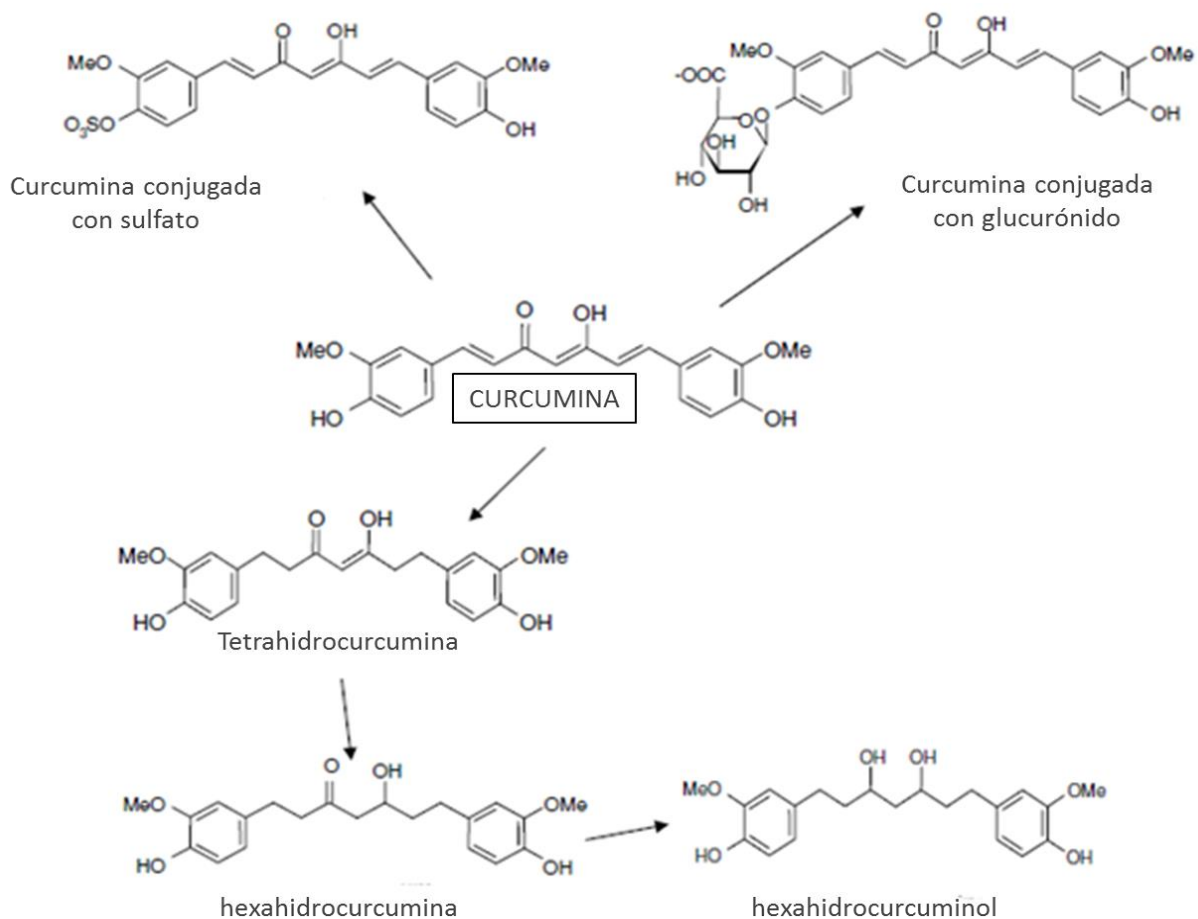


Figura 14. “Principales metabolitos de la curcumina” Adaptado de: Sharma et al., 2007

## II. Farmacodinamia

La curcumina ha demostrado ejercer una fascinante variedad de efectos farmacológicos contra enfermedades crónicas e inflamatorias, infecciones, entre otras. Esto se debe principalmente a que es capaz de regular numerosos blancos moleculares como se observa en la figura 15.

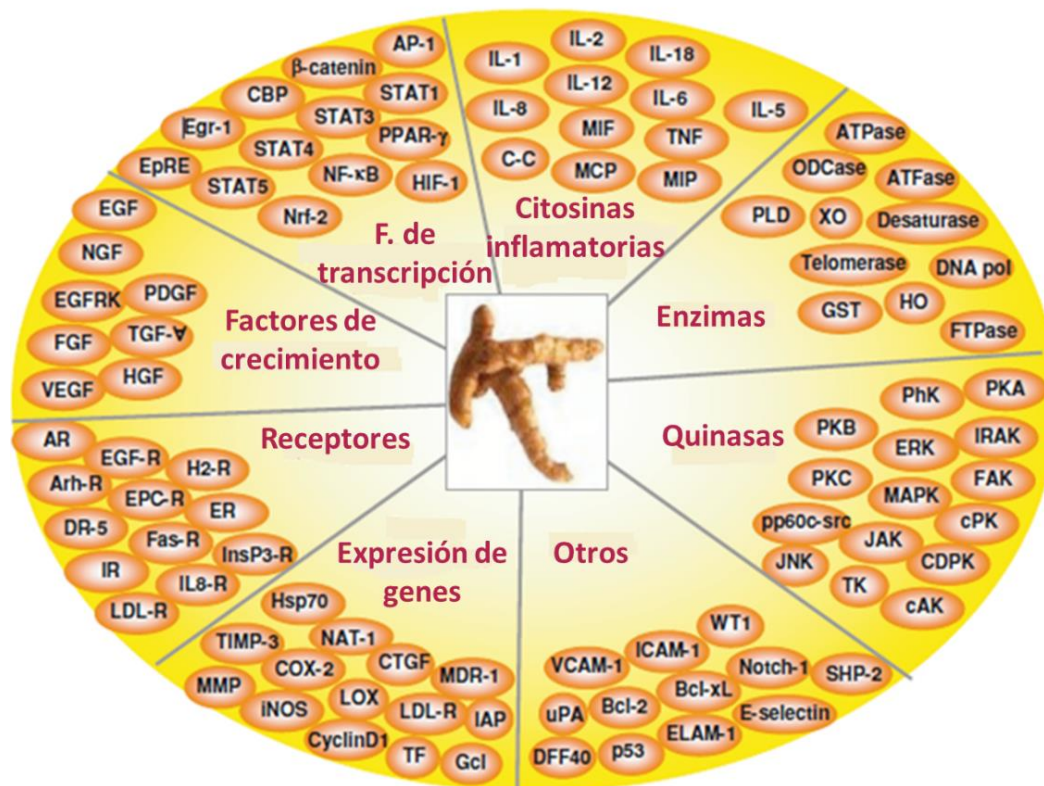


Figura 15. “Blancos moleculares de la curcumina” Adaptado de: Aggarwal et al., 2007

Además de lo mencionado anteriormente, hay evidencia que sugiere que la curcumina también posee propiedades analgésicas. En 2012, de Paz se dio a la tarea de caracterizar el efecto antinociceptivo de la curcumina utilizando el ensayo de la formalina (De Paz-Campos et al., 2012). Sus resultados se muestran en la figura 16.

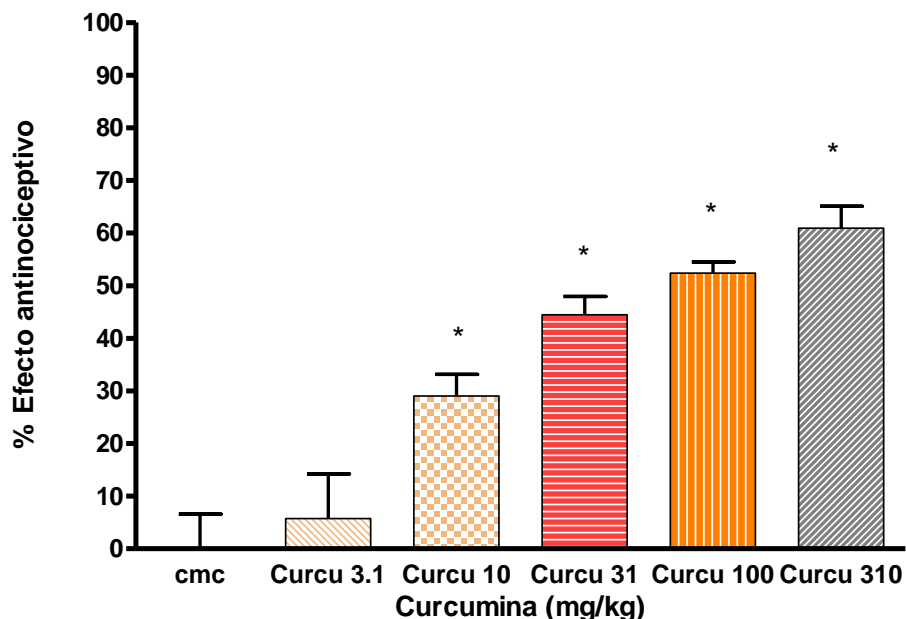


Figura 16. “Curvas dosis-efecto antinociceptivo (%) de la curcumina en la prueba de formalina al 1% correspondiente a la segunda fase de la prueba (n=6)”. Las barras indican el promedio  $\pm$  D.E. \*Diferencia significativa con respecto del vehículo ( $p < 0.05$ ). Adaptado de: De Paz-Campos et al., 2012

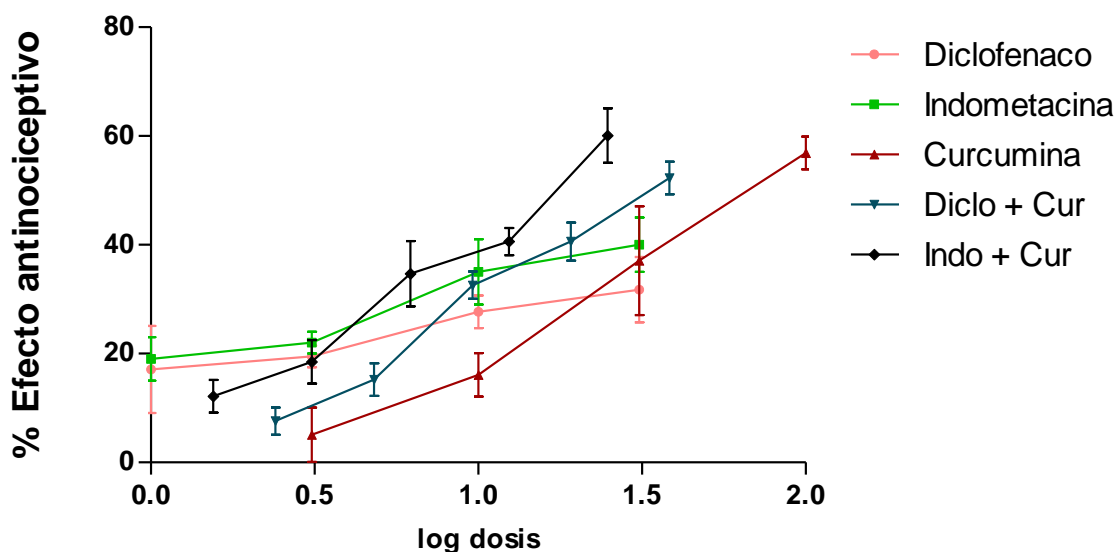


Figura 17 “Curvas dosis-efecto antinociceptivo (%) normalizada de los AINES, la curcumina y sus combinaciones (n=6)”. Cada punto representa la media  $\pm$  D.E.”. Adaptado de: De Paz-Campos et al., 2014

Posteriormente, se realizó un estudio de interacción farmacodinámica en el que evaluó el efecto antinociceptivo de las combinaciones de algunos AINEs con la curcumina utilizando el método isobolográfico. Sus resultados mostraron una interacción sinérgica, lo cual permite obtener la misma eficacia terapéutica utilizando dosis menores de los fármacos (figura 17), disminuyendo así la probabilidad de aparición de efectos adversos (De Paz-Campos et al., 2014).

