

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**APORTES TÉCNICOS PARA LA REGULACIÓN DE  
MEDICAMENTOS LIBRES DE GLUTEN**

**Actividad Formativa Equivalente a Tesis presentada a la  
Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en  
Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos  
por:**

***Natalia Acuña Aguirre***

**Director/a de Tesis: Nalda Romero**

**Co-Director/a de Tesis: Isel Cortés**

**Santiago - Chile**

**Agosto, 2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS (AFE A TESIS) DE MAGÍSTER.**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la AFE a Tesis de Magíster presentada por el candidato

***Natalia Acuña Aguirre***

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de AFE a Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias de los Alimentos, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Nalda Romero**

**Co-director de Tesis:**

**Isel Cortés**

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**María Angélica Larraín**

**Tatiana Garrido**

**Edwar Fuentes**

## Índice

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Resumen del proyecto de tesis.....  | 7  |
| 1.2   | Resumen ejecutivo del Proyecto.....   | 7  |
| 2.    | Introducción .....  | 9  |
| 2.1   | Enfermedad celiaca: patogenia, sintomatología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento.....      | 9  |
| 2.2   | Dieta libre de gluten y regulación. ....  | 10 |
| 2.3   | Buenas prácticas de manufactura (BPM) en la industria de alimentos y medicamentos. ....           | 16 |
| 2.4   | Metodologías para la determinación de gluten.....   | 17 |
| 2.5   | Aseguramiento de la validez de los resultados. ....   | 19 |
| 2.6   | Validación y verificación de métodos de ensayo.....   | 20 |
| 2.6.1 | <i>Determinación de límites: límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)</i> ..... | 22 |
| 2.6.2 | <i>Determinación de la precisión</i> .....  | 23 |
| 2.6.3 | <i>Determinación de la Veracidad</i> .....  | 25 |
| 2.6.4 | <i>Evaluación de la Incertidumbre</i> .....   | 27 |
| 3.    | Objetivo general.....   | 31 |
| 3.1   | Objetivo específicos .....  | 31 |
| 4     | Metodología .....   | 32 |
| 4.1   | Muestra .....   | 32 |
| 4.2   | Método de ensayo aplicado .....   | 32 |
| 4.2.1 | Extracción de muestras: .....   | 33 |
| 4.2.2 | Análisis de muestras:.....  | 33 |
| 4.3   | Parámetros de validación aplicados y sus criterios de aceptabilidad.....                          | 34 |
| 4.3.1 | Límite de detección (LOD):.....   | 35 |
| 4.3.2 | Límite de cuantificación (LOQ): .....   | 35 |
| 4.3.3 | Precisión como repetibilidad intralaboratorio .....   | 35 |
| 4.3.4 | Precisión como reproducibilidad intralaboratorio .....  | 36 |
| 4.3.5 | Veracidad en términos de recuperación .....   | 37 |
| 4.3.6 | Incertidumbre de la medición.....   | 37 |
| 4.4   | Evaluación de la respuesta del método en una muestra de producto farmacéutico comercial .....     | 37 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.5   | Materiales, insumos y equipos .....  | 38 |
| 5.    | Resultados.....  | 38 |
| 5.1   | Validación de la metodología oficial de análisis para la determinación de gluten en la muestra excipiente farmacéutico almidón de maíz, grado farmacopea .<br>.....            | 38 |
| 5.1.1 | Ensayos para determinar “matriz cero” .....  | 39 |
| 5.1.2 | Límite de detección:.....  | 39 |
| 5.1.3 | Límite de cuantificación .....   | 41 |
| 5.1.4 | Precisión en términos de repetibilidad Intralaboratorio .....  | 42 |
| 5.1.5 | Precisión en términos de reproducibilidad intralaboratorio .....   | 43 |
| 5.1.6 | Veracidad .....  | 45 |
| 5.2   | Validación de la metodología oficial de análisis para la determinación de gluten en la muestra excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado, grado farmacopea. .... | 46 |
| 5.2.1 | Límite de detección:.....  | 46 |
| 5.2.2 | Límite de cuantificación .....   | 49 |
| 5.2.3 | Precisión en términos de repetibilidad Intralaboratorio .....  | 50 |
| 5.2.4 | Precisión en términos de reproducibilidad intralaboratorio .....   | 51 |
| 5.2.5 | Veracidad .....  | 53 |
| 5.3   | Estimación de la Incertidumbre de medición.....  | 54 |
| 5.4   | Evaluación de la respuesta del método en una muestra de producto farmacéutico comercial. ....  | 56 |
| 6.    | Discusión .....  | 58 |
| 7.    | Conclusiones .....   | 62 |
| 8     | Bibliografía.....  | 63 |
| 9.    | Anexos.....  | 70 |
| 9.1   | Anexo 1 .....  | 70 |
| 9.2   | Anexo 2 .....  | 72 |
| 9.3   | Anexo 3 .....  | 77 |

## Índice de Tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla N° 1: t de Student para 95% de confianza (2 colas).....   | 28 |
| Tabla N° 2 Resultados ensayos para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.....   | 39 |
| Tabla N° 3: Resultado ensayo curva de calibración (media y desviación estándar) para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.....                 | 40 |
| Tabla N° 4: Resultado ensayos para la estimación del límite de cuantificación, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.....  | 42 |
| Tabla N° 5: Resultados ensayos para la estimación de la repetibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.....   | 43 |
| Tabla N° 6: Resultados ensayos para la estimación de la reproducibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.....  | 44 |
| Tabla N° 7: Resultados % de recuperación para cada nivel de fortificación para la estimación de la veracidad, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz. ....                              | 46 |
| Tabla N° 8: Resultados ensayos para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado .....   | 47 |
| Tabla N° 9: Resultado ensayo curva de calibración (media y desviación estándar) para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado..... | 48 |
| Tabla N° 10: Resultado ensayos para la estimación del límite de cuantificación, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado. ....  | 50 |
| Tabla N° 11: Resultados ensayos para la estimación de la repetibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado .....                                   | 51 |
| Tabla N° 12: Resultados ensayos para la estimación de la reproducibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.....                                 | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla N° 13: Resultados % de recuperación para cada nivel de fortificación para la estimación de la veracidad, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado. .... | 54 |
| Tabla N° 14: Estimación de la incertidumbre de la medición a partir de fortificados, resultados para matriz excipiente farmacéutico. ....   | 55 |
| Tabla N° 15: Resultados del análisis a muestra de producto final farmacéutico clotiazepam 0,5 mg comprimidos trirranurados. ....  | 56 |

