

Mtra. María Elena Contreras Garfias
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	23	11	2020		4	11	2020

Datos del Alumno

Nombre : Kenia Izel Galan Hernandez	
Matrícula : 2153060203	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Primera cerrada de Cuauhtémoc #12, Ayotla, 56560 Ixtapaluca, Estado de México.	
Teléfono : 5573154337	Celular : 5560364635
Correo Electrónico : kenygalan0306@gmail.com	CURP : GAHK970603MMCLRN02

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Metformina con cúrcuma y té verde por HPLC y UV en tabletas recubiertas							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : UAM -X, Edificio N. Laboratorio 107 Control de Calidad.							
Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad : Villa Quietud						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	16	12	2019		16	6	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.-Educativo	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 10.- Otros	

FIRMAS

Leticia Ortega Almanza No.Económico 35538

María Luisa Vázquez Ramírez No.Económico 13752

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

Kenia Izel Galan Hernandez

Alumno
 Nombre, firma

Vo. Bo. de la Comisión
 Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México 18 de Noviembre de 2020

ASUNTO: CARTA DE LIBERACIÓN DE SERVICIO SOCIAL

Dr. J. Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

PRESENTE

Por este medio me permito comunicar a usted que la alumna **KENIA IZEL GALAN HERNANDEZ**, con número de matrícula **2153060203**, de la carrera de **QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**; realizó el Servicio Social en el Laboratorio 107 de Control de Calidad ubicado en el Edificio N de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con el proyecto titulado: *“Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Metformina con cúrcuma y té verde por HPLC y UV en tabletas recubiertas”* bajo la asesoría de la **M. en C. Leticia Ortega Almanza** con No.económico 35538 y la **M en C. María Luisa Vázquez Ramírez** con No.económico 13752, como asesores internos.

El alumno realizó el servicio social en el periodo del día **16 de Diciembre del 2019** al **16 de Junio de 2020**; cubriendo un total de **480 horas**.

Por lo que solicito su apoyo para los tramites de liberación correspondientes .

Saludos cordiales.



Nombre y firma de asesor

M. en C. Leticia Ortega Almanza

No. Económico 35538



Nombre y firma de asesora

M. en C. María Luisa Vázquez Ramírez

No. Económico 13752



Alumna: Kenia Izel Galan Hernandez

No. Matricula 2153060203

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Laboratorio 107 Control de Calidad, Edificio N.

Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicio

Calzada del Hueso No110, Col.Villa Quietud Alcaldía, Coyoacán, CDMX CP 04960.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL

“Evaluación de productos relacionados con la
salud”

Etapa: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control
físico, químico, biológico y o microbiológico de productos
relacionados con la salud

Título: Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de
Metformina con cúrcuma y té verde por HPLC y UV en tabletas recubiertas

Alumna: Kenia Izel Galán Hernández

Matricula: 2153060203

Asesores: MCF. Leticia Ortega Almanza

No. económico: 35538

M en C. María Luisa Vázquez Ramírez

No. económico: 13752

Lugar de realización: UAM -X, Edificio N. Laboratorio 107 Control de Calidad.
Fecha de inicio y terminación: 16 de diciembre de 2019 al 16 junio de 2020

Mexico, CDMX a 04 de noviembre 2020



Casa abierta al tiempo

ÍNDICE

Introducción.....	3
Planteamiento del problema	5
Marco teórico	
- Diabetes mellitus.....	6
- Clorhidrato de Metformina	7
- Cromatografía de líquidos de alta resolución	8
- Validación de métodos analíticos	10
Objetivos	12
Desarrollo experimental	
- Material y equipo	12
- Desarrollo del método espectrofotométrico	13
- Desarrollo del método cromatográfico	14
Resultados y análisis de resultados.....	16
Discusión.....	24
Objetivos y metas alcanzadas.....	25
Conclusión	25
Referencias bibliográficas.....	26
Resumen.....	30



INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas que se presentan en consecuencia de un efecto hiperglucémico provocado por un defecto en la secreción de la insulina y/o su acción en el cuerpo humano. La diabetes mellitus tipo 1 tanto como tipo 2 ha ido aumentando en todo el mundo, sin embargo, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se presenta en mayor medida entre 90 a 95% de las personas que padecen esta enfermedad. Este trastorno es caracterizado por dos procesos, los cuales son la resistencia de tejidos a la acción de insulina y una disfunción de insulina¹.

El fármaco ampliamente utilizado en la actualidad para el tratamiento de la DM2 es la metformina, este fármaco es un agente hipoglucemiante perteneciente a la familia de las biguanidas. Su mecanismo de acción es sobre el hígado, musculo y adipocitos, aun cuando esta carece de efecto directo sobre las células β pancreáticas y no influye en la secreción de insulina directamente, es capaz de disminuir los niveles de glucosa en la sangre mediante el decremento de la producción hepática de glucosa, disminuyendo la absorción intestinal de la glucosa, y mejorando la sensibilidad a la insulina mediante el aumento de la captación de glucosa periférica y su utilización².

Un método analítico se define como el conjunto de técnicas y parámetros que se deben cumplir, para medir un componente específico en una muestra, este debe ser confiable para cumplir con un propósito definido. Los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de uno o más fármacos en un producto farmacéutico deben de asegurar su eficacia y seguridad, por tanto, es necesario garantizar que todos los métodos analíticos empleados estén validados³.

En la industria farmacéutica en México, los estudios de validación se han llevado a cabo como parte de una actividad necesaria y fundamental para una eficiente producción y aseguramiento de la calidad del medicamento. La validación del

método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido y documentado, con estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en textos oficiales como la NOM-059-SSA 1-2015 son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez.

Los métodos de espectrofotometría UV-visible y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) son dos de los métodos analíticos más utilizados actualmente en la industria farmacéutica para la cuantificación e identificación de productos relacionados con la salud. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla mediante una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones químicas reteniendo el compuesto de interés, mientras que la espectrofotometría UV-visible es un método utilizado para medir cuánta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra, con base en la ley de Beer-Lambert⁴.

La cuantificación de la Metformina en tabletas consultado en la monografía oficial de la FEUM 12^{va} edición tanto en su valoración como en estudios de disolución aparece reportada mediante espectrofotometría UV-visible. En este trabajo se describe el desarrollo de la metodología analítica y su validación para la determinación de metformina en tabletas por HPLC-UV y el método ya descrito por UV-visible, además se evaluará si ambos métodos cumplen con dicha capacidad mediante la prueba de disolución usando tabletas de metformina con cúrcuma y té verde debido a que es una nueva formulación se quiere probar si los métodos validados cumplen con su propósito para este producto en particular.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación de métodos analíticos es parte fundamental para asegurar su confiabilidad en las aplicaciones analíticas deseadas mediante una serie de estudios sistemáticos y documentados, para proveer un alto margen de seguridad de los procesos que se llevan a cabo y la calidad del medicamento⁵.