## **2. Justificación**

El paracetamol es uno de los analgésicos más utilizados en todo el mundo ya que se encuentra dentro de la clasificación de medicamentos de primera elección en contra del dolor de intensidad moderada (Graham et al., 2013). Sin embargo, su actividad analgésica se ve limitada por lo que se conoce como “techo analgésico” (Hahn et al., 2003), lo que significa que a partir de cierta dosis ya no se puede incrementar su efecto terapéutico, mientras que aumentan sus efectos adversos como el daño hepático y renal.

Debido a lo anterior, se siguen buscando alternativas que mejoren su eficacia terapéutica, y que al mismo tiempo no produzcan daño a la salud del paciente. En 2014, de Paz llevó a cabo la caracterización de la eficacia analgésica de las combinaciones entre la curcumina y algunos AINEs. Sus resultados brindaron evidencia sobre el beneficio de la administración combinada de estos agentes debido a un efecto sinérgico en la actividad antinociceptiva (De Paz-Campos et al., 2014).

Sin embargo, a pesar de que sus resultados sugieren que la combinación de la curcumina con otros agentes analgésicos suele resultar en un incremento del efecto terapéutico, debe tomarse en cuenta que la coadministración de medicamentos también puede aumentar el riesgo de aparición de efectos adversos o disminuir la eficacia terapéutica de los fármacos (Ito et al., 1998). Estas situaciones pueden ocurrir como consecuencia de interacciones fármaco-fármaco que pueden afectar la farmacocinética de los compuestos. Actualmente, hay evidencia de que la administración de curcumina puede alterar los perfiles farmacocinéticos de algunos fármacos (Ching et al., 2001; Juan et al., 2007; Rani et al., 2012; Zhang et al., 2007).

La absorción de paracetamol es un proceso que depende del vaciamiento gástrico (Heading et al., 1973), por lo que una administración oral previa de curcumina puede influir sobre la motilidad intestinal y alterar el tránsito gastrointestinal, modificando así, la magnitud de la absorción del paracetamol y el tiempo en el que éste puede ser absorbido, es decir, su biodisponibilidad. Además, la curcumina aumenta la expresión de grelina (Xu

et al., 2013), una hormona que regula procesos gastrointestinales que mejoran la condición de gastroparesis (retraso en el vaciamiento gástrico).

Por otro lado, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la curcumina regula la expresión y función de algunas isoformas del CYP450 (Ciolino et al., 1998; Hou et al., 2007; Oetari et al., 1996; Thapliyal & Maru, 2001; Zhang et al., 2007) y otras enzimas involucradas en el metabolismo de los fármacos como la UDP-Glucuronosil transferasa (UGT) (Basu et al., 2007) y la Glutathion S-transferasa (GST) (Valentine et al., 2006), enzimas que participan en el metabolismo del paracetamol.

Todo lo anteriormente descrito, sugiere que la curcumina podría alterar el perfil cinético del paracetamol, es por ello que es de suma importancia llevar a cabo un estudio de interacción farmacocinética para evaluar el efecto que la curcumina puede tener sobre la biodisponibilidad del paracetamol.



### **3. Hipótesis**

La administración de una dosis oral de la curcumina modifica la biodisponibilidad del paracetamol.

## **4. Objetivos**

### **4.1 General**

- Evaluar el efecto de la curcumina sobre la biodisponibilidad del paracetamol

### **4.2 Específicos**

- Desarrollar un método que permita la cuantificación de paracetamol en plasma de rata mediante la técnica analítica de HPLC.
- Validar el método de acuerdo a lo descrito en la NOM-177-SSA1-2013.
- Realizar el análisis farmacocinético del paracetamol con y sin administración de curcumina.

## 5. Diseño experimental

### 5.1 Desarrollo del método analítico

Para la cuantificación del paracetamol se llevó a cabo el desarrollo de una metodología analítica utilizando la técnica de Cromatografía de Líquidos en Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). En la figura 18 se muestra un resumen de la estrategia experimental seguida durante el desarrollo del método.

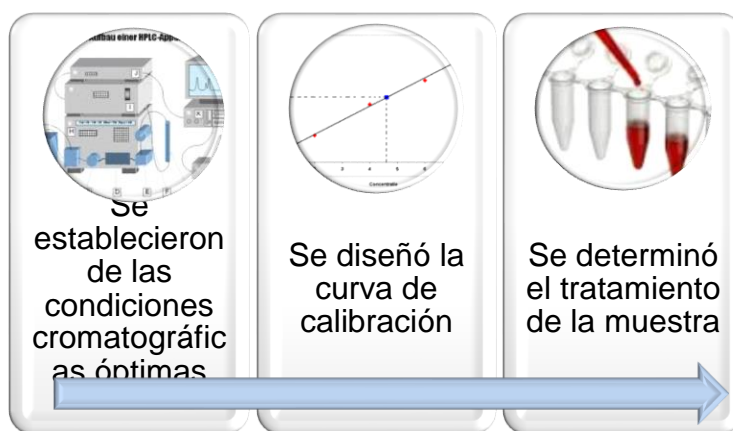


Figura 18. “Estrategia experimental seguida para el desarrollo del método analítico”

### 5.2 Validación del método analítico

La metodología desarrollada para la cuantificación del paracetamol se validó de acuerdo con los parámetros y criterios de aceptación establecidos en la NOM-177-SSA1-2013. Los parámetros evaluados se mencionan en la figura 19.

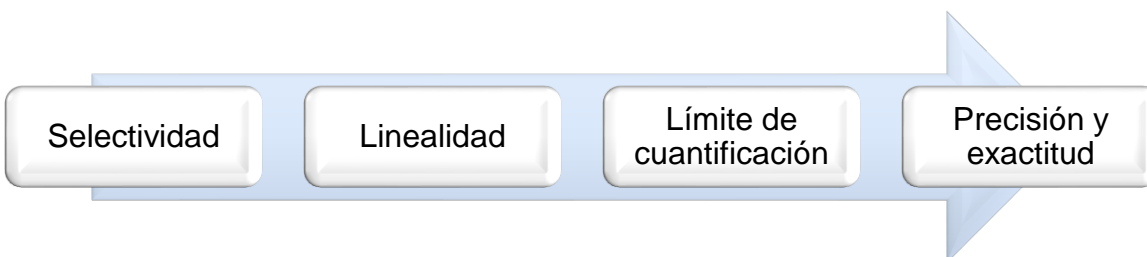


Figura 19. “Parámetros evaluados durante la validación de la metodología analítica”

### 5.3 Estudio de interacción farmacocinética

Para el estudio farmacocinético se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 200- 250 gramos ( $n = 16$ ), y se dividieron en 2 grupos ( $n = 8$ ). El primer grupo recibió una administración de 178 mg / kg del paracetamol por vía oral, mientras que al segundo grupo se le administró una dosis oral de 30 mg/kg de curcumina 30 minutos antes del tratamiento con paracetamol (figura 20).

Los fármacos se administraron en una suspensión utilizando como vehículo una solución de carboximetil celulosa al 0.5 %. Todas las ratas fueron privadas de alimento 12 horas previas al estudio.

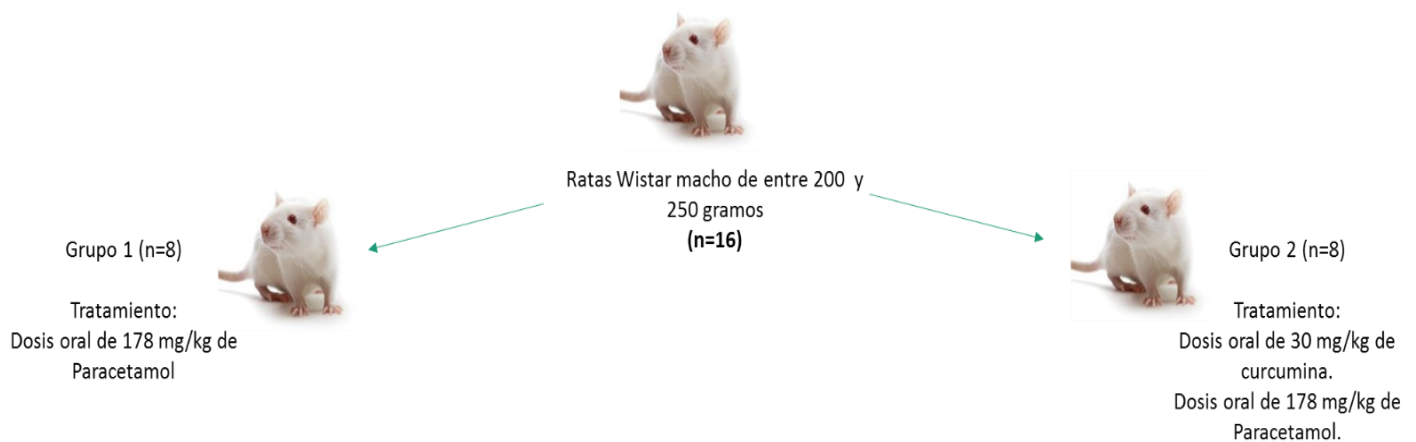


Figura 20. “Diseño del estudio farmacocinético”

La toma de muestras se realizó a través de la arteria caudal de la cola de la rata, por lo que antes de la administración del tratamiento, las ratas se sometieron a una cirugía en la cual la cánula fue insertada y fijada a dicho vaso sanguíneo. En la figura 21 se muestra una imagen representativa del procedimiento.