### **Índice de Figuras**

|   |    |
|---|----|
| Figura N° 1: Gráfica de tendencia de la curva estándar de gliadina v/s la absorbancia para la estimación del LOD, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz. ....  | 41 |
| Figura N° 2: Gráfica de tendencia de la curva estándar de gliadina v/s la absorbancia para la estimación del LOD, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado. ....  | 49 |
| Figura N° 3: Placa ELISA conteniendo pocillos de ensayo en muestra de clotiazepam comprimidos trirranurados. Etapa posterior a la adición e incubación con el sustrato y cromógeno. Los pocillos coloreados en azul indican presencia de gliadina en la muestra. .... | 57 |

## **1. Resumen del proyecto de tesis.**

### **1.2 Resumen ejecutivo del Proyecto**

El gluten, proteína que forma parte de algunos cereales, origina en sujetos genéticamente predispuestos a la denominada Enfermedad Celíaca (EC), caracterizada por la intolerancia a esta proteína y que constituye una condición inflamatoria crónica y de alta prevalencia. El único tratamiento reconocido para la EC es una dieta libre de gluten. Muchos países, incluido Chile, han implementado la regulación de los alimentos libres de gluten, la que ha sido enfocada principalmente en la certificación de alimentos, los que se analizan con un método oficial de análisis CODEX tipo I.

Las personas celiacas deben tener en cuenta que además de los alimentos, los medicamentos también podrían contener esta proteína, siendo la principal fuente de gluten en ellos los almidones derivados de cereales que contienen gluten o que bien pueden contenerlo por efecto de la contaminación cruzada. Los almidones suelen emplearse en la fabricación de comprimidos y cápsulas, catalogados como excipientes en la industria farmacéutica.

En Chile, actualmente se está trabajando en un marco regulatorio para medicamentos libres de gluten. En este contexto, el objetivo de esta actividad formativa fue validar la metodología oficial de análisis para la determinación de gluten en alimentos, método AOAC 2012.01, en muestras No hidrolizadas de excipientes de uso en la industria farmacéutica que puedan contener gluten.

La metodología oficial de análisis que aplica en alimentos, y que tiene validación en almidones, se validó en los excipientes de uso farmacéutico almidón de maíz y almidón de maíz pregelatinizado. Este trabajo se realizó en el laboratorio de gluten y alérgenos alimentarios del Instituto de Salud Pública de Chile (ISPCH). La validación se llevó a cabo siguiendo requisitos de la Norma ISO/IEC 17025:2017 y se establecieron criterios de aceptabilidad. Estos criterios de aceptabilidad en el caso de límites y precisión corresponden a los establecidos en la validación del método oficial, mientras que, para la veracidad, se consideró como recuperación

esperada la indicada en la guía de directrices para los requisitos de rendimiento de métodos estándar, Apéndice F (AOAC, 2016). Se realizaron determinaciones de los parámetros: límite de detección, límite de cuantificación, precisión, veracidad e incertidumbre. Los resultados demostraron cumplir con los criterios de aceptabilidad que se habían establecido para los parámetros evaluados en ambos excipientes farmacéuticos validados. Adicionalmente se efectuaron análisis para evaluar la respuesta del método en una muestra de producto farmacéutico final, en un comprimido trirranurado, el que contenía, dentro de otros excipientes, el almidón de maíz pregelatinizado. Dado los resultados obtenidos en la validación se concluye que es posible que el campo de aplicación del método AOAC 2012.01 pueda ampliarse a la matriz excipiente de uso farmacéutico no hidrolizado y que, por lo tanto, es válido para el fin previsto. El cumplimiento de este objetivo es un aporte técnico al marco regulatorio de los medicamentos libres de gluten, tanto a la industria como a la autoridad regulatoria, considerando la necesidad de complementar el marco regulatorio para medicamentos libres de gluten para que pacientes celíacos puedan mantener una estricta dieta libre de gluten y accedan a medicamentos seguros para su condición.



## **2. Introducción**

### **2.1 Enfermedad celiaca: patogenia, sintomatología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento.**

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía crónica, inmune mediada, gatillada por la ingesta de gluten en personas genéticamente susceptibles (Ludvigsson, 2013). Se desencadena por la ingestión de un grupo de proteínas (prolaminas) presentes en los cereales trigo, cebada, centeno y avena (Doña, 2009). La prolamina del trigo es la gliadina, la del centeno es la secalina, la de la cebada es la hordeína y la de la avena es la avenina (Ministerio de Salud, 2018).

Con la enfermedad, la activación del sistema inmune genera alteraciones histológicas típicas (atrofia vellositaria, hiperplasia de criptas) y funcionales en la mucosa intestinal (Doña, 2009).

Las descripciones clínicas iniciales de EC se centraban en los síntomas digestivos, especialmente diarrea. En la actualidad se ha evidenciado un amplio espectro clínico, incluyendo cuadros asintomáticos, síntomas digestivos y extra digestivos. Dentro de los síntomas digestivos, el dolor abdominal es el síntoma más frecuente en niños. Otros síntomas frecuentes son: diarrea crónica o intermitente, constipación crónica, vómitos, pérdida de peso, distensión abdominal y malnutrición; esta última en caso de diagnóstico tardío. Respecto a las manifestaciones extra digestivas, la presentación más frecuente es la anemia ferropriva (Ortiz et al., 2017).

