



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley Nº 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución Nº 10/2010

"VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUTEN EN MEDICAMENTOS"

López Ojeda, Juana Bienvenida
Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Sol. Asunción. Paraguay
juanalopezojeda729@gmail.com

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo general estandarizar una metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos. El estudio se desarrolló con un enfoque cuantitativo, de tipo descriptivo y experimental. Se analizaron matrices de diferentes formas farmacéuticas fortificadas con el estándar de gliadina. La validación incluyó la evaluación de parámetros claves como la aplicabilidad, especificidad/selectividad, recuperación, repetitividad, precisión intermedia y cálculo de incertidumbre. Se concluyó que el límite de detección (LOD) fue de 0.5 mg/kg de gliadina, equivalente a 1 mg/kg de gluten. En los fortificados de controles de gliadina se detectó señal, obteniéndose un LOQ de 2.5 mg/kg de gliadina (equivalente a 5 mg/kg de gluten), y un porcentaje de recuperación entre 80% y 97%. El método se considera satisfactorio, comparado con el porcentaje de recuperación que debe estar entre 50% y 150%. El % CV de repetibilidad fue < 20% y de reproducibilidad < 30%, cumpliendo con las especificaciones. Se calculó el % de incertidumbre ($k=2$, 95% de confianza). La implementación de esta metodología validada permitirá un control riguroso en la industria farmacéutica y contribuirá a mejorar la calidad y seguridad de los medicamentos disponibles en el mercado. La investigación permitió validar con éxito una metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos, demostrando su precisión, sensibilidad y confiabilidad para el análisis en el contexto planteado.

Palabras clave: Elisa. Fortificados. Gluten. Medicamentos. Validación Gliadina



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley N° 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución N° 10/2010

ABSTRACT

The present research aimed to standardize an analytical methodology based on the ELISA technique for the determination of gluten in medicines. The study was carried out with a quantitative approach, of a descriptive and experimental type. Matrices from different pharmaceutical dosage forms fortified with the gliadin standard were analyzed. The validation included the evaluation of key parameters such as applicability, specificity/selectivity, recovery, repeatability, intermediate precision, and uncertainty calculation. It was concluded that the limit of detection (LOD) was 0.5 mg/kg of gliadin, equivalent to 1 mg/kg of gluten. In the fortified gliadin controls, a signal was detected, obtaining a LOQ of 2.5 mg/kg of gliadin (equivalent to 5 mg/kg of gluten), and a recovery percentage between 80% and 97%. The method is considered satisfactory, compared to the recovery percentage that must be between 50% and 150%. The repeatability %CV was $< 20\%$ and the reproducibility %CV $< 30\%$, meeting the specifications. The percentage of uncertainty was calculated ($k=2$, 95% confidence). The implementation of this validated methodology will allow rigorous control in the pharmaceutical industry and contribute to improving the quality and safety of medicines available on the market. The research successfully validated an analytical methodology based on the ELISA technique for the determination of gluten in medicines, demonstrating its precision, sensitivity, and reliability for analysis in the proposed context.

Keywords: ELISA. Fortified. Gluten. Medicines. Validation. Gliadin



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley Nº 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución Nº 10/2010

1.INTRODUCCIÓN

Esta investigación se centra en la validación de una metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos, con el fin de proporcionar una herramienta confiable y precisa para la industria farmacéutica. Además, se explorarán las regulaciones y normativas vigentes a nivel nacional relacionadas con los medicamentos libres de gluten y su impacto en la producción y comercialización de estos productos.

La industria farmacéutica tiene la responsabilidad de garantizar que sus productos sean seguros y cumplan con las necesidades de todos los pacientes, incluyendo aquellos con requerimientos dietéticos especiales. La falta de metodologías analíticas validadas para la determinación de gluten en medicamentos puede llevar a la incertidumbre sobre su contenido y, potencialmente, a la exposición de pacientes celíacos a esta proteína.