Figura 21. “Canulación de la arteria caudal en la cola de la rata de la cual se obtuvieron las muestras de sangre en los diferentes tiempos de muestreo”

Después de la administración del paracetamol, se extrajeron muestras de sangre (200  $\mu$ L) en los siguientes tiempos:

$t$  (h)  $\rightarrow$  0.083, 0.166, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, y 5.

Las muestras fueron recolectadas en tubos con heparina sódica al 0.2 % w/v y centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 minutos, se obtuvieron 100  $\mu$ L de plasma de cada muestra y se conservaron a -40 °C hasta su análisis cromatográfico.

Las concentraciones del paracetamol se calcularon para cada punto de muestreo, y se graficaron los perfiles cinéticos de ambos grupos.

Finalmente, se realizó un análisis farmacocinético no-compartimentar (NCA) para obtener los parámetros de biodisponibilidad utilizando el software Phoenix WinNonLin<sup>MR</sup> versión 6.3.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism<sup>MR</sup> versión 5.01, utilizando la prueba t de Student. Los resultados se reportan como la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.).

## 6. Resultados

### 6.1 Desarrollo del método analítico

#### 6.1.1 Selección de las condiciones cromatográficas.

En la figura 22 se muestra un cromatograma representativo del paracetamol y del estándar interno obtenido bajo las condiciones descritas en la tabla 3, las cuales fueron seleccionadas para llevar a cabo el análisis cuantitativo del paracetamol.

Tabla 3. “Condiciones cromatográficas óptimas”

<b>Fase estacionaria</b>	Columna ZORBAX TMS de 5µm 4.6x250 mm
<b>Fase móvil</b>	Buffer 0.02M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3) : ACN (78 : 22)
<b>Longitud de onda</b>	254 nm
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Estándar Interno (E.I.)</b>	2-acetamidofenol

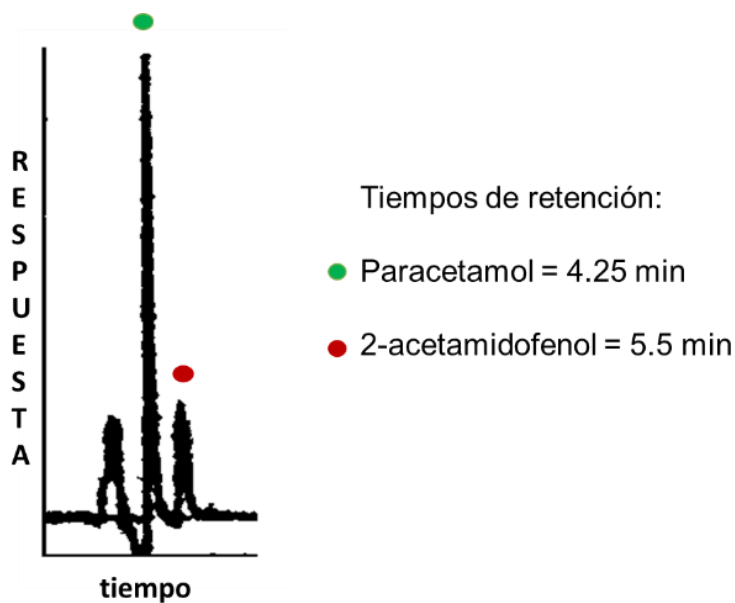


Figura 22. “Cromatograma del paracetamol y del 2-acetamidofenol (E.I.)”

### 6.1.2 Diseño de la curva de calibración

Para determinar el intervalo de concentraciones de la curva se utilizó como referencia el valor de la  $C_{max}$  de la publicación de un estudio farmacocinético (Granados-Soto et al., 1992) en donde las condiciones experimentales del tratamiento con el paracetamol fueron las mismas:

Dosis: 178 mg/kg

Vía de administración: oral

Forma farmacéutica: suspensión (Vehículo: Carboximetil celulosa 0.5 %)

Con base a lo anterior, el intervalo de concentraciones de trabajo seleccionado fue de 2 a 32  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , y las concentraciones de las muestras control baja (MCB), media (MCM) y alta (MCA) fueron 3, 12, y 28  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente. Las tablas 4 y 5 muestran la forma en la que se llevó a cabo la preparación de la curva partiendo de una solución stock de 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  del paracetamol y una de 1 mg / mL del 2-acetamidofenol.

Tabla 4 “Preparación de la curva de concentraciones”

Punto	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Volumen P. ( $\mu\text{L}$ )	Volumen E. I. ( $\mu\text{L}$ )	Plasma ( $\mu\text{L}$ )	MeOH ( $\mu\text{L}$ )
1	2	20	60	100	820
2	4	40	60	100	800
3	8	80	60	100	760
4	16	160	60	100	680
5	24	240	60	100	600
6	32	320	60	100	520

A cada punto de la curva, así como a los controles, se les adicionan 100  $\mu\text{L}$  de plasma de rata y un volumen constante de 60  $\mu\text{L}$  de la solución del E.I. El volumen añadido del

paracetamol está en función de la concentración de cada punto. Posteriormente, cada tubo se lleva a un volumen final de 1mL con metanol (MeOH) y se somete al mismo tratamiento que la muestra (figura 23).

Tabla 5. “Preparación de puntos control”

Controles	Concentración (µg/mL)	Volumen P (µL)	Volumen E. I. (µL)	Plasma (µL)	MeOH (µL)
MCB	3	30	60	100	810
MCM	12	120	60	100	720
MCA	28	280	60	100	560

### 6.1.3 Tratamiento de la muestra

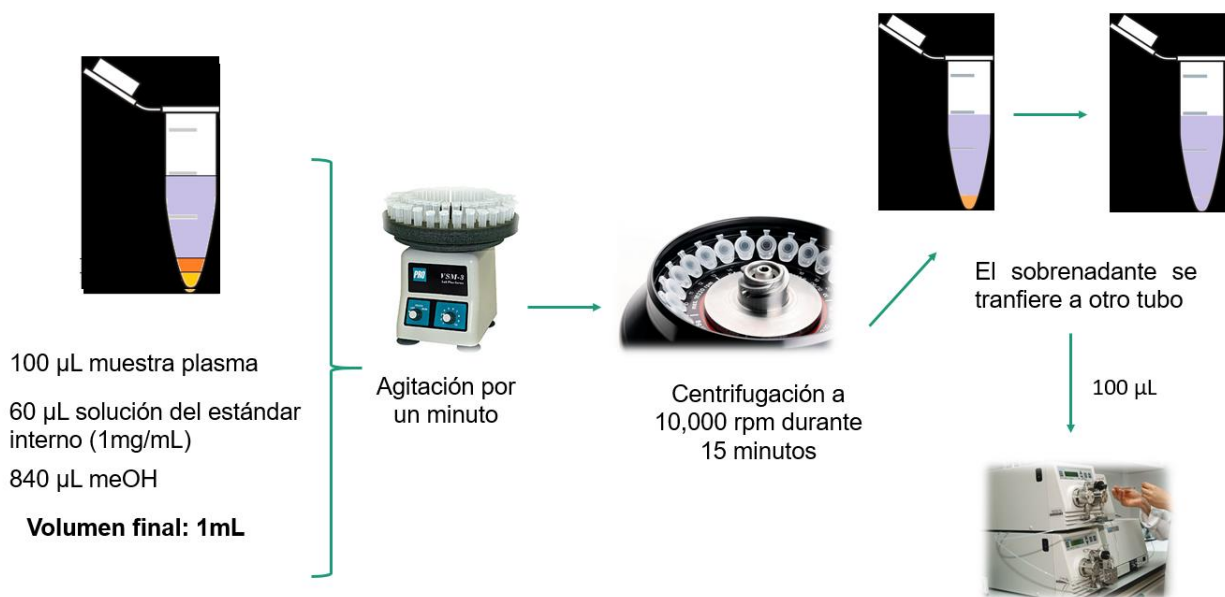


Figura 23. “Esquema del tratamiento de la muestra previo a su análisis cromatográfico”

Para el análisis de las muestras se añaden 60 µL del 2-acetamidofenol y 840 µL del MeOH para un volumen final de 1 mL. Se agitan durante un minuto y se centrifuga a



15,000 rpm durante 15 min. Finalmente se inyectan 100 µL de sobrenadante al cromatógrafo (figura 23).

## 6.2 Validación del método analítico

Para la validación de la metodología analítica se utilizó como referencia la NOM-SSA-177-2013. La tabla 6 muestra los parámetros evaluados y sus criterios de aceptación.

Tabla 6 “Parámetros evaluados y sus criterios de aceptación”

Parámetro	Criterio de aceptación
Selectividad	No interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica
Linealidad	$R > 0.99$ y $R^2 = 0.98$
Límite inferior de cuantificación	Precisión $CV \leq 20 \%$ y exactitud $\pm 20 \%$ del valor nominal
Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)	$CV \leq 15 \%$
Exactitud	El promedio de MCB, MCM, y MCA debe estar dentro del $\pm 15 \%$ del valor nominal

### 6.2.1 Selectividad

Se inyectaron individualmente y por triplicado, la fase móvil (figura 24 A) y la curcumina (figura 24 B), así como el estándar de paracetamol (figura 24 C) y el E.I. (figura 24 D). La curcumina, el paracetamol y el 2-acetamidofenol estaban disueltos en MeOH.

Por otro lado, como se puede apreciar en la figura 24 B, el cromatograma de la curcumina no presentó ningún pico durante el tiempo evaluado (20 min). Sin embargo, con la finalidad de corroborar el resultado se ejecutó un barrido de absorción y se volvió a realizar el análisis cromatográfico incrementando la duración de la corrida y la cantidad de curcumina inyectada (figura 25).