Dos características epidemiológicas destacan en la EC en las últimas décadas: un aumento significativo de la prevalencia de EC a nivel mundial y un aumento de la detección de casos de EC en adultos (Ministerio de Salud, 2015). En Europa y los EE. UU, la frecuencia media de la enfermedad celíaca (EC) en la población general es aproximadamente del 1% (Catassi et al., 2015), similar a la situación nacional, donde, según la encuesta nacional de salud del año 2010, en Chile se estima una prevalencia del 1%. La prevalencia del 1% fue estimada con la "población susceptible", es decir, que porta o puede desarrollar la enfermedad en

el futuro, de esta forma, cuando la prevalencia es corregida en base a los casos biopsiados, se estima en 0,6% (Ministerio de Salud, 2015).

En casos sospechosos de EC se solicita serología, en búsqueda de anticuerpos anti transglutaminasa (TTG) y anti endomisio (EMA). Estos anticuerpos habitualmente son de tipo IgA y dado que el déficit de IgA es más frecuente en celíacos que en población general, deben determinarse en conjunto con IgA total para validar el resultado. Para la confirmación, deben obtenerse biopsias duodenales mediante endoscopia (Ortiz et al., 2017), y desde que se describió la EC, se mantiene el criterio que la confirmación histológica por biopsia es fundamental para el diagnóstico (Ministerio de Salud, 2015).

Además de la EC, recientemente se han descrito la alergia al trigo (AT) y la sensibilidad no celíaca al gluten (SNCG). Si bien sus formas de presentación clínica y su relación con la ingesta pueden ser similares, sus mecanismos patogénicos, forma de diagnóstico y tratamiento difieren (Ortiz et al., 2017).

Hasta hoy, el único tratamiento efectivo para la EC es la dieta libre de gluten (DLG): estricta, permanente y por toda la vida (Husby et al., 2012). Esto implica excluir de la dieta el trigo, centeno y cebada. Para la AT la dieta LG también es estricta, mientras que para la SNCG la adherencia a una DLG es guiada de acuerdo a la sintomatología.

## **2.2 Dieta libre de gluten y regulación.**

El consumo de productos manufacturados conlleva a asumir riesgos potenciales a los pacientes celíacos, ya que el gluten puede ser añadido a un producto como ingrediente, aditivo, o bien éste puede contenerlo por razones tecnológicas del proceso de fabricación. Por lo tanto, el gluten puede estar presente no sólo en los productos elaborados a partir de las harinas de trigo, cebada, centeno y avena, como pan, pastas, pasteles y galletas, sino también en embutidos y derivados cárnicos, salsas, aperitivos, golosinas, comidas preparadas, e incluso, en ciertos medicamentos como excipiente (González et al., 2007).

El mercado mundial de los productos sin gluten ha tenido un aumento sin precedente en los últimos años, que se explica por el aumento significativo que han tenido los problemas de salud relacionados con la ingesta de gluten: EC, SNCG y AT, además de un grupo creciente de personas aparentemente sanas que optan por una dieta sin gluten por considerarla más saludable. Para este último grupo los requerimientos son distintos, por lo que parte del aumento del mercado ha sido en base de productos sin control adecuado de su contenido de gluten (Estévez & Araya, 2016).

El contenido de gluten en alimentos libres de gluten se encuentra normado a nivel internacional. La norma CODEX STAN 118/1979 y la normativa de la Comunidad Europea reconocen como alimentos “exentos de gluten” a los que contienen hasta 20 mg/kg y como reducidos en gluten a los que contienen entre 20 y 100 mg/kg. La Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA) define como alimentos libres de gluten a aquellos con un máximo de 20 mg/kg. Australia y Nueva Zelanda distinguen como alimentos libres de gluten a aquellos que no contienen gluten detectable y como bajos en gluten a los que no superan los 20 mg/kg de gluten. En Argentina, el máximo permitido por el Código Alimentario Argentino es de 10 mg/kg para “alimentos libres de gluten”, lo que también se aplica a alimentos libres de gluten provenientes de los países miembros del MERCOSUR (Pellicer et al., 2014).

En Chile, la regulación de los alimentos libres de gluten está establecida en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) (Ministerio de Salud, 2018). El RSA fija los requerimientos que deben cumplir los productos que portan un rótulo “libre de gluten”. Establece que un alimento libre de gluten es aquel que está preparado únicamente con ingredientes que por su origen natural y por la aplicación de buenas prácticas de fabricación - que impidan la contaminación cruzada – no contiene prolaminas procedentes de trigo, centeno, cebada, ni sus variedades cruzadas, así como también de la avena. Además, explicita que el término “libre de gluten” sólo podrá utilizarse cuando el resultado del análisis de laboratorio del

producto, para su entrega al consumidor final, no supere un límite de corte, el que actualmente es de 5 mg/kg de gluten.

La certificación de alimentos libres de gluten en el país actualmente la realizan la Corporación de apoyo al Celiaco COACEL y la Fundación de intolerancia al Gluten CONVIVIR. Ambas son Instituciones sin fines de lucro que contribuyen a mejorar la calidad de las personas diagnosticadas con esta enfermedad en Chile.

En cuanto a los medicamentos, siendo el único tratamiento una DLG, las personas con EC han de tener presente que los medicamentos también pueden contener gluten (Dávila, 2018). Esto es especialmente importante en aquellos medicamentos que son parte de tratamientos muy prolongados, como en ciertas patologías crónicas neurológicas, ente otras (Doña, 2009). Algunas personas con enfermedad celíaca han enfrentado dificultades cuando intentan determinar si medicamentos específicos contienen gluten. Ante la incertidumbre, los pacientes pueden renunciar a medicamentos importantes en lugar de arriesgarse a una reacción adversa al gluten (FDA,2017).

En los medicamentos, la fuente principal de proteínas tóxicas proviene del uso de almidón. El almidón es una macromolécula compuesta por amilosa y amilopectina. Suele emplearse como excipiente en la industria farmacéutica, en la fabricación de dosis sólidas orales (comprimidos y cápsulas) en donde se utiliza como aglutinante, diluyente y desintegrante. El almidón se produce de harinas de diversas fuentes (maíz, papa, arroz, tapioca y trigo), mediante la extracción a partir de las fuentes vegetales con procesos de molienda gruesa, lavado, tamizado húmedo y separación por centrífuga. El almidón húmedo obtenido de estos procesos se seca y se muele para el uso en las formulaciones farmacéuticas (Raymond C Rowe., 2006).