Los organismos gubernamentales encargados de la regulación farmacéutica en diferentes países han convenido en la necesidad de establecer como requisito fundamental la validación tanto de los procesos de fabricación, como de los métodos analíticos asegurando de forma permanente la calidad de los medicamentos

Es importante destacar que la validez de estos métodos es ampliamente discutible. Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, formulación y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario garantizar que la metodología empleada es confiable para cada producto en particular garantizar su seguridad y eficacia para su posterior aplicación en la industria farmacéutica.



MARCO TEÓRICO

Diabetes Mellitus

La diabetes es una grave enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina (una hormona que regula el nivel de azúcar, o glucosa, en la sangre), o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce⁶.

La diabetes se clasifica en dos grupos: diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) conocida por diabetes insulino-dependiente o juvenil se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se presenta en mayor frecuencia y tiene su origen en la función anormal de las células beta que resulta en una deficiencia relativa de insulina, resistencia a la insulina acompañada de una disminución del transporte de glucosa a las células musculares y grasas, y un aumento de la producción de glucosa hepática, todo lo cual contribuye a la hiperglucemia. Los síntomas característicos son polidipsia, poliuria, polifagia y pérdida de peso sin causa aparente, los cuales pueden tardar varios años en aparecer o en reconocerse⁷.

La DM2 se considera uno de los problemas de salud pública más graves en todo el mundo. Actualmente, según la Federación Internacional de Diabetes (FID), más de 415 millones de personas han sido diagnosticadas con DM2 y se estima que este número podría superar los 640 millones en un futuro⁸. En México, la prevalencia de diabetes ha aumentado constantemente desde al menos en 1993 cuando el 4.0% de la población adulta mexicana había sido diagnosticada con la enfermedad, al 5.8% en 2000, el 7% en 2006 y el 9.2% en 2012. En 2015, el número de personas con diabetes se estimó en 11.5 millones. Además, se ha proyectado que, para 2040, más de 20 millones de personas tendrán la enfermedad en todo el país⁷.



Clorhidrato de metformina

El Clorhidrato de Metformina ha sido un medicamento importante para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (DM2) durante década. Es el agente antihiper glucémico oral más utilizado y actualmente se recomienda como terapia de primera línea para todos los pacientes con DM2 recién diagnosticados⁹.

El nombre IUPAC que recibe el Clorhidrato de Metformina es 1,1-Dimetilbiguanida monoclóridato, normalmente se describe su estructura como una biguanida, pero también se puede decir que posee un grupo amino, dos grupos imina, una amina secundaria y una amina terciaria (Fig 1). En el mercado se encuentra en su forma de sal, Clorhidrato de Metformina, ya que en su síntesis se obtiene un rendimiento mayor y se prefiere por su alta solubilidad en agua¹⁰.

Su mecanismo de acción está mediado por la activación inicial del Clorhidrato de Metformina en la proteína quinasa activada por AMP (AMP-K), provocando un efecto inhibitor sobre la producción de glucosa por las células del hígado. El aumento de la utilización periférica de la glucosa puede ser debido a la mejora de la unión a los receptores de insulina. También aumenta la actividad de la AMP-K en el músculo esquelético. Se sabe que el AMP-K causa el despliegue de GLUT4 a la membrana plasmática, lo que resulta en la captación de glucosa independiente de la insulina¹¹.

La dosis óptima de metformina oral para muchos pacientes diabéticos es de aproximadamente 2 g / día. Después de una dosis oral única, la metformina se distribuye rápidamente a muchos tejidos después de la absorción parcial por el intestino delgado, pero la concentración luminal en el tracto gastrointestinal sigue siendo alta. La concentración plasmática máxima ocurre en 3 horas (aumentando de 1.0 a 1.6 µg / ml con una semi vida plasmática de aproximadamente 20 h. Cerca de 30 a 50 % de una dosis oral es excretada en orina de forma no modificada en 24 h y el 30 % de la dosis es eliminada de forma inalterada en las heces¹².



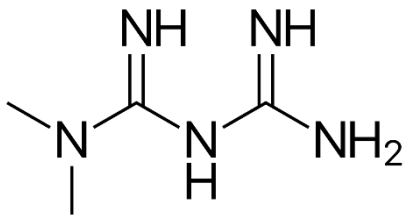


Figura 1. Estructura de El Clorhidrato de Metformina

Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas puede dividirse en cromatografía de gases o cromatografía de líquidos¹³.

El HPLC se denominó originalmente cromatografía líquida de alta presión ya que la alta presión era requerida para permitir que el líquido fluya a través de columnas empaquetadas. Sin embargo, con continuos avances en instrumentación y materiales de embalaje, el nombre se cambió a High Performance Liquid Esta técnica conduce a mejoras en la separación, identificación, purificación y cuantificación de moléculas complejas sobre técnicas previamente conocidas.

Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

- Fase móvil

La fase móvil sirve para transportar la muestra al sistema. Los criterios esenciales de la fase móvil son inercia a los componentes de la muestra. Los solventes pueden ser puros o combinaciones. La fase móvil debe estar libre de impurezas particuladas y desgasificada antes de su uso.

- Depósitos de fase móvil

Estos son contenedores inertes para el almacenamiento y transporte en fase móvil. generalmente son de vidrio transparente para facilitar la inspección visual del nivel de fase móvil dentro del contenedor.

- Sistema de bombeo

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y velocidad constante.

- Inyectores

Los inyectores se utilizan para proporcionar una inyección de volumen constante de muestra en la corriente de fase móvil. La inercia y la reproducibilidad de la inyección son necesarias para mantener un alto nivel de precisión.

- Columna

Es un componente vital para la separación de los componentes. Una columna es un tubo de acero inoxidable empacada con fases estacionadas específicas. El material de empaque y la dimensión de la columna seleccionada dependerá básicamente de la separación que se desee hacer y la naturaleza química del soluto de interés.

- Detector

Un detector da una respuesta específica para los componentes separados por la columna y también proporciona la sensibilidad requerida. Tiene que ser independiente de cualquier cambio en la composición de la fase móvil.

La mayoría de las aplicaciones requieren detección UV-VIS es la detección más popular.

- Adquisición y Control de Datos



Los sistemas HPLC modernos están basados en computadora y el software controla parámetros operativos como composición de fase móvil, temperatura, caudal, volumen y secuencia de inyección y también adquisición y tratamiento de salida.