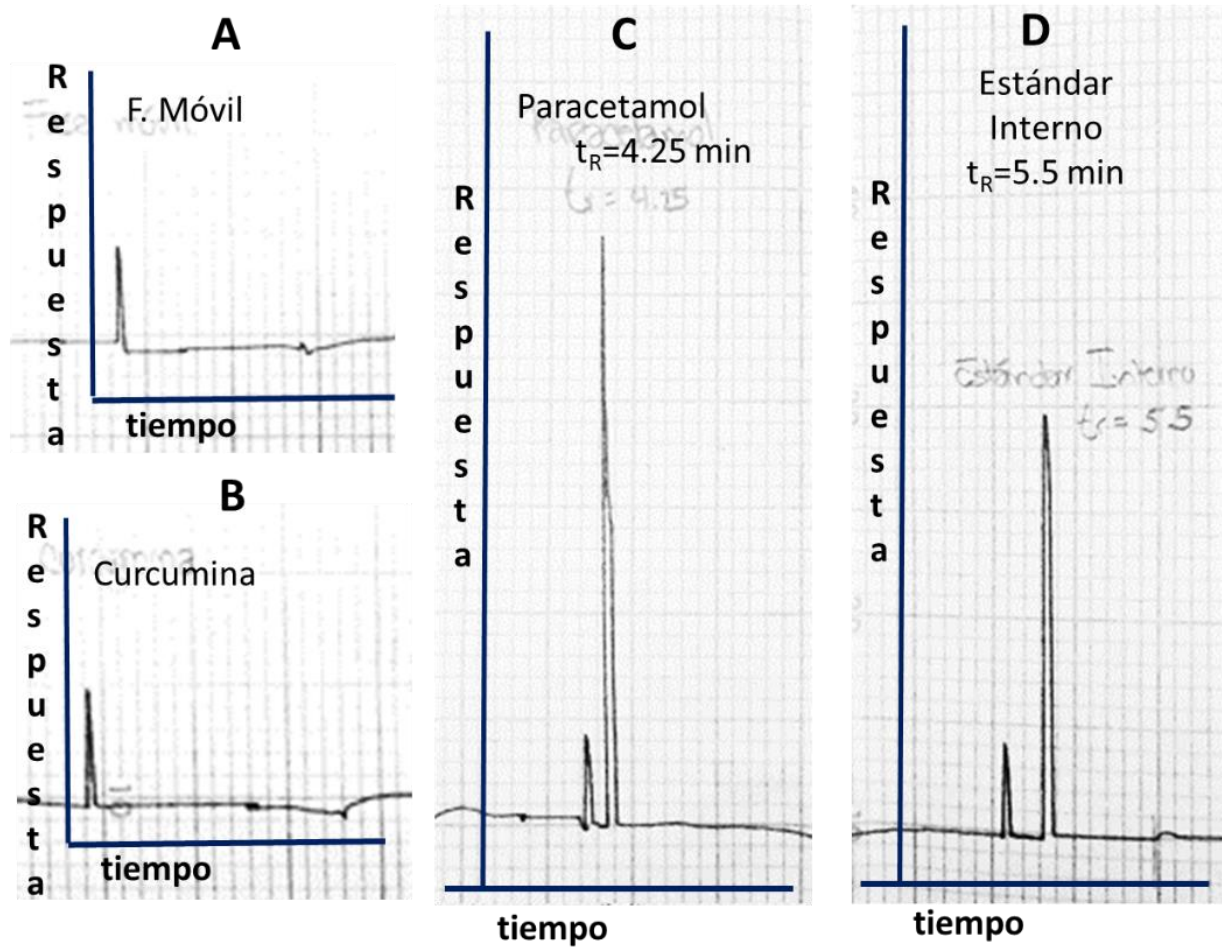


Figura 24. “Cromatogramas representativos obtenidos tras la inyección de la fase móvil (A), la curcumina (B), el paracetamol (C) y el E.I (D)”

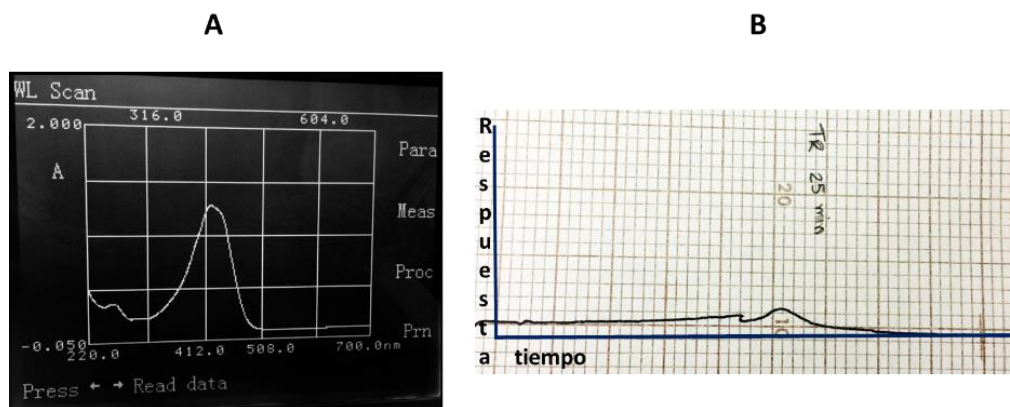


Figura 25 “Espectro de absorción (A) y cromatograma representativo de la curcumina (B)”

Como se observa en la figura 25 A, la longitud de absorción máxima de la curcumina en MeOH es de 420 nm pero presenta un primer pico de absorción mucho más pequeño alrededor de los 250 nm, razón por la cual es posible apreciar un pico en el cromatograma de la figura 25 B a los 25 minutos. Sin embargo, este pico no representa un problema de selectividad debido a que para poder apreciarlo se tuvo que aumentar la magnitud de la cantidad de curcumina en relación 100:1 del máximo esperado bajo las condiciones del estudio.

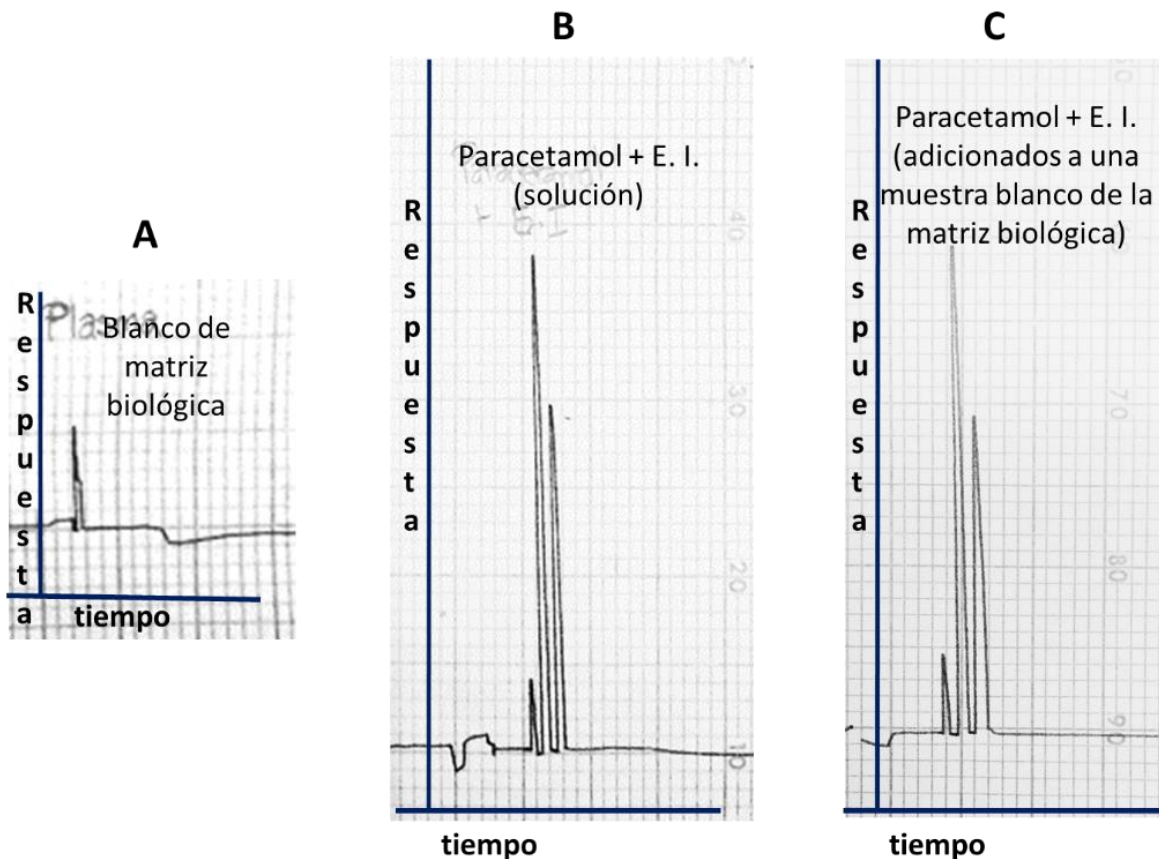


Figura 26. "Cromatogramas representativos obtenidos tras la inyección de un blanco de matriz biológica (A), una solución del paracetamol y del E.I. (B), y una muestra blanca adicionada con ambos compuestos (C)"

El método resultó ser selectivo al demostrar la no interferencia de los compuestos endógenos de la matriz biológica con el paracetamol y el estándar interno tras la inyección individual y por triplicado de una muestra blanco de la matriz biológica (figura

26 A), una solución del paracetamol y el estándar interno (figura 26 B), así como una muestra blanco adicionada tanto con el paracetamol como con el E.I. (figura 26 C).

Todos los cromatogramas se obtuvieron bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas en la tabla 3. Los tiempos de retención del paracetamol y del 2-acetamidofenol bajo dichas condiciones fueron los siguientes:

Tabla 7. “Tiempos de retención”

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Paracetamol	4.25
2-acetamidofenol (E.I.)	5.5

### 6.2.2 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra. El método resultó ser lineal de 2 a 32 µg/mL. En la figura 27 se muestra la gráfica promedio (n=6) de la curva de calibración, la cual cumple con el criterio de aceptación de la norma ( $R^2 > 0.99$ )

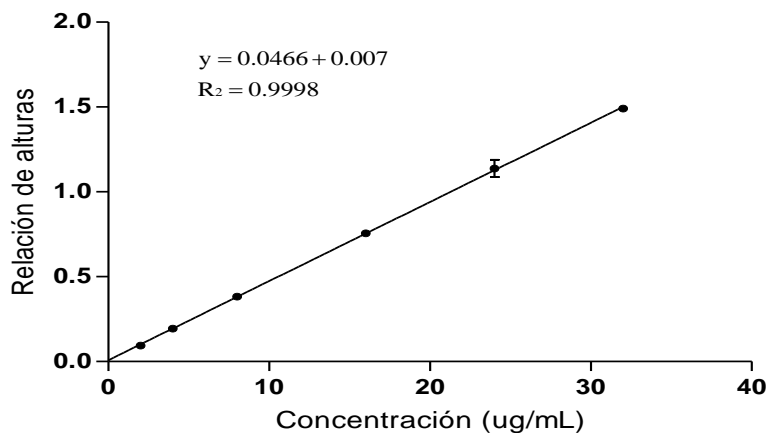


Figura 27. “Linealidad del método en el intervalo de 2 – 32 µg/mL”. La gráfica muestra la media ± D.E. (n=6) de cada punto.

### 6.2.3 Límite inferior de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LIC), es la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y la exactitud.

El límite inferior de cuantificación es aceptable cuando el valor promedio (n=3) está dentro de  $\pm 20\%$  del valor nominal con un  $\% CV$  no mayor a 20. En este caso el límite de cuantificación fue de 1  $\mu\text{g/ml}$  (tabla 8).