Según el análisis realizado por Dávila (2018), se detectó que, de los 8 titulares de registro sanitario en el país encuestados, y que respondieron a la pregunta: ¿qué tipo de almidón emplean en sus productos?, el 100% declaró utilizar almidón de maíz. Existe además un tipo de almidón llamado “pregelatinizado”, utilizado

ampliamente en la industria farmacéutica principalmente como un aglutinante. El proceso de gelatinización es una transición de orden–desorden que sufren los polímeros de almidón sometidos a procesos de calentamiento, lo cual tiene gran impacto en el procesamiento, calidad y estabilidad de los productos basados en almidón (Pineda et al., 2010).

El almidón pregelatinizado es un almidón que ha sido químicamente y/o mecánicamente procesado para romper todo o parte de los gránulos de almidón y así hacer que el almidón sea fluido y directamente compresible.

Los almidones pregelatinizados de calidad alimentaria se preparan calentando una suspensión acuosa que contiene hasta un 42 % p/p de almidón a 62–72°C. Aditivos químicos también pueden ser incluidos para controlar la rehidratación o minimizar la pegajosidad durante el secado. Después del calentamiento, la suspensión se puede secar por aspersión, por rodillo, extruido o secado en tambor. En este último caso, el material seco puede procesarse para producir un rango de tamaño de partícula deseado. Los grados farmacéuticos de almidón totalmente pregelatinizado no utilizan aditivos y el almidón parcialmente pregelatinizado es producido al someter el almidón humedecido a presión mecánica. El material resultante se muele y la humedad el contenido se ajusta a las especificaciones (Raymond C Rowe., 2006).

Una importante cantidad de excipientes farmacéuticos existen. En el Handbook of Pharmaceutical Excipients (Raymond C Rowe., 2006) se describen un total de 832 excipientes. Los proveedores de excipientes han desarrollado nuevas mezclas y nuevas formas físicas para mejorar sus propiedades. Algunos procesos de manufactura de estos excipientes contemplan la hidrólisis enzimática, como el aspartamo, ácido benzoico, celulosa microcristalina, dióxido de silicio coloidal y glucosa líquida, entre otros. No aplica este proceso a almidones comunes ni pregelatinizados, que son los mayoritariamente declarados en el análisis realizado por Dávila, (2018).

En la industria del almidón de trigo el control de calidad de rutina se hace mediante la medida del contenido de proteínas totales, y antiguamente esto se correlacionaba con el contenido de gliadinas. Sin embargo, se demostró que esto no es exacto, y que para garantizar que el producto es libre de gluten se debe determinar el contenido de gliadinas (Doña, 2009).

Es importante considerar, además, que las materias primas libres de gluten pueden eventualmente contaminarse con gluten en cualquiera etapa de la cadena productiva (Dávila, 2018).

Respecto a la regulación, algunas normativas internacionales obligan a declarar a los laboratorios farmacéuticos si el gluten está presente como excipiente de los medicamentos. En Europa, excipientes que contienen gluten se acogen las indicaciones generales para la declaración de excipientes de “declaración obligatoria”, cuyo origen es la necesidad de incluir advertencias/ precauciones de uso en el rotulado y folletos de información al paciente/ profesional asociado a la presencia de ciertos excipientes que constituyen la formulación, cuyo conocimiento resulta necesario para garantizar el uso seguro de los medicamentos (EMA,2017).

En España, por ejemplo, todos los medicamentos que contengan almidón de arroz, maíz o patata y sus derivados deben incluir información al respecto en el etiquetado (la caja del medicamento), su prospecto y su ficha técnica, para que el paciente esté informado de la planta de procedencia del almidón usado como excipiente (Ministerio de Sanidad, consumo y bienestar social, 2018). Ellos establecen que esos excipientes no contienen gluten, y serían aptos para los pacientes celíacos. Cuando se trata de excipientes que pueden contener gluten, como el almidón de trigo, cebada, avena, centeno o triticale y derivados, debe incluirse siempre la información sobre su contenido. Conocida la concentración, se diferenciará la información de acuerdo a un límite de corte del contenido de gluten, que para su regulación es de 20 mg/kg.

El marco regulatorio aplicable a productos farmacéuticos en Chile solo exige que los titulares de registro sanitario (TRS), realicen la declaración cuali cuantitativa de la fórmula y la declaración cualitativa de los excipientes utilizados y eliminados en el proceso de fabricación, lo que no es suficiente para asegurar que un producto farmacéutico sea libre de gluten, ya que no declara la cantidad de gluten que pueda estar contenido en los excipientes y tampoco existe un método de certificación que asegure ausencia de contaminación cruzada en el proceso de manufactura (Dávila, 2018).

Aun cuando no existe un método de certificación, la guía clínica de MINSAL (Ministerio de Salud, 2015) recomienda que se sugiera a los pacientes celíacos se informen periódicamente acerca de la enfermedad, siguiendo listado de productos alimenticios y medicamentos certificados en la página web de COACEL (COACEL, 2019) y CONVIVIR (CONVIVIR, 2019). Este y otros antecedentes fueron recopilados por Dávila (2018), para la formulación de recomendaciones para los productos farmacéuticos libres de gluten nacionales, las que se establecieron en el Informe Técnico sobre aspectos regulatorios internacionales para medicamentos libres de gluten de ANAMED (Instituto de Salud Pública, 2018), donde se señala un límite como punto de corte para declarar un MLG, similar al de la regulación en alimentos, además de indicaciones sobre aplicación de buenas prácticas de manufactura (BPM) para evitar la contaminación cruzada, como también lineamientos para la leyenda “libre de gluten” de los productos.