La celiaquía es una enfermedad autoinmune desencadenada por la ingesta de gluten, una proteína presente en el trigo, la cebada y el centeno, que afecta a una porción significativa de la población mundial. Para las personas con celiaquía, incluso trazas de gluten pueden provocar reacciones adversas significativas, comprometiendo su salud y calidad de vida. En este contexto, la seguridad de los medicamentos es crucial, y la presencia inadvertida de gluten en sus excipientes o durante el proceso de fabricación representa un riesgo considerable para los pacientes celíacos.

La técnica de Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) es una herramienta sensible y específica ampliamente utilizada para la detección y cuantificación de diversas sustancias en diferentes matrices. En contexto, en la industria farmacéutica, su aplicabilidad para garantizar la seguridad de los medicamentos para pacientes celíacos es un área de creciente importancia.



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley Nº 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución Nº 10/2010

La investigación tiene como objetivo general estandarizar una metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos.

La presente investigación reviste gran importancia debido a que aporta una metodología validada para la determinación de gluten en medicamentos, aspecto crucial para garantizar la seguridad de pacientes con enfermedad celíaca o sensibilidad al gluten. La estandarización y validación de un método analítico basado en la técnica ELISA asegura resultados precisos, confiables y reproducibles, lo que fortalece los controles de calidad en la industria farmacéutica. Además, este trabajo contribuye al cumplimiento de normativas y estándares internacionales, favoreciendo la transparencia en el etiquetado y la prevención de riesgos para la salud, al tiempo que impulsa la innovación en los procedimientos de control y análisis de productos farmacéuticos.

El aporte científico de la investigación es la estandarización y validación de una metodología analítica basada en la técnica ELISA, que permite determinar gluten en medicamentos con alta precisión, sensibilidad y confiabilidad, fortaleciendo los procesos de control de calidad en la industria farmacéutica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio adoptó un nivel de investigación descriptivo, enfocado en especificar las propiedades y características de un fenómeno. El nivel descriptivo de investigación se caracteriza por especificar propiedades, características y perfiles importantes de personas, grupos, comunidades, procesos, objetos o cualquier otro fenómeno que sea sometido a análisis. Este tipo de investigación no se limita únicamente a la recolección de datos, sino que busca detallar de manera precisa y ordenada los aspectos relevantes de la realidad estudiada, con el fin de ofrecer una visión clara de su situación o comportamiento en un momento determinado.(1)



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley Nº 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución Nº 10/2010

El diseño fue experimental, específicamente centrado en la validación de un método analítico. Esto implicó la aplicación rigurosa de pruebas y protocolos estandarizados para asegurar que la metodología propuesta cumpliera con criterios de calidad y desempeño preestablecidos. la investigación experimental consiste en la manipulación deliberada de una o más variables independientes para observar y medir el efecto de dicha manipulación sobre una o más variables dependientes, bajo condiciones controladas que permiten minimizar la influencia de variables extrañas. Este nivel de investigación es fundamental para establecer relaciones causales entre variables. (2)

La población de estudio estuvo conformada por formas farmacéuticas (soluciones, cápsulas, soluciones orales, polvo, comprimidos) analizadas para la validación de medicamentos libres de gluten mediante ELISA. Se seleccionaron muestras de diferentes formas farmacéuticas: Suspensión, Cápsula, Solución oral, Polvo, Comprimido, Solución gotas.

En cuanto a los Criterios de Inclusión y Exclusión, Se incluyeron medicamentos de diversas formas farmacéuticas disponibles en el Laboratorio Econatura y se excluyeron aquellos que no cumplieran con ciertos requisitos del estudio (caducidad vencida, cantidad insuficiente de muestra para la validación).

La técnica analítica utilizada fue el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA). Requisitos de Equipamiento (Lector de ELISA, balanza analítica, molino, agitador rotatorio, vortex, baño termostático, centrifuga, pipetas automáticas, heladera). Seguridad (guantes, guardapolvos, tapabocas, lentes de seguridad). Reactivos (Kit de ELISA R-Biopharm R 7001, Cocktail patentado para la extracción de muestras R- Biopharm, material de referencia de gluten: Prolamin Working Group: PWG Gliadin, etanol p.a., leche en polvo grado alimenticio).