Tabla 8. “Límite inferior de cuantificación”

<b>Concentración nominal (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Concentración experimental (media <math>\pm</math> D.E., <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% CV</b>	<b>% Exactitud</b>
<b>1</b>	0.905 $\pm$ 0.034	3.85	94.5%

### 6.2.4 Precisión y exactitud

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales; se evalúa como repetibilidad (intra-análisis) y reproducibilidad (inter-análisis). Un método se considera repetible y reproducible cuando el  $\% CV$  de los 3 niveles de concentración evaluados (MCB, MCM, y MCA) es menor o igual a 15.

La exactitud es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. El promedio para los tres niveles de concentración debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal.

En la tabla 9 se muestran los resultados de la precisión y la exactitud. Como se puede observar el método cumplió con los criterios de aceptación de la NOM177-SSA1-2013.

Tabla 9. “Precisión y exactitud del método”

Concentración Teórica (µg/mL)	Intra-análisis			Inter-análisis		
	Concentración Experimental (media ± D.E., µg/mL)	% CV	% Exactitud	Concentración Experimental (media ± D.E., µg/mL)	% CV	% Exactitud
3	3.07 ± 0.14	4.65	102.33	3.05 ± 0.09	3.21	101.80
12	12.09 ± 0.20	1.68	100.75	12.14 ± 0.11	0.92	101.22
28	27.92 ± 0.94	3.39	99.71	28.05 ± 0.59	2.08	101.79

### 6.3 Estudio de interacción farmacocinética

Una vez que se analizaron todas las muestras se graficaron las curvas de concentración-tiempo que se muestran en la figura 28.

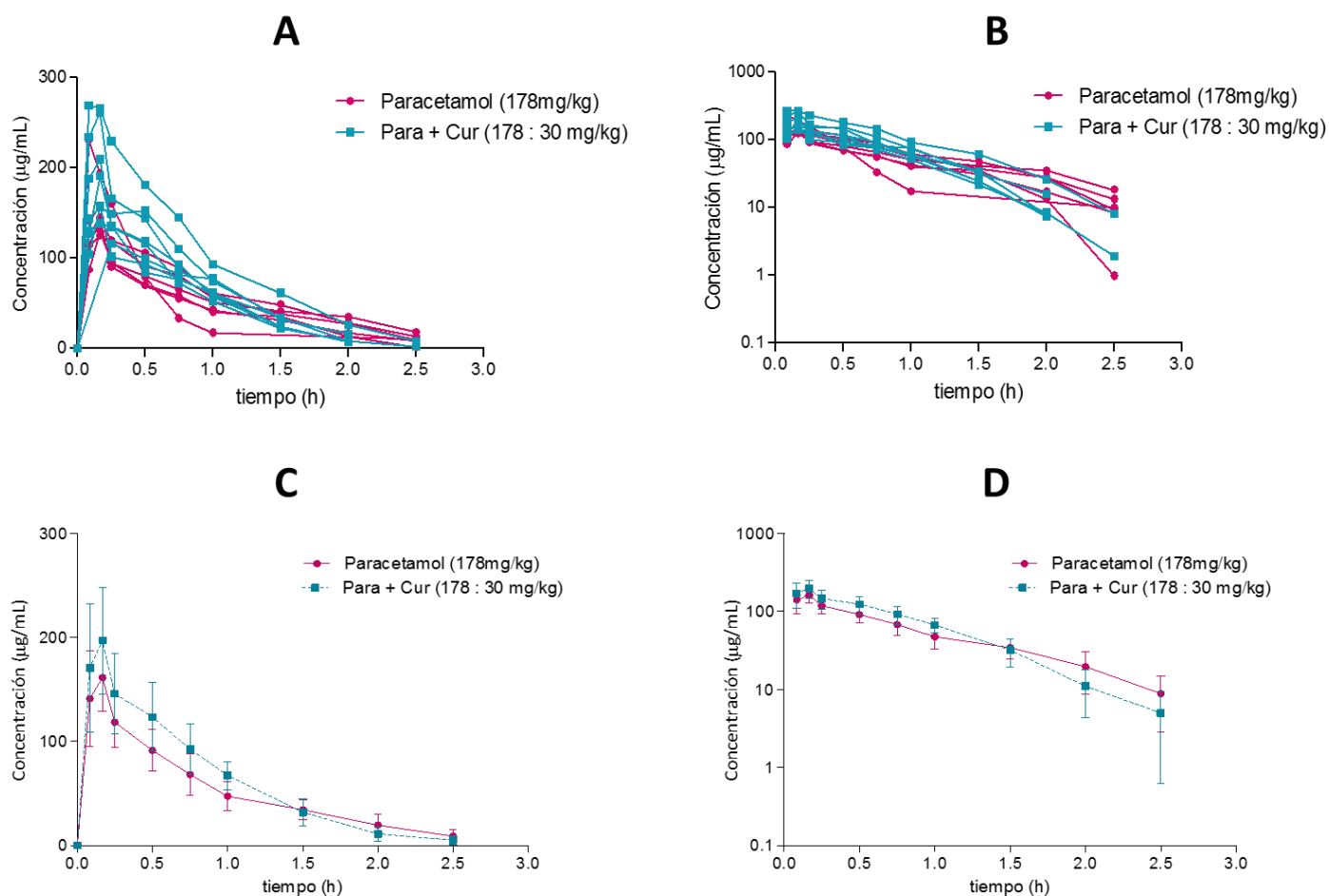


Figura 28. “Curvas de concentración plasmática-tiempo del paracetamol en ratas después de la administración de una dosis oral de paracetamol sólo o con curcumina”.

En (A y B) se muestran todos los perfiles cinéticos, mientras que en (C y D) se graficó la media  $\pm$  la desviación estándar (D.E) de 8 ratas por grupo. Las gráficas se realizaron en escala lineal (A y C) y en escala logarítmica (B y D).

El cálculo de los parámetros de biodisponibilidad se realizó mediante un análisis no-compartimentar (NCA), empleando como herramienta de análisis al software Phoenix WinNonLin<sup>MR</sup> versión 6.3. Los resultados se presentan en la figura 29 y en la tabla 10.

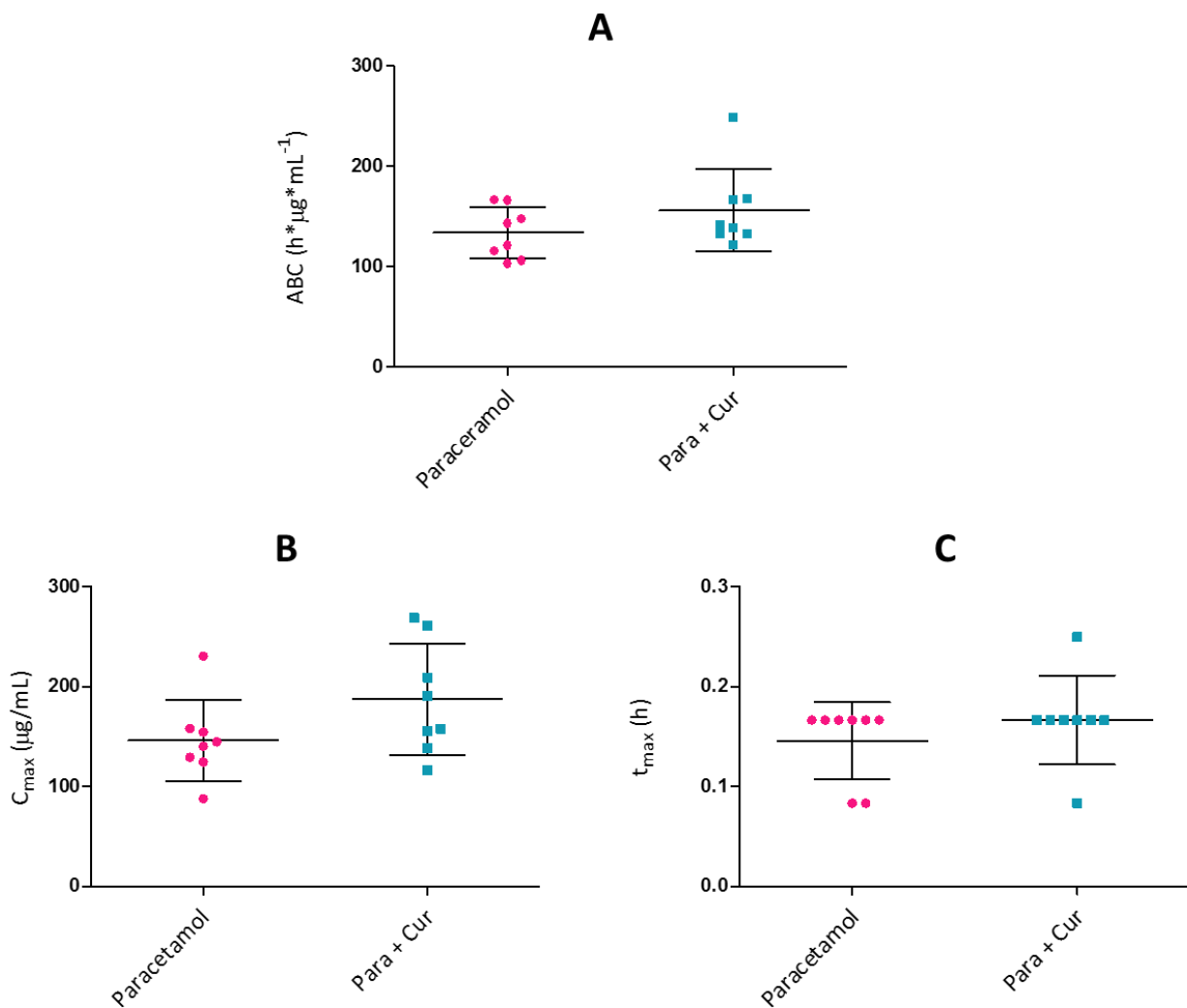


Figura 29. “Valores estimados para el ABC (A), la C<sub>max</sub> (B) y el t<sub>max</sub> (C)” Los resultados se muestran como la media  $\pm$  D.E. de 8 ratas por grupo.

Tabla 10. “Parámetros de biodisponibilidad del paracetamol”

Parámetro	Paracetamol (media ± D.E.) n=8	Paracetamol + Curcumina (media ± D.E.) n=8	Valor de p
$ABC_{0 \rightarrow t_{last}} (h \cdot \mu g \cdot mL^{-1})$	123.1 ± 22.75	151.8 ± 41.21	0.1396
$C_{max} (\mu g \cdot mL^{-1})$	146.3 ± 40.58	187.3 ± 55.99	0.4148
$t_{max} (h)$	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.7139

Los resultados no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) al hacer la comparación de grupos utilizando la prueba estadística t de Student.