Del análisis nacional sobre regulación de MLG, se concluyó que las agrupaciones que hoy en día realizan la tarea de generar listado de medicamentos libres de gluten en Chile, no cuentan con los antecedentes necesarios que aseguren ausencia de gluten en los productos farmacéuticos. De este trabajo también se concluye que, en la práctica, según información de la Fundación COACEL, el gluten se mide en el producto final y no se fiscaliza la aplicación de las Buenas prácticas de manufactura BPM (Dávila, 2018)

### **2.3 Buenas prácticas de manufactura (BPM) en la industria de alimentos y medicamentos.**

En la elaboración de alimentos existen diversos puntos críticos susceptibles de provocar la contaminación con gluten de los alimentos cuando en la misma fábrica o cadena de producción se elaboran productos con y sin gluten (González et al., 2007). En la regulación nacional de alimentos libres de gluten, el RSA (Ministerio de Salud, 2018) establece a modo general “que los establecimientos de producción, elaboración, preservación y envase de alimentos deberán cumplir con las Buenas Prácticas de Fabricación” (BPF). Y luego, en específico establece en su artículo 516 que para efectos de la inclusión en el rótulo de la leyenda “Libre de Gluten” los elaboradores de alimentos libres de gluten deberán contar con un programa de buenas prácticas de fabricación, con el fin de asegurar la no contaminación con los derivados de trigo, centeno, cebada y avena en los procesos, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización del producto final.

En la manufactura de medicamentos, el mismo riesgo de contaminación cruzada podría estar presente. El gluten de trigo podría ser introducido en un producto farmacológico oral como un contaminante adventicio (por ejemplo, como resultado del contacto con gluten durante la fabricación, procesamiento, transporte o almacenamiento). Aun existiendo este riesgo, se espera que cualquier gluten presente de forma adventicia en el fármaco oral estaría presente por debajo de los límites de detección asociados con los métodos de prueba analíticos actuales. Además, la regulación de buenas prácticas de manufactura para productos farmacéuticos refleja una obligación básica de evitar la contaminación de un medicamento que se está procesando (FDA, 2017). En la industria farmacéutica, las BPM son lineamientos generales que rigen desde aspectos administrativos hasta la ejecución de las instrucciones preestablecidas y procesos productivos. Aseguran que los productos se fabrican de forma adecuada, uniforme y controlada y están orientadas a disminuir riesgos inherentes en cualquier producción farmacéutica, dichos riesgos son



esencialmente de dos tipos: contaminación (de contaminantes inesperados) y mezclas (confusión). Su óptimo cumplimiento es un requisito en la mayoría de las normativas que regulan el contenido de gluten en los medicamentos (Dávila, 2018).

En Chile, para la industria farmacéutica, las BPM están normadas en la norma técnica N°127 del MINSAL: "Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para la Industria de Productos Farmacéuticos" (Ministerio de Salud, 2013) y no existen en ella indicaciones específicas respecto a riesgos de contaminación cruzada con gluten, u otro excipiente que tenga acción o efecto en determinadas circunstancias.

#### **2.4 Metodologías para la determinación de gluten.**

Las técnicas analíticas de detección de gluten son las herramientas con las que cuentan las asociaciones de celíacos y la industria agroalimentaria para realizar un control de la presencia de gluten en los alimentos

Para proteger a los consumidores sensibles al gluten, se necesita el desarrollo de métodos analíticos confiables que permitan la detección de gluten en varios productos alimenticios. Existen técnicas como los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la técnica PCR, Western Blot, espectrometría de masas, cromatografía y tiras inmunocromatográficas (González et al., 2007).

Actualmente, el ELISA es probablemente la metodología más extendida. La técnica ELISA (del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) consiste en un ensayo basado en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). Es un método inmunológico clásico, enormemente utilizado para una gran cantidad de aplicaciones. En el caso de la detección de gluten se utilizan anticuerpos que reconocen fragmentos presentes en las proteínas del gluten (antígeno). Existen distintos tipos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados en la detección de

gluten los ensayos tipo sándwich y los ensayos competitivos (González et al., 2007).

El método ELISA basado en el anticuerpo R5 ha recibido el estado de tipo I en el Codex Alimentarius (Henrottin et al., 2019). Esto está indicado en la Norma Internacional de Alimentos (2008) relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten CODEX STAN 118 – 1979. El documento indica que el anticuerpo utilizado debería reaccionar a las fracciones de las proteínas de los cereales que son tóxicas para las personas intolerantes al gluten y no deberían reaccionar a otras proteínas de los cereales ni a otros constituyentes de los alimentos o ingredientes. En este sentido, el anticuerpo R5 reconoce un fragmento de 5 aminoácidos ampliamente repetido en el gluten, el epítotope QQFPF, potencialmente celíaco-tóxico, contenido en la gliadina de trigo y otras prolaminas (Valdés et al., 2003). Este método fue recomendado al CODEX por el Grupo de Trabajo sobre Análisis y Toxicidad de la Prolamina (PWG).

El método ELISA R5 está disponible comercialmente en dos versiones, como un ELISA sándwich para proteínas de gluten intactas con al menos dos epítotos de unión y como un ELISA competitivo para el gluten parcialmente hidrolizado (péptidos de gluten), que necesitan un solo epítotope para unirse. ELISA sándwich es el método de elección para alimentos no hidrolizados, mientras que el ELISA competitivo lo es para medir gluten en alimentos parcialmente hidrolizados (Lacorn & Weiss, 2015). El ELISA sándwich es método oficial AOAC 2012.01 para productos en base a arroz y cereales, soya, almidones, pseudo cereales, legumbres, especias, jugo, queso crema, pesto, carne, galletas, postres, queques, pescado, pan dulces y papas. El ELISA competitivo es método oficial AOAC 2015.05 para cerveza, syrup de almidón, jarabe de malta, masa madre y salsa de soya.

Ambos ELISA cuantifican gliadina. El contenido de gluten de una muestra se puede calcular a partir del valor de gliadina, ya que la gliadina generalmente representa el 50% de las proteínas presentes en el gluten. Los valores de gluten

pueden expresarse en mg / kg multiplicando el valor de gliadina por 2(AOAC, 2106). El análisis en el ELISA sándwich cubre un rango de concentración de 5 a 80 mg de gluten /kg, mientras que el competitivo entre 10 y 270 mg de gluten /kg (Lacorn & Weiss, 2015). Siguiendo directrices de AOAC Internacional, ambos métodos fueron sometidos a estudios colaborativos internacionales para su validación.