Estas son las partes principales de un sistema básico de HPLC un equipo más especializado también podría tener válvulas de selección de solvente, desgasificador de vacío, muestreadores automáticos, conmutadores de columna, pre o post derivación de columnas y colectores de fracciones¹⁴.

Es incuestionable que la cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada en la actualidad, las razones de la popularidad de esta técnica son: su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

Validación de métodos analíticos

De acuerdo con NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, definen el termino de validación como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. También se establece que se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de que no se encuentren en la FEUM, se puede consultar cualquier farmacopea internacional .

Para poderse llevar a cabo la validación debe establecerse un protocolo escrito que especifique el procedimiento, los pasos críticos y los criterios de aceptación. Antes de su ejecución, deberá ser revisado por el responsable del proceso o sistema y



aprobado finalmente por el responsable de la Unidad de Calidad y el responsable sanitario.

La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y especificidad, además de proporcionar una medida del comportamiento del método.

- **Linealidad:** Es la capacidad del sistema para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método.
- **Precisión:** Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí.
- **Repetibilidad:** Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto.
- **Reproducibilidad:** Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad.
- **Exactitud:** Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.
- **Selectividad (especificidad):** Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra¹⁵.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de metformina con cúrcuma y té verde por HPLC y UV-Vis en tabletas recubiertas.

Objetivos específicos

- Validar el método analítico para la cuantificación de metformina por HPLC y UV-Vis
- Elaborar tabletas recubiertas de Metformina con cúrcuma y té verde.
- Evaluar el perfil de disolución de las tabletas recubiertas de Metformina con cúrcuma y té verde por el método desarrollado de HPLC.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

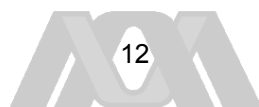
Material y equipo

Equipo

- Espectrofotómetro (Modelo)
- HPLC (Modelo)
- Balanza analítica (Modelo)
- Columna tipo
- Sistema de filtración. Millipore
- Equipo de sonicación y desgasificación
- Potenciómetro. (Modelo)

Material

- Membrana filtrante 0.45 μm
- Matraces volumétricos de 5,10,50,100 mL.
- Micropipeta 100-1000 μL
- Papel Filtro Whatman # 40



Reactivos

- Tabletas de Metformina 850 mg marca comercial AURAX®
- Metformina estándar
- Fosfato de amonio monobásico
- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Agua desionizada

Desarrollo del método espectrofotométrico

- Preparación de la curva de calibración de la solución estándar

Pesar 25 mg de metformina estándar y llevarlos a un matraz volumétrico de 100 mL se agregaron 50 mL de agua, se sometió a sonificación durante 10 min a temperatura ambiente para su completa disolución, posteriormente se llevó al aforó con agua. A partir de esta solución patrón se preparó una curva de calibración con 5 diluciones en un rango de concentración de 4 a 12 $\mu\text{g/mL}$ (Fig 2).

- Preparación de la Muestra

Se pesaron 10 tabletas de metformina, se calculó el peso promedio, se trituró hasta polvo fino y se pesó una cantidad del polvo equivalente a 25 mg de metformina, se llevó a un matraz volumétrico de 100 mL y se adicionaron 50 mL de agua, se sometió a sonificación por 10 min a temperatura ambiente hasta su completa disolución, se aforo con agua y se filtró, los primeros 20 mL del filtrado se desecharon. Se preparó una curva de esta solución patrón al igual que se indicó para el estándar (Fig 2).

Procedimiento para la validación

- Linealidad del sistema y método

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs absorbancia) utilizando las 5 diluciones con un rango de concentración de 4 a 12 $\mu\text{g/mL}$ como se muestra en la Figura 2 preparadas a partir de la solución patrón del estándar de metformina para la linealidad del sistema, y la solución patrón de la muestra para la linealidad del método. El análisis se hizo por triplicado para cada

dilución. Finalmente se leyeron las diluciones de la muestra y estándar en el espectrofotómetro a 232 nm utilizando agua como blanco.

- Precisión del sistema y método

La precisión se determinó preparando 10 soluciones con la concentración del punto medio de la curva (8 µg/mL) del estándar metformina para el sistema y de la muestra de metformina para el método.

- Exactitud y Repetibilidad

La exactitud y la Repetibilidad se evaluaron con 10 repeticiones, los parámetros calificados fueron IC para la media poblacional y el CV del porcentaje de recobro.

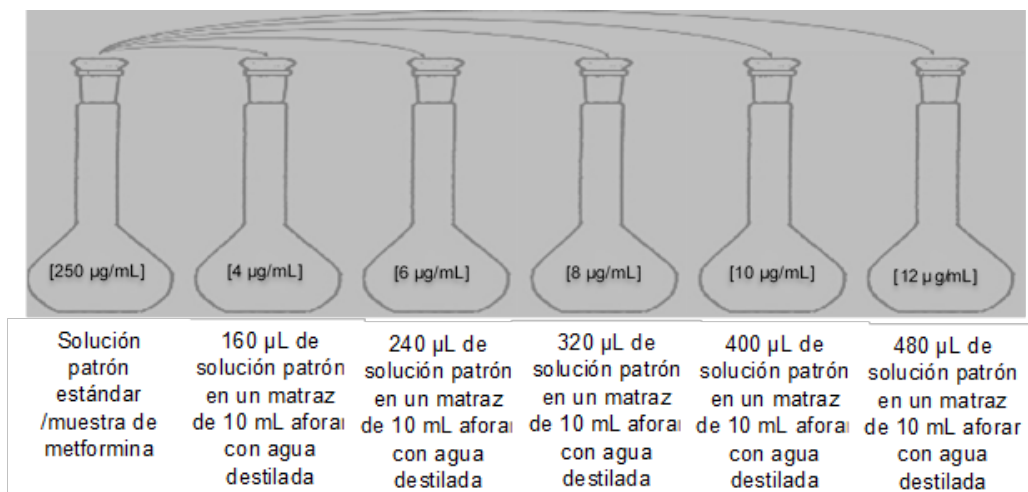


Fig 2. Preparación de curva de calibración estándar y muestra de metformina

Desarrollo del método por HPLC

- Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo con detector UV- Visible a una longitud de onda 264 nm con una columna 25 cm x 4.6 mm (L9: Gel de sílice totalmente porosa e irregular de 10 µm con una cubierta enlazada químicamente de un intercambiador catiónico fuertemente ácido). La fase móvil consistió en una mezcla de ACN: fosfato monobásico de amonio, 70:30, se ajustó a un pH 3 y se utilizó una velocidad de flujo de 1ml/mn.

La duración de la corrida fue de 6 minutos con un tiempo de retención esperado para la metformina de 3.100 – 3.133 min. Después de cada corrida se utilizó una mezcla ACN-Agua (60/40) para lavar la columna.