## 7. Análisis de resultados

Los estudios que permiten entender, describir y caracterizar la farmacología de los agentes terapéuticos son de gran importancia debido a que la información obtenida a partir de ellos se puede emplear para mejorar el manejo terapéutico de los fármacos, aumentar su eficacia y reducir su riesgo de toxicidad. Sin embargo, para poder llevar a cabo este tipo de estudios se requieren herramientas analíticas confiables. Una de las técnicas mayormente utilizadas para la cuantificación de los fármacos en las distintas matrices biológicas es el HPLC.

Para este estudio, se desarrolló una metodología utilizando la modalidad de fase reversa (fase móvil polar y fase estacionaria NO polar) del HPLC como técnica analítica para la cuantificación del paracetamol en el plasma de rata. En este tipo de cromatografía, la separación está basada en las interacciones hidrofóbicas entre el analito y el empaque de la columna (Dong, 2006), por lo que la selección de las fases estuvo determinada por la polaridad del paracetamol mostrada en la figura 30. De acuerdo con ese mapa de polaridad, la parte polar (rojo) de la molécula es la que va a permitir el arrastre por parte de la fase móvil, mientras que la parte no polar (gris) estará interactuando con la parte hidrofóbica de la columna.

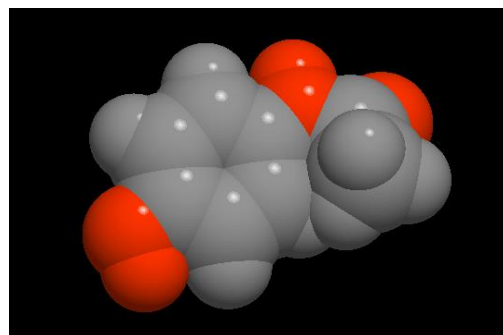


Figura 30. “Mapa de polaridad de una molécula de paracetamol” Disponible en: [https://en.wikipedia.org/wiki/Polar\\_surface\\_area](https://en.wikipedia.org/wiki/Polar_surface_area)

La capacidad de retención de una columna con características no polares depende principalmente de 3 factores: la hidrofobicidad de su empaque, el tamaño de la partícula y su longitud.

En la literatura (Pang et al., 1979; Said & Sharaf, 1981; Soysa & Kolambage, 2010), las columnas utilizadas con mayor frecuencia para el análisis cromatográfico del paracetamol contienen empaques altamente hidrofóbicos, los más empelados son el C8 y el C18 (figura 31 A y 31 B). Sin embargo, la fase estacionaria seleccionada para este estudio fue una columna de la marca Zorbax<sup>MR</sup> con empaque de trimetilsilano (TMS) que, como se puede apreciar en la figura 31 C, a pesar de tener características no polares, no es tan hidrófobo como los otros 2 empaques.

Teniendo en consideración la superficie no polar del paracetamol y que la separación en fase reversa se basa en las interacciones hidrofóbicas entre el analito y el empaque, la retención del paracetamol debe ser mayor en las columnas con empaque C8 o C18 que con la de TMS. Debido a lo anterior, la selección de la fase móvil estuvo orientada a incrementar la retención de la molécula sin tener de cambiar la columna.

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes que van a eluir a la muestra. La polaridad de la fase está determinada por la proporción de los disolventes empleados para su constitución, los más utilizados son el agua (H<sub>2</sub>O), el metanol (MeOH), el acetonitrilo (ACN) y el tetrahidrofurano (THF) (Corradini, 2016).

Una de las principales características de la fase móvil es su fuerza de arrastre, la cual en cromatografía en fase reversa mantiene una relación inversa con la polaridad, es decir que a mayor polaridad, menor será la fuerza de arrastre (Horváth, 2013). Esto es importante porque al usar una fase móvil de alta polaridad, se logró incrementar la retención del paracetamol. El disolvente con mayor índice de polaridad y menor fuerza de arrastre es el H<sub>2</sub>O, por lo que la fase móvil empleada durante el análisis estuvo constituida por una mezcla de una solución **acuosa** de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.02 M y ACN en proporciones 78 : 22.

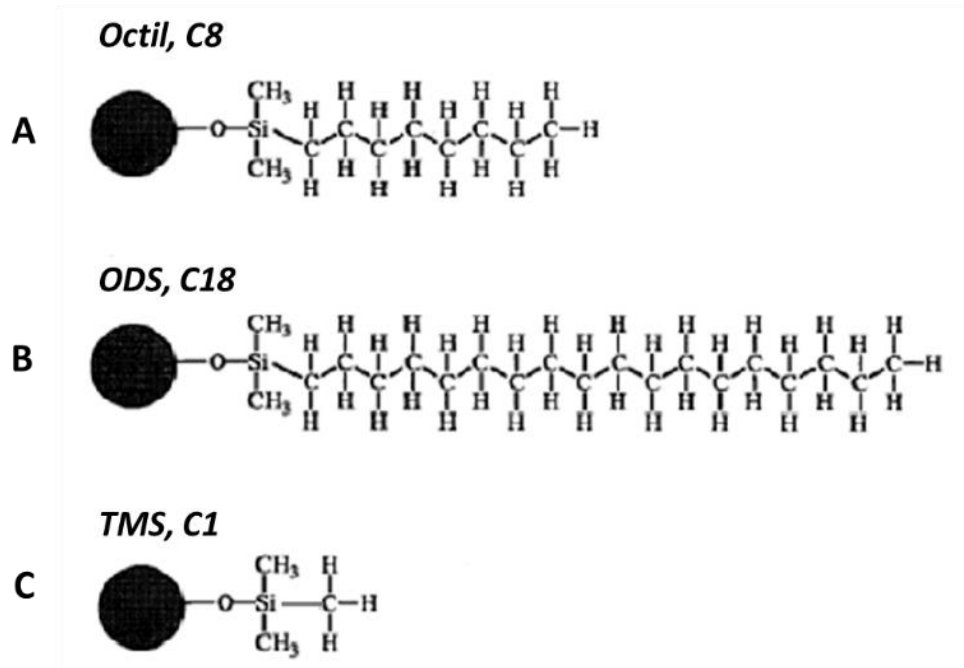


Figura 31. "Empaques comúnmente utilizados en la cromatografía de fase reversa" Adaptado de: (Snyder et al., 2011)

Una de las variables más importantes que se tuvieron en cuenta durante el desarrollo del método fue el pH. El paracetamol es un ácido débil por lo que, dependiendo del pH del medio, se puede encontrar ya sea en su forma ionizada o en la no ionizada. Para llevar a cabo el análisis cromatográfico es preferible tener sólo una entidad química en la muestra, por lo que el pH de trabajo debe seleccionarse teniendo en cuenta esa consideración. De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach, si el pH es igual al pK<sub>a</sub> de la molécula, esta se encontrará 50 % en su forma ionizada y 50 % en su forma no ionizada, por lo que se debe elegir un pH de trabajo de al menos 2 unidades por debajo o por encima de ese valor. El pK<sub>a</sub> del paracetamol es 9.5, y el pH seleccionado fue de 3.

La longitud de onda fijada en el detector para el análisis fue 254 nm, valor en el cual el paracetamol presenta su pico absorción máxima.

Para normalizar los resultados obtenidos de la respuesta analítica del cromatografo se utilizó el método del patrón o del estándar interno. La normalización de los datos se lleva a cabo mediante la relación de las respuestas obtenidas (respuesta analito / respuesta estándar interno). El estándar interno debe ser un compuesto que pueda resolverse completamente de los picos adyacentes, que no esté presente en la muestra problema y que no produzca ningún efecto interferente (Dong, 2006). El 2-acetamidofenol cumplió con todas las características anteriormente mencionadas, es por ello que fue seleccionado como estándar interno.

Otro elemento crucial durante el desarrollo del método fue el diseño de la curva de calibración. La determinación del intervalo de concentraciones depende principalmente de la dosis, la vía de administración y la forma farmacéutica, así como de los objetivos del estudio. Se decidió tomar como referencia a las concentraciones mínimas y a las máximas obtenidas en los perfiles de concentración-tiempo del paracetamol de un estudio farmacocinético (Granados-Soto et al., 1992) que se realizó bajo las mismas condiciones de dosis y de administración. Sin embargo, como el objetivo de este estudio era la evaluación de una posible interacción farmacocinética, se incrementó el intervalo de concentraciones de la curva.

La NOM-177-SSA1-2013 recomienda al menos 5 puntos de concentración para la curva y 3 concentraciones control (una baja, una media y un alta) que deben estar dentro del intervalo de concentraciones de trabajo, pero ser diferentes a los puntos de concentración que constituyen la curva. Dicha información se encuentra en las tablas 4 y 5.

Las muestras de plasma obtenidas durante el estudio no pueden analizarse directamente en el cromatógrafo por lo que se deben someter a un tratamiento previo que permita la extracción del fármaco de la matriz biológica. La extracción del paracetamol se hizo con MeOH, ya que la afinidad química que presenta por éste, es mucho mayor que la que tiene con los compuestos endógenos de la matriz. La centrifugación permitió la separación del paracetamol disuelto en el MeOH (sobrenadante) de las proteínas presentes en el plasma (pellet). De tal forma que lo que se inyectó al cromatógrafo fue un volumen constante de 100  $\mu$ L del sobrenadante.

La validación de los métodos analíticos empleados en los estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad, son de gran importancia ya que es la evidencia documentada que garantiza la confiabilidad de los resultados obtenidos a través de dichas metodologías. La NOM-177-SSA1-2013 es la disposición regulatoria en México que establece, entre otras cosas, los parámetros y criterios de validación de las metodologías analíticas utilizadas en este tipo de estudios.

En este caso, los parámetros de validación evaluados fueron la selectividad, la linealidad, el límite inferior de cuantificación, la precisión y la exactitud.

Un método es susceptible a interferencias que representan errores en la respuesta analítica del cromatógrafo, por ello es importante evaluar la selectividad. La metodología desarrollada cumplió con el criterio de selectividad, ya que al evaluarse la matriz biológica sola y la adicionada con el paracetamol y el 2-acetamidofenol, no hubo interferencia de los compuestos endógenos del plasma correspondientes a sus tiempos de retención (tabla 7). Debido a que las ratas solo fueron tratadas con el paracetamol y con la curcumina, la evaluación de selectividad sólo se realizó con esos 2 compuestos y con el E.I.

Para la linealidad se evaluaron 6 curvas de calibración y se determinó el coeficiente  $R^2$ , el método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 2 a 32  $\mu\text{g/mL}$ . La respuesta medida para el método estuvo definida como la relación de las alturas del paracetamol (analito) y del 2-acetamidofenol (estándar interno). La linealidad del método garantiza que la respuesta obtenida es proporcional a la concentración, de tal forma que la curva puede ser ajustada por el método de mínimos cuadrados para obtener una ecuación que puede emplearse para el cálculo de las concentraciones de las muestras mediante una simple interpolación. Por otro lado, es importante reportar el intervalo en el que el método es lineal, ya que aplica la ley espectrofotométrica de Lambert y Beer.