## **2.5 Aseguramiento de la validez de los resultados.**

La Norma NCh ISO/IEC ISO 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, especifica, como bien dice su título, los requisitos de imparcialidad y operación coherente de los laboratorios (ISO, 2017). En su requisito 7.7 Aseguramiento de la validez de los resultados, la Norma señala varias herramientas para realizar el seguimiento de la validez de los resultados. El uso de materiales de referencia o de materiales control de calidad es una de esas herramientas. Un material de referencia (MR) es un material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas. El examen de una propiedad cualitativa comprende la asignación de un valor a dicha propiedad y de una incertidumbre asociada, cuando se trata de un material de referencia certificado. (Instituto de Salud Pública de Chile, 2022).

Para la determinación de gluten existe un material de referencia que se ha producido bajo la dirección del Grupo de Trabajo de Prolaminas (PWG). La gliadina de este material se extrajo de una mezcla de 28 cultivares de trigo europeos. Las albúminas y las globulinas se eliminaron por extracción con solución de NaCl 0,4 M y las gliadinas se extrajeron con etanol al 60%. Los extractos de gliadina se concentraron, se desalinizaron por ultrafiltración, se secaron por congelación y se homogeneizaron. El material residual después de la liofilización se denomina PWG-gliadina (Holanda, 2023).

El Grupo de Trabajo de Prolaminas (PWG) fue fundado en 1985 y tiene como objetivo realizar y coordinar investigaciones sobre el análisis del gluten en los alimentos y sobre la evaluación de los aspectos clínicos y nutricionales de la enfermedad celíaca. Un grupo internacional de médicos, químicos, científicos de alimentos y nutricionistas trabajan juntos para lograr este objetivo.

El método de ensayo que describe todos los pasos a seguir para realizar esta determinación contiene un apartado con el detalle del aseguramiento de la calidad que permitirá aceptar o no los resultados de un batch de análisis. En el método de ensayo código dentro del sistema de gestión de calidad del ISPCH, 761.00.219 se establece, además del uso de material de referencia para efectuar fortificados en matriz y controlar la veracidad del método: participación periódica y de acuerdo a disponibilidad en ensayos de aptitud, demostración de la precisión con evaluación del CV% de muestras en duplicado y duplicados de cada estándar de la curva de calibración.

## **2.6 Validación y verificación de métodos de ensayo.**

La validación de un método de ensayo es un requisito importante en la práctica del análisis de laboratorio.

La Norma NCh ISO/IEC ISO 17025 (2017) define validación como una verificación, cuando los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto. Y define, además, verificación, como la aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados. **Validar es demostrar, a través de evidencia empírica, de que un laboratorio puede desempeñar de manera satisfactoria un método normalizado, un método normalizado estandarizado o un método alternativo validado, en el propio ambiente del laboratorio, de acuerdo a las características de desempeño analítico de este. Muy generalmente se indica que un laboratorio debe validar los métodos: no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como**

**las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.** La validación o verificación, debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de la aplicación dados (Instituto de Salud Pública de Chile, 2018)

La Guía técnica Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “*Aspectos generales sobre la validación de métodos*”, define a un método normalizado como el método apropiado para el ensayo dentro de su alcance, publicado por organismos de normalización internacional, nacional o regional -ISO, EN, NM, ASTM, BS, DIN, IRAM, etc.- o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos - AOAC, FIL-IDF, EPA, USP etc.- (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

Antes de realizar una validación o verificación de cualquiera de los métodos antes mencionados, la aportación de evidencias objetivas del método, se debe asegurar con trazabilidad metrológica de los equipos, instrumentos y materiales de referencia utilizados (Instituto de Salud Pública de Chile, 2018).

La trazabilidad metrológica es la propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida. En esta definición, la referencia puede ser la definición de una unidad de medida, mediante una realización práctica, un procedimiento de medida que incluya la unidad de medida cuando se trate de una magnitud no ordinal, o un patrón (Ministerio de Industria, Energía y Turismo, 2012).

Respecto a los parámetros que se consideran para validar o verificar un método de ensayo, la Norma NCh ISO/IEC ISO 17025 (2017) especifica como una nota que las técnicas utilizadas para la validación pueden ser una de las siguientes o una combinación de ellas: a) calibración o evaluación del sesgo y precisión utilizando patrones de referencia o materiales de referencia, b) una evaluación

sistemática de los factores que influyen en el resultado, c) robustez del método de ensayo a través de variación de parámetros controlados, d) la comparación de resultados obtenidos con otros métodos validados, e) las comparaciones interlaboratorio, f) la evaluación de la incertidumbre de la medición de los resultados basada en la comprensión de los principios teóricos de los métodos y en la experiencia práctica del desempeño del método de muestreo o ensayo.

En general, los parámetros considerados para validar metodologías del tipo ELISA (kit) incluyen (Instituto de Salud Pública de Chile, 2022):

#### 2.6.1 *Determinación de límites*: límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

LOD es la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones establecidas del ensayo (Anexo A Guía Eurachem). La determinación del LOD en algunos casos se realiza con una función que permite extrapolar a la respectiva concentración del analito, valores en densidad óptica de matrices cero, para luego estimar el LOD como la media calculada más 3 veces la desviación estándar de las mediciones. La opción de función comúnmente utilizada es la polinómica de segundo grado.

LOQ es la menor concentración de un analito en matriz, que puede determinarse con una exactitud aceptable, bajo las condiciones establecidas del ensayo (Anexo A Guía Eurachem). La determinación del LOQ puede ejecutarse registrando mediciones de un fortificado en matriz en el nivel del límite de cuantificación declarado por el fabricante. En algunos casos, en paralelo se puede medir el estándar cuya concentración equivale al LOQ a verificar, para evaluar que los rangos de muestras fortificadas medidos, son similares al rango del estándar.

2.6.2 *Determinación de la precisión:* La precisión se establece en términos de repetibilidad (variación intraensayo) y reproducibilidad intralaboratorio.

*Precisión:* es la proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas. Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad.