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley N° 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución N° 10/2010

- Se tuvieron en cuenta las consideraciones éticas pertinentes para la investigación científica.

3. RESULTADOS

En cuanto al primer objetivo específico, Evaluar la especificidad y selectividad de la técnica ELISA para detectar gluten en diferentes matrices farmacéuticas. Se evaluó la especificidad y selectividad de la técnica ELISA para la detección de gluten en diferentes matrices farmacéuticas. Los resultados demostraron que el método no presentó interferencias significativas de excipientes comunes en las formulaciones analizadas, confirmando la capacidad del ensayo para discriminar el gluten de otras sustancias presentes en los medicamentos. Además, se observó una alta selectividad hacia la gliadina, componente principal del gluten, garantizando la confiabilidad del método para su uso en diferentes formas farmacéuticas.

Durante las pruebas de especificidad, se analizó una serie de muestras placebo y fortificadas con diferentes concentraciones de gliadina. En todos los casos, las muestras placebo mostraron señales por debajo del límite de detección, mientras que las fortificadas presentaron respuestas proporcionales a la concentración de gluten, evidenciando la sensibilidad y selectividad del método para identificar la presencia de gluten sin falsos positivos.

Con relación al segundo objetivo específico, Determinar los parámetros de validación analítica, incluyendo límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión y recuperación del método. Se determinaron los parámetros de validación analítica, tales como límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión y porcentaje de recuperación. El LOD se estableció en 0.5 mg/kg de gliadina, equivalente a 1 mg/kg de gluten, mientras que el LOQ fue de 2.5 mg/kg de gliadina, correspondiente a 5 mg/kg de gluten. Estos valores cumplieron con los estándares internacionales para métodos analíticos de este tipo.



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley N° 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución N° 10/2010

La precisión del método fue evaluada mediante pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, obteniéndose un coeficiente de variación (% CV) inferior a 20% y 30%, respectivamente. Asimismo, el porcentaje de recuperación osciló entre 80% y 97%, lo que indica un alto grado de exactitud en la cuantificación de gluten en las muestras analizadas. El cálculo de incertidumbre se realizó con un nivel de confianza del 95%, confirmando la robustez del método validado.

Con respecto al tercer objetivo específico, Aplicar la metodología estandarizada para el análisis de muestras de medicamentos comerciales y evaluar su contenido de gluten. La metodología estandarizada fue aplicada en el análisis de diferentes muestras comerciales de medicamentos, con el propósito de evaluar su contenido de gluten. Los resultados mostraron que la mayoría de las muestras presentaron niveles de gluten por debajo del límite de cuantificación, asegurando la seguridad para pacientes sensibles al gluten. Sin embargo, algunas muestras exhibieron concentraciones detectables, lo que pone de manifiesto la importancia de un control riguroso en la industria farmacéutica.

Además, los análisis permitieron identificar variaciones en el contenido de gluten entre diferentes formas farmacéuticas y lotes comerciales, evidenciando la necesidad de implementar protocolos estandarizados de control de calidad. La aplicación práctica del método validado facilitó la detección oportuna de gluten en medicamentos, contribuyendo a mejorar la trazabilidad y seguridad en la producción farmacéutica.

Finalmente, con respecto al objetivo general, Estandarizar una metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos. La metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos fue estandarizada y validada exitosamente, demostrando alta precisión, sensibilidad y especificidad.



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley N° 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución N° 10/2010

Se establecieron parámetros clave como el límite de detección (0.5 mg/kg de gliadina) y límite de cuantificación (2.5 mg/kg de gliadina), con porcentajes de recuperación entre 80% y 97%, y coeficientes de variación que cumplieron con los estándares internacionales. La aplicación del método en muestras comerciales permitió detectar y cuantificar gluten de manera confiable, confirmando la utilidad del procedimiento para el control de calidad en la industria farmacéutica.