- Preparación de la curva de calibración de la solución estándar

Pesar 25 mg de metformina estándar y llevarlos a un matraz volumétrico de 50 mL se agregaron 25 mL de agua grado HPLC, se sometió a sonificación durante 10 min a temperatura ambiente para su completa disolución, posteriormente se aforó con ACN y se pasó por una membrana filtrante de 0.45 μ m. A partir de esta solución patrón se preparó una curva de calibración con 5 diluciones en un rango de concentración de 40 a 120 μ g/mL (Fig 3).

- Preparación de la Muestra

Se utilizó el polvo fino obtenido de las tabletas de metformina y se pesó una cantidad del polvo equivalente a 25 mg de metformina, se llevó a un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionaron 25 mL de agua grado HPLC, se sometió a sonificación por 10 min a temperatura ambiente hasta su completa disolución, se aforó con ACN y se filtró utilizando la membrana de 0.45 μ m. Se preparó una curva de esta solución patrón al igual que se indicó para el estándar (Fig 3).

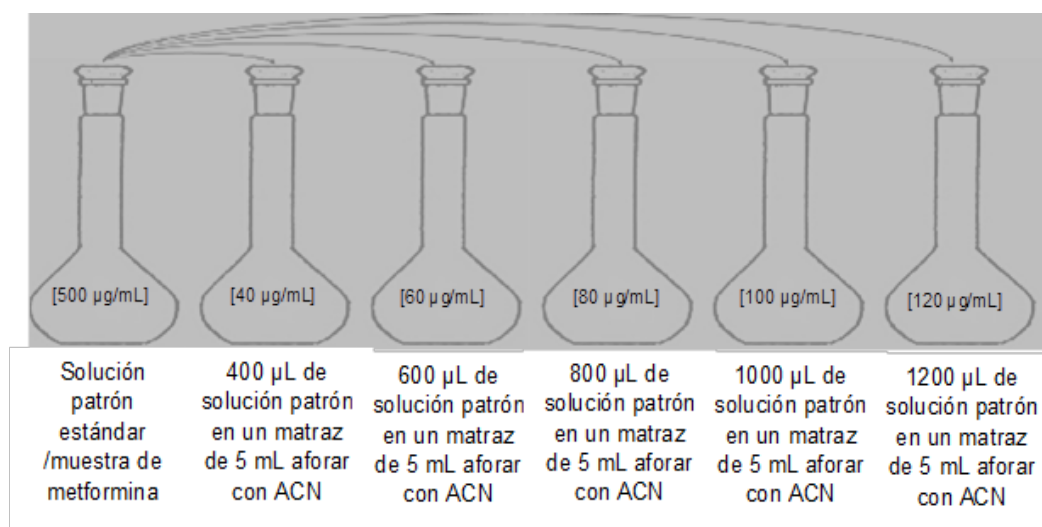


Fig 3. Preparación de curva de calibración estándar y muestra de metformina para método por HPLC

Procedimiento para la validación

- Linealidad del sistema y método

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs absorbancia) utilizando las 5 diluciones con un rango de concentración de 40 a 120 µg/mL como se muestra en la Figura 3. El análisis se hizo por triplicado para cada dilución. Se inyectaron las diluciones de la muestra y estándar en el cromatógrafo. Tanto la fase móvil como las diluciones se desgacificarón antes de este procedimiento.

- Precisión del sistema y método

La precisión se determinó preparando 10 soluciones con la concentración del punto medio de la curva (80 µg/mL) del estándar metformina para el sistema y de la muestra de metformina para el método.

- Exactitud y Repetibilidad

La exactitud y la Repetibilidad se evaluaron con 10 repeticiones, los parámetros calificados fueron IC para la media poblacional y el CV del porcentaje de recobro

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Los parámetros para el propósito de ambos métodos fueron validados según las directrices de la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. A.C.

- Linealidad del sistema

Los resultados del estudio para evaluar la linealidad de sistema por el método espectrofotométrico UV-Vis y Cromatográfico HPLC de metformina se muestran en la tabla 1 y Figura 4,5 respectivamente.

Tabla 1. Resultados de linealidad del sistema para método espectrofotométrico UV-Vis y HPLC en metformina

Parámetro	Resultado		Criterio de aceptación	Dictamen
	UV-vis	HPLC		
Coefficiente de determinación	0.9994	0.9964	$r^2 > 0.98$	Cumple

Intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) \pm =	0.0833	18.81	IC de la pendiente no debe incluir cero	Cumple
	0.0810	17.50		

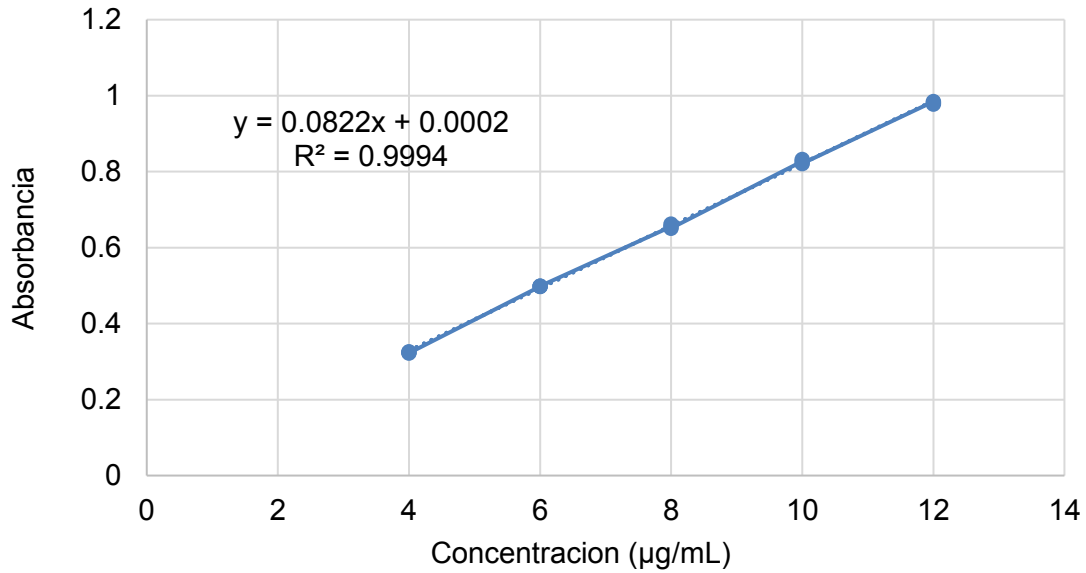


Fig 4. Curva de calibración de metformina estándar para linealidad de sistema por UV-vis.