*La repetibilidad o variación intraensayo:* es precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis con los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, con mediciones repetidas en un periodo corto de tiempo.

*La reproducibilidad intralaboratorio:* es precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad, donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis, pero con diferentes condiciones de laboratorio, operadores, equipo, etc.

Para la determinación de ambos parámetros, en general las indicaciones hacen referencia a mediciones del analito en un fortificado en matriz, material de referencia o material control, según disponibilidad.

Los niveles de concentración medidos deben considerar el límite de cuantificación declarado por el fabricante, y otras dos concentraciones en el intervalo de trabajo (nivel medio y alto). A continuación, se calculan la Desviación Estándar (DE) y el porcentaje de coeficiente de variación (CV%) entre mediciones. En general se utilizan entre 6 y 15 réplicas para el cálculo de la precisión.

Desviación estándar (s, S) es el promedio de lejanía de los valores obtenidos (lecturas) respecto del promedio.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Siendo:

x = valor de una lectura.

X= promedio de la totalidad de lecturas.

n = número de lecturas

Coefficiente de Variación (CV) es la desviación estándar dividida por la media.

También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje:

$$\%CV = \frac{S \times 100}{X}$$

Siendo:

S = desviación estándar de las lecturas.

X = promedio de la totalidad de lecturas.

El intervalo de trabajo es el intervalo entre el nivel más bajo y más alto de concentración que ha sido demostrado que puede ser determinado con la precisión y exactitud requeridas para una determinada matriz.



2.6.3 *Determinación de la Veracidad:* Para calcular este parámetro, se puede calcular sesgo (b) o porcentaje de recuperación (%R).

El sesgo es la estimación de un error de medición sistemático, o la diferencia sistemática entre el valor cuantitativo. Para su estimación se utiliza un material de referencia o material control equivalente a la matriz de estudio, siempre que sea posible. A continuación, se compara la concentración promedio obtenida de las mediciones con la asignada al Material, según la siguiente fórmula:

$$b = \text{Promedio} - \text{Valor MR}$$

Se recomiendan las pruebas estadísticas de significancia para evaluar la aceptación del sesgo (b). Se puede realizar el análisis de los datos aplicando estadístico "t de student" con un  $\alpha = 0.05$ , de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$t_{(n-1, \alpha/2)} = \frac{[(\bar{X} - \mu)] * \sqrt{n}}{s}$$

Donde:

$\bar{X}$  = promedio de las mediciones del material

M = media certificada del material de referencia

n-1 = grados de libertad

s = desviación estándar

La estimación del sesgo también se puede evaluar por el porcentaje de recuperación del material, según la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Promedio} * 100}{\text{Valor MR}}$$

Valor MR

La recuperación es la fracción de la sustancia agregada a una muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. Para la recuperación se utilizan fortificados de matrices blanco. Para estimar este parámetro se compara la diferencia de concentración entre el valor promedio de las muestras fortificadas ( $x'$ ) y el valor promedio ( $x$ ) de la concentración adicionada ( $x_{Ft}$ ). A continuación, se calcula el porcentaje de recuperación (%R), a varios niveles de concentración, según la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{x' - x}{x_{Ft}} * 100$$

Los niveles de concentración medidos deben considerar el límite de cuantificación declarado por el fabricante, y otras dos concentraciones en el rango de trabajo (nivel medio y alto).

Los fortificados se realizan con uso de un material de referencia. Cuando se realizan fortificados con uso de un material de referencia las evaluaciones de los resultados están sujetos a los criterios de aceptabilidad. Estos criterios son exigencias de una característica de funcionamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados fiables (Instituto de Salud Pública, 2022). Lo anterior aplica para la evaluación de todo parámetro en una validación. Los criterios se establecen en base a una referencia. La guía de directrices para los requisitos de rendimiento de métodos estándar, Apéndice F (AOAC, 2016) considera la recuperación esperada en función de la concentración del analito. El rango de la recuperación media aceptable se expande a medida que disminuye la concentración del analito. El apéndice proporciona una tabla de rangos de recuperación promedio objetivo para concentraciones de analito de 1 ppb a 100%.

2.6.4 *Evaluación de la Incertidumbre*: La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando. (VIM, 2012).

Normalmente solo se exige a un laboratorio que estime la incertidumbre relacionada con aquellos procesos sobre los que ejerce un control, esto es, solo aquellos procesos que tienen lugar en el laboratorio si el muestreo no es responsabilidad del personal del mismo. La identificación de las fuentes de incertidumbre de un proceso analítico y la estimación de su valor son un requisito de la Norma ISO 17025:2017. Existen diferentes formas de determinar su valor. El Manual de Laboratorio ORA LAB de la FDA (FDA, 2019) entrega directrices de los siguientes métodos para determinarla:

- a) Determinación de la incertidumbre utilizando la desviación estándar relativa de muestras control. Para esta determinación es requisito fundamental que las muestras pasen por todas las etapas del método para el cual se quiere estimar la incertidumbre. Se debe contar con material de referencia certificado, o material de referencia, o material control interno. De no contar con estos controles, realice determinación de fortificados a diferentes concentraciones, incluyendo en lo posible el nivel regulatorio del analito a determinar. A continuación, se debe calcular la concentración y el porcentaje de recuperación, para luego continuar con la estimación de la desviación estándar y el coeficiente de variación porcentual de los resultados en los que el proceso está bajo control. Finalmente calcular la incertidumbre de la medida a un nivel de confianza del 95% utilizando la siguiente fórmula:

$$U\% = k * CV\%$$

Donde:

U% = Incertidumbre expandida porcentual

k = Factor de cobertura (Para su elección según el número de puntos a considerar (n), utilizar el t estadístico apropiado para un 95% de confianza, de acuerdo a Tabla N° 1 a continuación:

**TABLA N° 1: t de Student para 95% de confianza (2 colas)**

| <b>Grados de libertad (n-1)*</b> | <b>t</b> |
|----------------------------------|----------|
| <b>1</b>                         | 12,7     |
| <b>2</b>                         | 4,3      |
| <b>3</b>                         | 3,2      |
| <b>4</b>                         | 2,8      |
| <b>5</b>                         | 2,6      |
| <b>6</b>                         | 2,4      |
| <b>8</b>                         | 2,3      |
| <b>10</b>                        | 2,2      |
| <b>20</b>                        | 2,1      |