Conocer el límite inferior de cuantificación de la metodología nos permite conocer la menor concentración en la que la respuesta analítica obtenida sigue siendo precisa y exacta, y, en consecuencia, confiable. Muestras que estén debajo del límite inferior de cuantificación deben ser cuidadosamente interpretadas. El límite inferior de

cuantificación del método fue de  $1\ \mu\text{g/mL}$  (tabla 8), el cual cumple perfectamente con el objetivo para el cual fue diseñado el método.

Finalmente, los últimos parámetros de validación evaluados fueron la precisión y la exactitud de la metodología. En la figura 32 se muestra la diferencia entre estos 2 conceptos. La precisión puede evaluarse con repetibilidad (intra-análisis) y reproducibilidad (inter-análisis) y la exactitud se evalúa con el porcentaje de recuperación, utilizando como referencia el valor nominal de las concentraciones control. En ambos casos, el análisis estadístico se realiza con los valores obtenidos de las concentraciones de las muestras control bajas, medias y altas. El método cumplió con los criterios de aceptación establecidos en la NOM-177-SSA-2013.

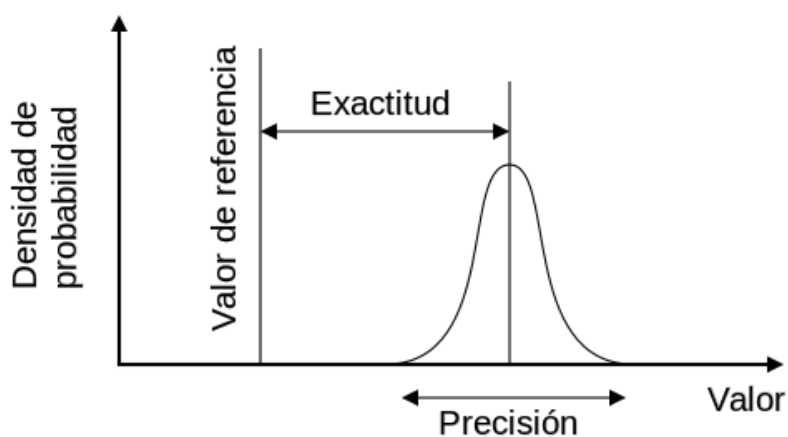


Figura 32. “Precisión y exactitud” Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Precision\\_y\\_exactitud](https://es.wikipedia.org/wiki/Precision_y_exactitud)

En la versión actualizada de la norma, el recobro absoluto (la comparación entre la respuesta obtenida en la matriz biológica y la obtenida en solución) ya no es considerado como uno de los parámetros que se deben reportar. Sin embargo, es importante mencionar que el porcentaje de recobro si se evaluó y fue del 98 %.

El paracetamol es un analgésico ampliamente utilizado alrededor del mundo. En los últimos años la investigación sobre este agente ha estado enfocada principalmente en incrementar su efecto farmacológico y disminuir sus efectos adversos como la hepatotoxicidad y el daño renal. La asociación entre el paracetamol y la curcumina

parece ser una buena alternativa para mejorar el efecto analgésico del paracetamol. Sin embargo, debe considerarse que la coadministración de medicamentos también puede incrementar el riesgo de toxicidad.

La farmacocinética estudia la concentración de los fármacos en el organismo con respecto al tiempo, su importancia radica en que la información obtenida tras este tipo de estudios generalmente se puede correlacionar con los efectos terapéuticos y tóxicos de los fármacos. Por ello, entender y aplicar los conceptos farmacocinéticos resulta muy útil para el manejo terapéutico de los mismos (Caterina et al., 2013).

Actualmente, son muchos los reportes preclínicos y clínicos que se han realizado con la finalidad de poder caracterizar y entender los procesos farmacocinéticos del paracetamol. En humanos la farmacocinética del paracetamol es lineal con respecto a la dosis en el intervalo de 0.5 a 8 g/día (Gelotte et al., 2007; Slattery et al., 1987), en el caso de las ratas la linealidad se presenta en dosis desde 25 a 400 mg / kg (Watari et al., 1983). En ambos casos su absorción y eliminación son de primer orden (Chiou & Barve, 1998).

En la figura 28 se muestran graficados los resultados de todos los perfiles cinéticos y el promedio de cada tratamiento (paracetamol sólo o con administración previa de curcumina). En los perfiles que se encuentran graficados en escala semi-logarítmica (figura 28 B y 28 D), se logra apreciar una línea recta con pendiente negativa durante la fase de eliminación. Esa línea corresponde con un proceso de eliminación de primer orden en el que se elimina una fracción constante del paracetamol por unidad de tiempo. La curcumina parece no modificar el orden cinético de la fase de eliminación del paracetamol.

Los estudios de biodisponibilidad arrojan información sobre la absorción de los fármacos. Para analizar el efecto de la curcumina sobre la biodisponibilidad del paracetamol se evaluaron los parámetros de la figura 29. El análisis de los datos farmacocinéticos se realizó mediante un análisis no-compartimentar (NCA).

Los resultados específicos del NCA son el área bajo la curva de concentración-tiempo (ABC), que describe el grado de la exposición sistémica al fármaco, así como, la

concentración máxima observada ( $C_{max}$ ) y el tiempo en que esta se alcanza ( $t_{max}$ ), que indican la velocidad de absorción del fármaco (Bulitta & Holford, 2008).

En la tabla 10 se muestra el promedio  $\pm$  D.E. de los resultados obtenidos para cada tratamiento. Para la comparación de ambos grupos se aplicó la prueba estadística de *t* de Student. Los resultados se consideran significativamente diferentes cuando el valor de "p" es menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ),

La curcumina es considerada como un alimento y la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal puede impactar significativamente en los perfiles de las vías de tránsito y el pH del medio, en consecuencia es muy probable que los alimentos afecten la absorción de los fármacos (Charman et al., 1997). Por otro lado, está reportado que existe una relación entre la ingesta de comida y el vaciamiento gástrico (Mourot et al., 1988), esta información es importante porque la absorción del paracetamol depende de dicho mecanismo (Heading et al., 1973). Por ello, al inicio de este trabajo se planteó que la curcumina podría modificar la absorción del paracetamol. Sin embargo, los resultados obtenidos para ambos tratamientos no muestran diferencia significativa en los parámetros evaluados.

El esquema de administración de los fármacos se realizó de la misma manera en que se efectuaron los estudios previos de interacción farmacodinámica en los que se caracterizó el efecto analgésico sinérgico de las combinaciones de la curcumina con otros AINEs (De Paz-Campos et al., 2014). Es decir, se administró una dosis efectiva 30 de curcumina ( $DE_{30} = 30 \text{ mg / kg}$ ) 30 minutos previos a la administración del agente analgésico, en este caso el paracetamol.

De esta forma se pueden tratar de describir 2 situaciones. La primera, la dosis de curcumina (30 mg/kg) con respecto a la administrada de paracetamol (178mg/kg) no es tan significativa como para tener efectos locales sobre la absorción del mismo. Hay estudios de interacción farmacocinética entre la curcumina y otros fármacos en los que ni siquiera la administración previa de dosis mayores a los 200mg/kg de curcumina tuvieron efecto importante en los parámetros evaluados (Ching et al., 2001; Maiti et al., 2007). La segunda situación es que el tiempo entre la administración de la curcumina y



la del paracetamol fue de 30 minutos, es probable que en ese tiempo la curcumina haya alcanzado el epitelio intestinal e incluso se hubiera absorbido previo a la llegada del paracetamol.

Por otro lado, el paracetamol es biotransformado por la UGT y metabolizado a un intermediario reactivo citotóxico (NAPQI) por el CYP2E1, posteriormente, la inactivación del NAPQI se lleva a cabo por la acción de la GST (figura 10). Hay evidencia que demuestra que la curcumina puede regular tanto la expresión como la función de dichas proteínas, por lo que su administración podría influir sobre la eliminación del paracetamol.

El aclaramiento (Cl) es el parámetro que nos permite estudiar la fase de eliminación de un fármaco. De los parámetros evaluados, el ABC es el que mantiene una relación inversa con el aclaramiento (Cl), por lo que su valor puede brindarnos información indirecta sobre la eliminación del paracetamol. El grupo tratado sólo con paracetamol presentó un ABC menor con respecto a la obtenida con el grupo tratado con ambos agentes. Si bien es cierto que la diferencia no es significativa desde el punto de vista estadístico, en las gráficas promedio si se puede apreciar que la exposición al paracetamol es ligeramente mayor en el segundo grupo (figura 28C). Si se tiene en cuenta que la velocidad de absorción evaluada con la  $C_{max}$  y el  $t_{max}$  prácticamente fue la misma en los 2 grupos, ese pequeño incremento en la exposición se puede deber a una disminución en la eliminación del paracetamol. Sin embargo, para llegar a una conclusión válida al respecto se debe evaluar el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), y para ello es necesario conocer la constante de eliminación ( $k_e$ ) la cual a su vez se define como la relación entre el Cl y volumen de distribución (Vd), los cuales no pueden ser estimados con precisión tras una administración oral si no se conoce el valor de la biodisponibilidad absoluta del paracetamol (F).

El diseño de este estudio permitió evaluar el efecto agudo de la administración de una dosis única de curcumina sobre la biodisponibilidad del paracetamol. Bajo estas condiciones el efecto de la curcumina no fue significativo. Sin embargo, hay estudios en los que se reportan interacciones farmacocinéticas entre la curcumina y otros fármacos que ocurren cuando la exposición a la misma ha sido crónica. Así, la curcumina modificó

la cinética de glimepirida, un antidiabético, únicamente cuando a las ratas se les administraron dosis diarias de 80 mg/kg de curcumina durante 8 días (Rani et al., 2012).

Finalmente, los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado por Volak y colaboradores en 2013, en el que la administración previa de curcumina no tuvo influencia sobre la biodisponibilidad del paracetamol. El estudio se realizó en voluntarios sanos y se administraron 4 g de curcumina antes de la administración de 325mg del paracetamol (Volak et al., 2013).

## **8. Conclusiones**

Se desarrolló un método analítico que permite la cuantificación de paracetamol en plasma de rata.

La metodología analítica desarrollada cumple con los criterios de validación descritos en la normatividad mexicana: NOM-177-SSA1-2013.

La administración de una dosis única de 30mg/kg de curcumina no modifica significativamente la biodisponibilidad del paracetamol en ratas.

Los resultados obtenidos en los parámetros de biodisponibilidad sugieren que la administración combinada de ambos agentes, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, es segura.

## **9. Perspectivas**

Se pueden realizar más estudios de interacción con la finalidad de caracterizar todos los parámetros farmacocinéticos, además sería recomendable probar diferentes dosis y evaluar el efecto de la exposición crónica a la curcumina.