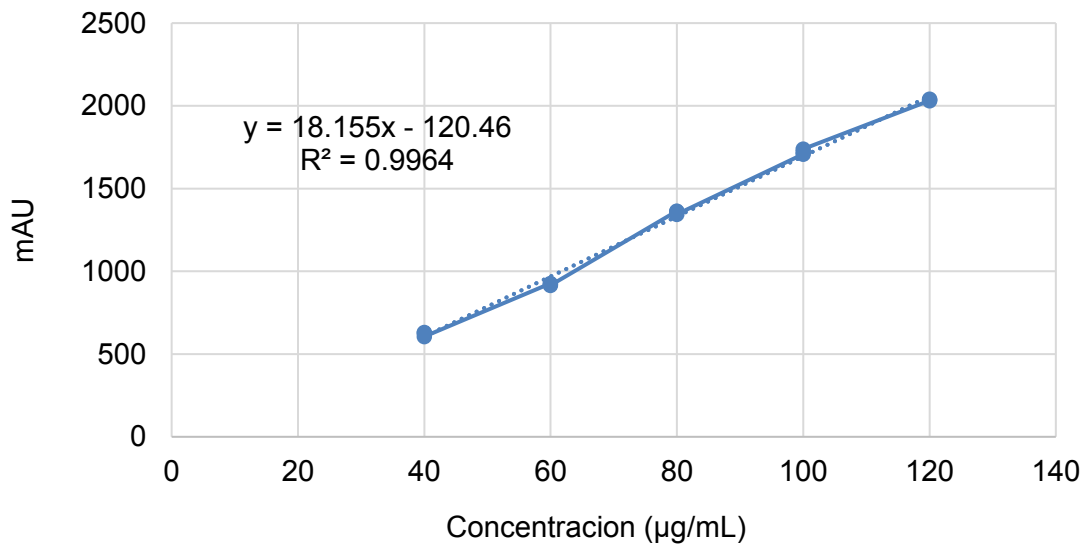


Fig 5. Curva de calibración de metformina estándar para linealidad de sistema por HPLC.

Como se muestra la curva de calibración para ambos métodos resulto ser lineal en el intervalo de concentración de metformina evaluado (Fig 4 y 5). Al aplicar la regresión lineal a los resultados registrados, se obtuvo la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación fue de 0,9994 por el método UV-vis y de 0,9964 para el método por HPLC cumpliendo con el criterio establecido $r^2 > 0.98$. El intervalo de confianza para la pendiente se encontró dentro de los rangos como se muestra en la tabla 1, por lo tanto, se satisfacen las condiciones de linealidad del sistema para ambos métodos

El análisis de t student para la pendiente y el intercepto en ambos métodos arrojo que estos son mayores al valor de t de tablas 2.160 con excepción del coeficiente del intercepto en el método UV-Vis los valores son significativos en la ecuación de la regresión (Tabla 2). El valor p de la prueba en la tabla ANOVA es menor de 0.05 por lo tanto, se concluye que existe una relación estadísticamente significativa entre la variable independiente (Concentración) y la variable dependiente (Absorbancia y Área), para ambos métodos en metformina con un nivel de confianza de 95% (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de prueba Andeva y T de student para método espectrofotométrico UV-Vis y HPLC en metformina

ANDEVA		
	UV-vis	HPLC
Valor critico p	1.4E-20	8.78E-16
T de student		
Estadístico t	UV-vis	HPLC
Pendiente	137.89	54.90
Intercepto	0.2614	4.47

- Precisión del sistema

La tabla 3 muestra el análisis de precisión para el sistema en los métodos analíticos propuestos para la cuantificación de metformina. Como se muestra los resultados para el grado de concordancia entre cada repetición obtuvieron un porcentaje de coeficiente de variación (%CV) de 0,5160 para el método UV-vis y de 0,7532 para el método por HPLC. Ambos métodos analíticos propuestos son precisos debido a que cumplen con el criterio establecido ($CV \leq 1.5\%$).

Tabla 3. Análisis de la precisión del sistema para método espectrofotométrico UV-Vis y HPLC en metformina		
# Repetición	Absorbancia	mAU
1	0.4900	1339.234
2	0.4985	1362.866
3	0.4964	1346.520
4	0.4960	1343.625
5	0.4963	1328.312
6	0.4986	1356.474
7	0.4980	1354.359
8	0.4982	1340.750
9	0.4960	1337.623
10	0.4982	1345.373
CV%	0.5160	0.7532
CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CV \leq 1.5%	
Dictamen	Cumple	

- Linealidad del método

En la figura 6 y 7 se presenta la relación proporcional entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de metformina, en ambos métodos analíticos se observa una linealidad en el rango de concentración de 4.02 a 12.02

µg/mL en el método espectrofotométrico y de 40.05 a 120.27 µg/mL en HPLC con un coeficiente de determinación lineal (r^2) mayor o igual a 0.98.

Los parámetros evaluados para la linealidad del método se muestran en la tabla 1. El promedio del porcentaje de recuperación obtenido para cada método se encuentra dentro del rango establecido que fue 100.53 % por UV-vis y de 100.23 % en HPLC presentando una diferencia mínima en el porcentaje de recuperación. En función a estos resultados se confirma que ambos métodos analíticos son lineales debido a que cumplen con todos los parámetros establecidos.

-Precisión del método

Los resultados indican (tabla 5) que ambos métodos son precisos ya que el coeficiente de variación obtenido para la cantidad de recuperación metformina fue 1.0118 para UV-vis y de 0.9543 por HPLC cumpliendo con el criterio de aceptación.