4. CONCLUSIONES

En cuanto al primer objetivo específico, evaluar la especificidad y selectividad de la técnica ELISA para detectar gluten en diferentes matrices farmacéuticas, se evalúa la especificidad y selectividad de la técnica ELISA para la detección de gluten en diferentes matrices farmacéuticas. Los resultados demuestran que el método no presenta interferencias significativas de excipientes comunes en las formulaciones analizadas, confirmando la capacidad del ensayo para discriminar el gluten de otras sustancias presentes en los medicamentos. Además, se observa una alta selectividad hacia la gliadina, componente principal del gluten, garantizando la confiabilidad del método para su uso en diferentes formas farmacéuticas.

Durante las pruebas de especificidad, se analiza una serie de muestras placebo y fortificadas con diferentes concentraciones de gliadina. En todos los casos, las muestras placebo muestran señales por debajo del límite de detección, mientras que las fortificadas presentan respuestas proporcionales a la concentración de gluten, evidenciando la sensibilidad y selectividad del método para identificar la presencia de gluten sin falsos positivos.

Con relación al segundo objetivo específico, determinar los parámetros de validación analítica, incluyendo límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión y



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley N° 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución N° 10/2010

recuperación. del método, se determinan estos parámetros. El LOD se establece en 0.5 mg/kg de gliadina, equivalente a 1 mg/kg de gluten, mientras que el LOQ es de 2.5 mg/kg de gliadina, correspondiente a 5 mg/kg de gluten. Estos valores cumplen con los estándares internacionales para métodos analíticos de este tipo.

La precisión del método se evalúa mediante pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, obteniéndose un coeficiente de variación (% CV) inferior a 20% y 30%, respectivamente. Asimismo, el porcentaje de recuperación oscila entre 80% y 97%, lo que indica un alto grado de exactitud en la cuantificación de gluten en las muestras analizadas. El cálculo de incertidumbre se realiza con un nivel de confianza del 95%, confirmando la robustez del método validado.

Con respecto al tercer objetivo específico, aplicar la metodología estandarizada para el análisis de muestras de medicamentos comerciales y evaluar su contenido de gluten, la metodología estandarizada se aplica en el análisis de diferentes muestras comerciales de medicamentos con el propósito de evaluar su contenido de gluten. Los resultados muestran que la mayoría de las muestras presentan niveles de gluten por debajo del límite de cuantificación, asegurando la seguridad para pacientes sensibles al gluten. Sin embargo, algunas muestras exhiben concentraciones detectables, lo que pone de manifiesto la importancia de un control riguroso en la industria farmacéutica.

Además, los análisis permiten identificar variaciones en el contenido de gluten entre diferentes formas farmacéuticas y lotes comerciales, evidenciando la necesidad de implementar protocolos estandarizados de control de calidad. La aplicación práctica del método validado facilita



UNIVERSIDAD DEL SOL

Creada por Ley N° 4263

Aprobada por el Consejo de Universidades por Resolución N° 10/2010

la detección oportuna de gluten en medicamentos, contribuyendo a mejorar la trazabilidad y seguridad en la producción farmacéutica.

Finalmente, con respecto al objetivo general, estandarizar una metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos, la metodología analítica basada en la técnica de ELISA para la determinación de gluten en medicamentos se estandariza y valida exitosamente, demostrando alta precisión, sensibilidad y especificidad. Se establecen parámetros clave como el límite de detección (0.5 mg/kg de gliadina) y límite de cuantificación (2.5 mg/kg de gliadina), con porcentajes de recuperación entre 80% y 97%, y coeficientes de variación que cumplen con los estándares internacionales. La aplicación del método en muestras comerciales permite detectar y cuantificar gluten de manera confiable, confirmando la utilidad del procedimiento para el control de calidad en la industria farmacéutica.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Sampieri RH, Fernández-Collado C, Baptista MP. *Metodología de la investigación*. 6ª ed. México: McGraw-Hill; 2014.
2. Tamayo M, Tamayo L. *Método y técnicas de investigación*. 6ª ed. México: McGraw-Hill; 2019.