## 10. Referencias

- Aggarwal, B. B., D, I., Ichikawa, H., Ahn, K. S., Sethi, G., Sandur, S. K., . . . Shishodia, S. (2007). Curcumin-Biological and Medicinal Properties. *Turmeric: the genus Curcuma*, 297-368.
- Aggarwal, B. B., Kumar, A., Aggarwal, M. S., & Shishodia, S. (2005). Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*, 23, 351-387.
- Ameer, B., & Greenblatt, D. J. (1977). Acetaminophen. *Annals of internal Medicine*, 87(2), 202-209.
- Anderson, B. J. (2008). Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*, 18(10), 915-921.
- Avdeef, A. (2012). *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state*: John Wiley & Sons.
- Basu, N. K., Kole, L., Basu, M., McDonagh, A. F., & Owens, I. S. (2007). Targeted inhibition of glucuronidation markedly improves drug efficacy in mice—A model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(1), 7-13.
- Bauer, L. A. (2001). *Applied clinical pharmacokinetics*: McGraw-Hill New York:.
- Brunton, L. L., Chabner, B., & Knollmann, B. C. (2011). *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* (Vol. 12): McGraw-Hill Medical New York.
- Bulitta, J. B., & Holford, N. H. (2008). Non-Compartmental Analysis. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials*.
- Ciolino, H. P., Daschner, P. J., Wang, T. T., & Yeh, G. C. (1998). Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 197-206.
- Coleman, M. D. (2010). *Human Drug Metabolism: An Introduction*: John Wiley & Sons.
- Corradini, D. (2016). *Handbook of HPLC*: CRC Press.
- Cozza, K. L., Armstrong, S. C., Oesterheld, J. R., Benedek, D. M., & Smith, B. (2006). *Principios de interacción farmacológica para la práctica médica: Citocromo P450, UGT, Glucoproteínas P*: Arsenal Medica.
- Crofford, L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 49, 15-19.
- Cronberg, S., Wallmark, E., & Söderberg, I. (1984). Effect on platelet aggregation of oral administration of 10 non-steroidal analgesics to humans. *Scand Journal of Haematology*, 33(2), 155-159.
- Chainani-Wu, N. (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 9(1), 161-168.
- Charman, W. N., Porter, C. J., Mithani, S., & Dressman, J. B. (1997). Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), 269-282.
- Ching, H., Tsai, S.-Y., Hsiu, S.-L., Wu, P.-P., & Chao, P.-D. L. (2001). Effect of curcumin on theophylline pharmacokinetics in rabbits. *Journal of Chinese Medicine*, 12, 51-59.
- Chiou, W. L., & Barve, A. (1998). Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats. *Pharmaceutical Research*, 15(11), 1792-1795.
- Davis, D. C., Potter, W. Z., Jollow, D. J., & Mitchell, J. R. (1974). Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sciences*, 14(11), 2099-2109.
- De Cos, M. (2003). Interacciones de fármacos y sus implicaciones clínicas. *Flórez J. Farmacología Humana. Ed. Masson*, 3, 165-176.

- De Paz-Campos, Antonio, M., Chávez-Piña, A. E., Ortiz, M. I., & Castañeda-Hernández, G. (2012). Evidence for the participation of ATP-sensitive potassium channels in the antinociceptive effect of curcumin. *The Korean Journal of Pain*, 25(4), 221-227.
- De Paz-Campos, Antonio, M., Chávez-Piña, A. E., Ortiz, M. I., & Castañeda-Hernández, G. (2014). Synergistic effect of the interaction between curcumin and diclofenac on the formalin test in rats. *Phytomedicine*, 21(12), 1543-1548.
- Del Arco, C. (1997). Metabolismo de los fármacos. *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson SA Barcelona, España, 73-85.
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*: John Wiley & Sons.
- Dressman, J. B., & Reppas, C. (2016). *Oral drug absorption: Prediction and assessment* (Vol. 193): CRC Press.
- Esteve, E. (2008). Analgésicos: clasificación y uso. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 27(8), 68-74.
- Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2001). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications* (Vol. 1): CRC Press.
- Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2012). Non-compartmental analysis. *Computational Toxicology: Volume I*, 377-389.
- Gelotte, C., Auiler, J., Lynch, J., Temple, A., & Slattery, J. (2007). Disposition of acetaminophen at 4, 6, and 8g/day for 3 days in healthy young adults. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(6), 840-848.
- Girona Brumós, L. (2013). *Introducción a las Interacciones Farmacológicas*.
- Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A., & Scott, K. F. (2013). The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*, 21(3), 201-232.
- Granados-Soto, V., Flores-Murrieta, F., López-Muñoz, F., Salazar, L., Villarreal, J., & Castañeda-Hernández, G. (1992). Relationship between paracetamol plasma levels and its analgesic effect in the rat. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44(9), 741.
- Hahn, T., Mogensen, T., Lund, C., Jacobsen, L., Hjortsoe, N. C., Rasmussen, S., & Rasmussen, M. (2003). Analgesic effect of iv paracetamol: possible ceiling effect of paracetamol in postoperative pain. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 47(2), 138-145.
- Hansten, P. D., & Horn, J. (2007). *The Top 100 Drug Interactions: A guide to patient management*. 2007 Edition. *Freeland, WA: H&H Publications, LLP*, 235-236.
- Heading, R. C., Nimmo, J., Prescott, L., & Tothill, P. (1973). The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *British Journal of Pharmacology*, 47(2), 415-421.
- Holford, N., & Yim, D.-S. (2016). Volume of Distribution. *Translational and Clinical Pharmacology*, 24(2), 74-77.
- Horváth, C. (2013). *High-performance liquid chromatography: advances and perspectives*: Elsevier.
- Hou, X.-L., Takahashi, K., Kinoshita, N., Qiu, F., Tanaka, K., Komatsu, K., . . . Azuma, J. (2007). Possible inhibitory mechanism of Curcuma drugs on CYP3A4 in 1 $\alpha$ , 25 dihydroxyvitamin D 3 treated Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1), 169-177.
- Ito, K., Iwatsubo, T., Kanamitsu, S., Ueda, K., Suzuki, H., & Sugiyama, Y. (1998). Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 387-412.
- Jambhekar, S. S., & Breen, P. J. (2009). Basic pharmacokinetics.
- Ji, H.-F., & Shen, L. (2014). Can improving bioavailability improve the bioactivity of curcumin? *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(6), 265-266.
- Juan, H., Terhaag, B., Cong, Z., Bi-Kui, Z., Rong-Hua, Z., Feng, W., . . . Wen-Xing, P. (2007). Unexpected effect of concomitantly administered curcumin on the pharmacokinetics of talinolol in healthy Chinese volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 63(7), 663-668.

- Kalant, H., Grant, D. M., & Mitchell, J. (2007). *Principles of medical pharmacology*: WB Saunders Company Canada Limited.
- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B. P., & Mukherjee, P. K. (2007). Curcumin–phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 330(1), 155-163.
- Manolova, Y., Deneva, V., Antonov, L., Drakalska, E., Momekova, D., & Lambov, N. (2014). The effect of the water on the curcumin tautomerism: a quantitative approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 815-820.
- Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 165-175.
- Mouroit, J., Thouvenot, P., Couet, C., Antoine, J., Krobicka, A., & Debry, G. (1988). Relationship between the rate of gastric emptying and glucose and insulin responses to starchy foods in young healthy adults. *The American journal of clinical nutrition*, 48(4), 1035-1040.
- Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J. N., Samhoedi, R., & Vermeulen, N. P. (1996). Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 51(1), 39-45.
- Pang, K. S., Taburet, A. M., Hinson, J. A., & Gillette, J. R. (1979). High-performance liquid chromatographic assay for acetaminophen and phenacetin in the presence of their metabolites in biological fluids. *Journal of Chromatography*, 174(1), 165-175.
- Potter, D. W., & Hinson, J. A. (1987). The 1-and 2-electron oxidation of acetaminophen catalyzed by prostaglandin H synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3), 974-980.
- Rani, T. S., Sujatha, S., & Veeresham, C. (2012). Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of curcumin with glimepiride in normal and diabetic rats. *Pharmacog commun*, 2(3), 14-21.
- Rosenbaum, S. E. (2012). *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: An integrated textbook and computer simulations*: John Wiley & Sons.
- Rowland, M., & Tozer, T. N. (2005). *Clinical pharmacokinetics/pharmacodynamics*: Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia.
- Said, S. A., & Sharaf, A. A. (1981). Pharmacokinetics of diclofenac sodium using a developed HPLC method. *Arzneimittelforschung*, 31(12), 2089-2092.
- Shargel, L., Wu-Pong, S., & Yu, A. B. (2007). *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*: McGraw-Hill.
- Sharma, R. A., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease* (pp. 453-470): Springer.
- Slattery, J. T., Wilson, J. M., Kalhorn, T. F., & Nelson, S. D. (1987). Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 41(4), 413-418.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*: John Wiley & Sons.
- Soysa, P., & Kolambage, S. (2010). Rapid HPLC/UV method for analysis of urinary and plasma/serum paracetamol concentrations. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 38(2).
- Thapliyal, R., & Maru, G. (2001). Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 39(6), 541-547.
- Tomlin, M. (2010). *Pharmacology & Pharmacokinetics: A Basic Reader*: Springer Science & Business Media.
- Valentine, S. P., Le Nedelec, M. J., Menzies, A. R., Scandlyn, M. J., Goodin, M. G., & Rosengren, R. J. (2006). Curcumin modulates drug metabolizing enzymes in the female Swiss Webster mouse. *Life sciences*, 78(20), 2391-2398.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231(25), 232-235.

- Volak, L. P., Hanley, M. J., Masse, G., Hazarika, S., Harmatz, J. S., Badmaev, V., . . . Court, M. H. (2013). Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(2), 450-462.
- Wahlström, B., & Blennow, G. (1978). A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 43(2), 86-92.
- Watari, N., Iwai, M., & Kaneniwa, N. (1983). Pharmacokinetic study of the fate of acetaminophen and its conjugates in rats. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 11(3), 245-272.
- Xu, L., Li, Z., & Guo, F. (2013). Curcumin improves expression of ghrelin through attenuating oxidative stress in gastric tissues of streptozotocin-induced diabetic gastroparesis rats. *European Journal of Pharmacology*, 718(1), 219-225.
- Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2012). Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 17(1), 71-80.
- Yu, D. K. (1999). The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 39(12), 1203-1211.
- Zhang, W., Tan, T. M. C., & Lim, L.-Y. (2007). Impact of curcumin-induced changes in P-glycoprotein and CYP3A expression on the pharmacokinetics of peroral celiprolol and midazolam in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(1), 110-115.