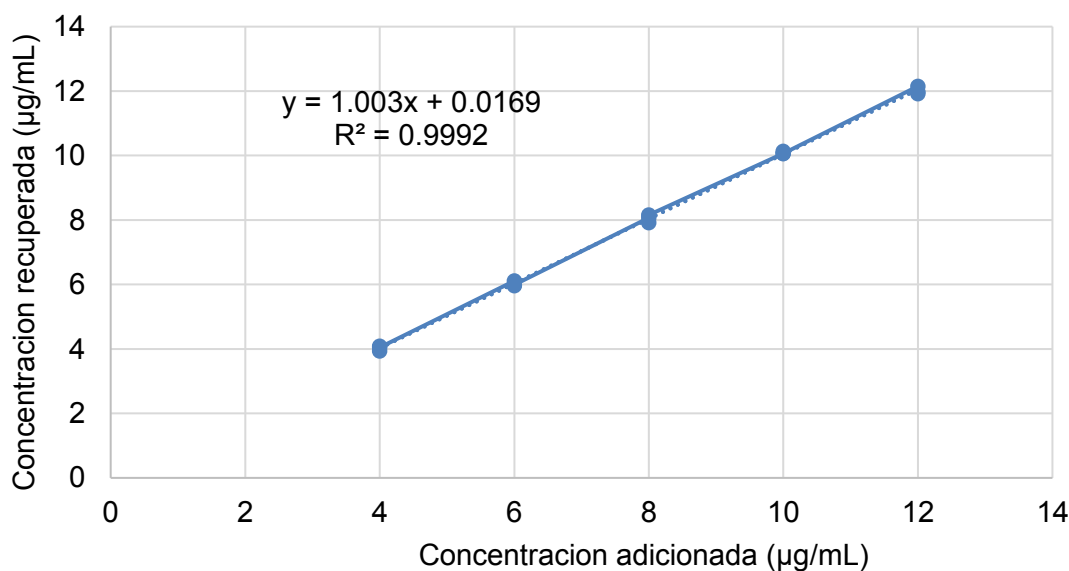


Fig 6. Curva de linealidad del método por UV-vis de metformina

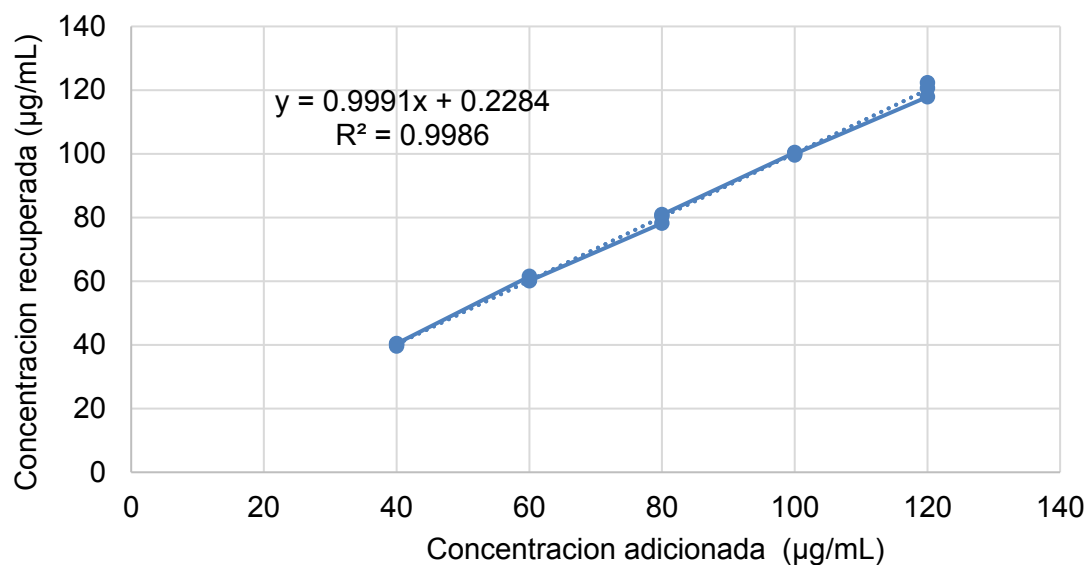


Fig 7. Curva de linealidad del método por HPLC de metformina

Tabla 4. Resultados de linealidad del método por espectrofotométrico UV-Vis y HPLC en metformina				
Parámetro	Resultado		Criterio de aceptación	Dictamen
	UV-Vis	HPLC		
Coeficiente de determinación	0.9992	0.9986	$r^2 > 0.98$	Cumple
Intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) \pm =	1.0197	1.0215	IC de la pendiente debe incluir la unidad	Cumple
	0.9862	0.9765		
Intervalo de confianza para la ordenada IC (β_0) \pm =	0.1589	2.139	IC de la ordenada al origen debe incluir el cero	Cumple
	-0.1251	-1.6825		
CV de la regresión	1.056	1.425	CV < 3% para método espectrofotométrico CV < 2% para método cromatográfico	Cumple
CV del porcentaje de recobro	1.130	1.240	CV < 3% para método espectrofotométrico	Cumple

			CV<2% para método cromatográfico	
Intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) \pm =	101.16	100.92	IC debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97-103 % método espectrofotométrico y 98-102 % si el método es cromatográfico	Cumple
	99.90	99.54		
Promedio % de recobro	100.53	100.23		

Tabla 5. Análisis de la precisión del método espectrofotométrico UV-Vis y HPLC en metformina

	UV-vis	HPLC
CV%	1.0118	0.9543
CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CV \leq 3% para método espectrofotométrico y CV \leq 2% para método cromatográfico	
Dictamen	Cumple	

-Exactitud y repetibilidad del método

Se determinó por un analista con 10 placebos cargados a una concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ UV-vis y 80 $\mu\text{g/mL}$ en HPLC. En la tabla 6 se reportan los resultados obtenidos, el método es exacto debido que el coeficiente de variación para el porcentaje las concentraciones recuperadas son menor a los criterios de aceptación siendo de 1.007 % para el método UV-vis y de 0.9543 por HPLC. Esto quiere decir que hay concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores reales. El porcentaje de recuperación obtenido dentro de las concentraciones establecidas se encuentran dentro del rango de aceptación para cada uno de los métodos.

Tabla 6. Resultados de exactitud y repetibilidad del método por espectrofotometría UV-Vis y HPLC en metformina

Parámetro	Resultado		Criterio de aceptación	Dictamen
	UV-Vis	HPLC		
CV del porcentaje de recobro	1.0079	0.9543	CV<3% para método espectrofotométrico CV<2% para método cromatográfico	Cumple
Intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) \pm =	101.37	101.26	IC debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97-103 % método espectrofotométrico y 98-102 % si el método es cromatográfico	Cumple
	99.92	99.88		
Promedio % de recobro	100.64	100.58		

Los métodos analíticos propuestos se compararon mediante un análisis estadístico ANOVA. Puesto que el valor-P obtenido es mayor que 0.05 se acepta la hipótesis nula que establece que los valores experimentales obtenidos en el análisis de muestras por los dos métodos son iguales y no existe diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 % (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación entre métodos analíticos HPLC y UV-vis

Valor critico p	0.507
-----------------	-------

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación por HPLC y UV-vis para la cuantificación de Metformina en tabletas, ambos métodos analíticos cumplen con los parámetros establecidos; sin embargo, la Secretaría de Salud y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios junto con otras instituciones y organismos en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, establece en el apartado nueve que un requisito esencial para la validación es la calificación de todos los elementos involucrados en el proceso, así como la validación de los sistemas computarizados ocupados en los equipos analíticos HPLC y UV-vis, estas características son importantes para la concreta confiabilidad de los resultados en la validación, cabe mencionar que en este proyecto no se consideraron estos requisitos previos por lo cual puede impactar en la confiabilidad de los resultados de los parámetros evaluados para ambos métodos analíticos.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su doceava edición (FEUM 12) propone la cuantificación de Metformina en la forma farmacéutica de tabletas por espectrofotometría UV; sin embargo, estudios recientes como el de Yuvraj (2017), reportan la validación del método analítico por HPLC para la cuantificación de este principio activo teniendo resultados confiables para su análisis, estos coinciden con los obtenidos en este proyecto en el cual se propone como un método alternativo en la cuantificación de Metformina¹⁶.

Los métodos analíticos propuestos se compararon mediante un análisis estadístico t de Student el cual concluye que no hay una diferencia significativa entre ambos ($P > 0.05$), estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por García y colaboradores (2010) el cual consistió en la validación de los métodos analíticos HPLC y UV-vis para el control de calidad y el estudio de estabilidad en tabletas de metformina 500 mg, sus resultados del método espectrofotométrico UV no mostraron diferencia significativa de los obtenidos con el método de HPLC¹⁷. En resumen, los métodos validados por espectrofotometría UV y cromatografía líquida

de alta resolución para las tabletas de metformina 500 mg, resultaron ser lineales, precisos, exactos y confiables para su uso sin embargo, varios estudios consultados que utilizaron ambos métodos analíticos para la cuantificación de principios activos en tabletas recomiendan el método por espectrometría ultravioleta para emplearse en el control de calidad de rutina del producto terminado por su sencillez y rapidez y el método por cromatografía líquida de alta resolución para el estudio de productos con formulaciones más complejas debido a su elevada especificidad^{18,19}.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Debido a la pandemia de COVID-19 que se suscitó a finales de marzo en México y obligó a la población a permanecer en cuarentena, cerrando Instituciones públicas como las Universidades y los laboratorios de investigación, no fue posible alcanzar satisfactoriamente todos los objetivos planteados en un inicio del proyecto sin embargo se espera que la información que se pudo recopilar antes de este suceso sea de utilidad para futuras investigaciones. Al término de este trabajo se logró desarrollar y validar un método por HPLC y UV-vis eficiente para la cuantificación de metformina en tabletas. Las condiciones cromatográficas son suficientemente reproducibles para obtener resultados adecuados en una validación según las directrices de la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. A.C. Los resultados son satisfactorios ya que se logró recuperar el analito de interés obteniendo un porcentaje de recuperación aceptable. Por lo tanto, se cumplió con el objetivo de desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de metformina en tabletas.

CONCLUSIONES

Se desarrollo y valido dos métodos analíticos para la cuantificación de metformina los cuales resultaron ser lineales, precisos y exactos en el rango de concentraciones de 4-12 µg/ml de metformina para UV-vis y 40-120 µg/ml para HPLC ; ambos métodos son confiables para su aplicación en el control de calidad de producto terminado , el método de espectrometría UV-vis es de primera elección debido a su



sencillez y rapidez y el método por cromatografía líquida de alta resolución es un método óptimo y alternativo para formulaciones complejas debido a su alta especificidad.

REFERENCIAS

1. Setter, S. M., Iltz, J. L., Thams, J., & Campbell, R. K. (2003). Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. *Clinical therapeutics*, 25(12), 2991–3026. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(03\)90089-0](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(03)90089-0)
2. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* (London, England : 1979), 122(6), 253–270. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>
3. Gedawy, A., Al-Salami, H., & Dass, C. R. (2019). Development and validation of a new analytical HPLC method for simultaneous determination of the antidiabetic drugs, metformin and gliclazide. *Journal of food and drug analysis*, 27(1), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.007>
4. Bermejo, R., & Moreno, A.(2014). Análisis instrumental. *Síntesis*,3(1),45-47.
5. “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SSA1-2015.Diario Oficial de la Federación, 5 de febrero del 2016.
6. Altamirano, L., García-García, J., Soto-Estrada, G., & Capraro, S., & Limon, C.D. (2014). Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista médica del hospital general de México* , 77(3) , 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2014.07.002>

7. Hernandez-Avila, M.Z., Gutiérrez, J.P & Reynoso-Noverón, N. (2012). Diabetes Mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*. 55 (1). S129-S136. 10.21149/spm.v55s2.5108.
8. Asociación Americana de Diabetes.(2014). Estándares de atención médica en diabetes .*Diabetes Care* , 37 (1) .S14 - S80.
9. Federación Internacional de Diabetes Atlas de diabetes de la FID (7ª Ed., (2015). Federación Internacional de Diabetes, Bruselas, Bélgica.
10. Shafiq, M., Arif, P.M y Farooqui, M. (2011). “Metformin hydrochloride: Density & Viscosity studies in mixed binary solvent in presence of additives”, *Scholars Research Library Archives of Applied Science Research*,3. 277-287.
11. Apostolova, N., Iannantuoni, F., Gruevska, A., Muntane, J., Rocha, M., & Victor, V. M. (2020). Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox biology*, 34, 101517. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101517>
12. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism*, 20(6), 953–966. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
13. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.(2019). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 12 ed. México.
14. Anurag, S., & Srishti, J. (2019) Liquid Chromatography, Historical Development, *Encyclopedia of Analytical Science Academic Press*, 2º Ed, 86-92.
15. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Edición 2002.
16. Yuvraj, D., Sandip, M., Somnath, D., Vijay, R., & Dhanraj R. (2017). Development and Validation of UV-Spectrophotometric Method for Estimation of Metformin in Bulk and Tablet Dosage Form. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51 (4S), S754-760.

17. García, M., León, R., & Martínez, V. (2010). Métodos analíticos necesarios para el desarrollo de tabletas de metformina 500 mg. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(3).
18. Weich, A., Oliveira, D.C., Melo, J., Goebel, K. & Rolim, C.M.B.. (2017). Validation of UV spectrophotometric and HPLC methods for quantitative determination of atenolol in pharmaceutical preparations. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26. 765-770.
19. Mendez, A. S., Steppe, M., & Schapoval, E. E. (2013). Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 33(5), 947–954. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(03\)00366-2](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00366-2)

VoBo
Contenidos Académicos



MCF. Leticia Ortega Almanza
No. económico: 35538



M en C. María Luisa Vázquez Ramírez
No. económico: 13752



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL

“Evaluación de productos relacionados con la
salud”

Etapas: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control
físico, químico, biológico y o microbiológico de productos
relacionados con la salud

Título: Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de
Metformina con cúrcuma y té verde por HPLC y UV en tabletas recubiertas

Alumna: Kenia Izel Galán Hernández

Matricula: 2153060203

Dirección : 1^{ra} Cd de Cuauhtémoc #12 Col Ayotla, Ixtapaluca, Edo, Méx.

Teléfono: 55-60-36-46-35

Asesores: MCF. Leticia Ortega Almanza

No. económico: 35538

M en C. María Luisa Vázquez Ramírez

No. económico: 13752

Lugar de realización: UAM -X, Edificio N. Laboratorio 107 Control de Calidad.

Fecha de inicio y terminación: 16 de diciembre de 2019 al 16 junio de 2020

Mexico, CDMX a 04 Noviembre 2020



Casa abierta al tiempo

RESUMEN

En la industria farmacéutica en México, los estudios de validación se han llevado a cabo como parte de una actividad necesaria y fundamental para una eficiente producción y aseguramiento de la calidad del medicamento. La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido y documentado, con estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en textos oficiales como la NOM-059-SSA 1-2015 son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez¹.

El objetivo de este proyecto es desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de metformina con cúrcuma y té verde por HPLC y UV-Vis en tabletas recubiertas, para conseguir esta meta se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Validar el método analítico para la cuantificación de metformina por HPLC y UV-Vis ,
- Elaborar tabletas recubiertas de Metformina con cúrcuma y té verde
- Evaluar el perfil de disolución de las tabletas recubiertas de Metformina con cúrcuma y té verde por el método desarrollado de HPLC.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación por HPLC y UV-vis para la cuantificación de Metformina en tabletas, ambos métodos analíticos cumplen con los parámetros establecidos; sin embargo la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, establece en el apartado nueve que un requisito esencial para la validación es la calificación de todos los elementos involucrados en el proceso, así como la validación de los sistemas computarizados ocupados en los equipos analíticos HPLC y UV-vis, estas características son importantes para la concreta confiabilidad de los resultados,



cabe mencionar que en este proyecto no se consideraron estos requisitos previos por lo cual puede impactar en la confiabilidad de los resultados de los parámetros evaluados.

Los métodos analíticos propuestos se compararon mediante un análisis estadístico t de student el cual concluye que no hay una diferencia significativa entre ambos ($P > 0.05$), estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por García y colaboradores (2010) el cual consistió en la validación de los métodos analíticos HPLC y UV-vis para el control de calidad y el estudio de estabilidad en tabletas de metformina 500 mg, sus resultados del método espectrofotométrico UV no mostraron diferencia significativa de los obtenidos con el método de HPLC².

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Debido a la pandemia de COVID-19 que se suscitó a finales de marzo en México y obligó a la población a permanecer en cuarentena, cerrando Instituciones públicas como las Universidades y los laboratorios de investigación, no fue posible alcanzar satisfactoriamente todos los objetivos planteados en un inicio del proyecto sin embargo se espera que la información que se pudo recopilar antes de este suceso sea de utilidad para futuras investigaciones. Al término de este trabajo se logró desarrollar y validar un método por HPLC y UV-vis eficiente para la cuantificación de metformina en tabletas. Las condiciones cromatográficas son suficientemente reproducibles para obtener resultados adecuados en una validación según las directrices de la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. A.C. Los resultados son satisfactorios ya que se logró recuperar el analito de interés obteniendo un porcentaje de recuperación aceptable. Por lo tanto, se cumplió con el objetivo de desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de metformina en tabletas.

En conclusión, los métodos validados por espectrofotometría UV y cromatografía líquida de alta resolución para las tabletas de metformina 500 mg, resultaron ser

lineales, precisos, exactos y confiables para su uso, sin embargo varios estudios consultados que utilizaron ambos métodos analíticos para la cuantificación de principios activos en tabletas recomiendan el método por espectrometría ultravioleta para emplearse en el control de calidad de rutina del producto terminado por su sencillez y rapidez y el método por cromatografía líquida de alta resolución para el estudio de productos con formulaciones más complejas debido a su elevada especificidad^{3,4}.

REFERENCIAS

1. “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SSA1-2015. Diario Oficial de la Federación, 5 de febrero del 2016
2. García, M., León, R., & Martínez, V. (2010). Métodos analíticos necesarios para el desarrollo de tabletas de metformina 500 mg. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(3).
3. Weich, A., Oliveira, D.C., Melo, J., Goebel, K. & Rolim, C.M.B.. (2017). Validation of UV spectrophotometric and HPLC methods for quantitative determination of atenolol in pharmaceutical preparations. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26. 765-770.
4. Mendez, A. S., Steppe, M., & Schapoval, E. E. (2013). Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 33(5), 947–954. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(03\)00366-2](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00366-2)
5. Setter, S. M., Iltz, J. L., Thams, J., & Campbell, R. K. (2003). Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. *Clinical therapeutics*, 25(12), 2991–3026. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(03\)90089-0](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(03)90089-0)

6. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* (London, England : 1979), 122(6), 253–270. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>
7. Gedawy, A., Al-Salami, H., & Dass, C. R. (2019). Development and validation of a new analytical HPLC method for simultaneous determination of the antidiabetic drugs, metformin and gliclazide. *Journal of food and drug analysis*, 27(1), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.007>
8. Bermejo, R., & Moreno, A.(2014). Análisis instrumental. *Síntesis*,3(1),45-47.
9. Altamirano, L., García-García, J., Soto-Estrada, G., & Capraro, S., & Limon, C.D. (2014). Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista médica del hospital general de México* , 77(3) , 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2014.07.002>
10. Hernandez-Avila, M.Z., Gutiérrez, J.P & Reynoso-Noverón, N. (2012). Diabetes Mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*. 55 (1). S129-S136. 10.21149/spm.v55s2.5108.
11. Asociación Americana de Diabetes.(2014). Estándares de atención médica en diabetes .*Diabetes Care* , 37 (1) .S14 - S80.
12. Federación Internacional de Diabetes Atlas de diabetes de la FID (7ª Ed., (2015). Federación Internacional de Diabetes, Bruselas, Bélgica.
13. Shafiq, M., Arif, P.M y Farooqui, M. (2011). “Metformin hydrochloride: Density & Viscosity studies in mixed binary solvent in presence of additives”, *Scholars Research Library Archives of Applied Science Research*,3. 277-287.
14. Apostolova, N., Iannantuoni, F., Gruevska, A., Muntane, J., Rocha, M., & Victor, V. M. (2020). Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox biology*, 34, 101517. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101517>

15. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism*, 20(6), 953–966. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
16. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2019). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 12 ed. México.
17. Anurag, S., & Srishti, J. (2019) Liquid Chromatography, Historical Development, *Encyclopedia of Analytical Science Academic Press*, 2° Ed, 86-92.
18. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Edición 2002.
19. Yuvraj, D., Sandip, M., Somnath, D., Vijay, R., & Dhanraj R. (2017). Development and Validation of UV-Spectrophotometric Method for Estimation of Metformin in Bulk and Tablet Dosage Form. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51 (4S), S754-760.