\*Para grados de libertad intermedios, se puede utilizar el valor inferior más próximo

Para expresar el valor de incertidumbre medido en unidad de concentración, utilizar la siguiente fórmula

Valor de incertidumbre en unidad de concentración =

(Valor de concentración \* U%)/100

- b) Determinación de la incertidumbre utilizando el método de la raíz de la suma de los cuadrados. Esta forma de estimar la incertidumbre total es por medio de la suma de las varianzas de las incertidumbres estándares o incertidumbres estándares relativas de los diferentes componentes. Para lo anterior se debe especificar el mesurando, revisar el método e identificar posibles fuentes de incertidumbre y cuantificar los componentes.

La estimación puede provenir de diferentes fuentes. Lo anterior se puede hacer mediante la evaluación de la incertidumbre asociada a cada fuente individual, para posteriormente combinarlas, o determinando directamente la contribución combinada a la incertidumbre de los resultados de algunas o todas estas fuentes, usando datos del desempeño del método; estas fuentes pueden incluir: resultados de estudio de verificación/validación, información derivada de cartas control y/o resultados de participación de ensayos de aptitud. En todos estos casos es necesario que los datos utilizados estén bajo control (sin desviaciones).

En el caso de utilizar los datos de desempeño del método para calcular la incertidumbre, se deberá calcular la incertidumbre derivada de la precisión y la derivada del sesgo. Lo anterior dado que, los estudios de precisión y veracidad tienen en cuenta la influencia de prácticamente todas las fuentes de incertidumbre debido a que las muestras que participan de estos estudios abarcan todo el método de ensayo, por lo que abarcan los aportes de las fuentes de manera unitaria.

Una vez determinados los valores de incertidumbre de los componentes, se deben combinar, por medio de la raíz de la suma de los valores al cuadrado de cada componente. A partir de este cálculo se obtiene el valor de incertidumbre combinada, la que puede ser estándar o relativa (según si está expresada en el valor de concentración o en porcentaje respectivamente).

$$U_c = \sqrt{u_{\text{bias}}^2 + u_R^2}$$

Una vez determinado el valor de incertidumbre combinada, se debe expandir este valor, multiplicando por el factor de cobertura ( $k$ ) necesario. Un nivel de confianza del 95% es suficiente para los fines de esta sección, por lo que en ese caso aplica un  $k = 2$ . Cuando la estimación de la incertidumbre se base en escasos datos, el factor de cobertura podrá variar de acuerdo a la distribución de  $t$  de student. Para un  $n$  de datos igual o mayor a 50, el factor de cobertura podrá ser de valor 2, en caso de contar con una cantidad inferior de datos, utilizar el valor de factor de cobertura de acuerdo a la Tabla N°1 anterior.

### **3. Objetivo general**

Validar la metodología oficial de análisis para la determinación de gluten **en muestras No hidrolizadas** de excipientes de uso en la industria farmacéutica, que puedan contener gluten.

#### **3.1 Objetivo específicos**

3.1.1 Determinar los parámetros de validación límite de detección, límite de cuantificación, precisión, veracidad e incertidumbre en las matrices almidón de maíz y almidón de maíz pregelatinizado

3.1.2 Evaluar el comportamiento del método con una muestra farmacéutica comercial que contiene almidón de maíz pregelatinizado como excipiente.

## 4 Metodología

El cumplimiento del objetivo de esta actividad formativa equivalente a tesis se llevó a cabo en el laboratorio de gluten y alérgenos alimentarios del ISPCH, Departamento Nacional de Referencia en Salud Ambiental.

### 4.1 Muestra:

Se seleccionaron excipientes de la industria farmacéutica en base alimentaria (almidones) y que de acuerdo a la bibliografía revisada tuvieran relevancia en Salud Pública como excipiente de uso en los medicamentos.

Con antecedentes de un estudio de 2018 que encuestó a titulares de registro sanitario sobre los excipientes de mayor uso en medicamentos en formato comprimidos, se seleccionaron para este estudio los excipientes **almidón de maíz y almidón de maíz pregelatinizado**. Estos excipientes no son hidrolizados

Además, para la evaluación de un producto farmacéutico comercial, detallada en el punto 4.4, se seleccionó un medicamento en presentación de comprimido que contuviera alguno de los excipientes en los que la validación se ejecutó y que tuviera relevancia en salud pública. Se seleccionó la muestra **comprimido trirranurado de clotiazepam 0,5 mg**, el que contiene como excipiente el almidón de maíz pregelatinizado. Todas las muestras fueron obtenidas con la cooperación del Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control de la Agencia Nacional de Medicamentos ANAMED.

Las fichas técnicas de estas muestras se presentan en los anexos 1, 2 y 3.

### 4.2 Método de ensayo aplicado:

Metodología oficial para la determinación de gluten en muestras No hidrolizadas: método de ensayo AOAC 2012.01 con uso del Kit RIDASCREEN® Gliadin R7001. Esta metodología de ensayo se encuentra documentada dentro del sistema de



gestión de calidad del ISPCH con el código interno ME-761.00-219 de la Sección química de alimentos. Para la ejecución de los ensayos para la estimación de los parámetros de validación se realizaron repetidos procesos de extracción y análisis (lectura) de muestras.

#### 4.2.1 Extracción de muestras:

Para la extracción de la muestra se pesó 0,25 g de muestra molida sólida en un vial a la que se agregaron 2,5 mL de solución extractante (solución cóctel). A continuación, la muestra fue incubada en un baño termorregulado en agitación durante 40 min a 50 °C para luego dejar enfriar y mezclar con 7,5 ml de etanol al 80 %. A continuación, el vial fue agitado de forma rotatoria durante 1 h a temperatura ambiente y luego centrifugado por 10 min a 2500 g a temperatura ambiente. El sobrenadante (extracto) fue traspasado a un nuevo vial y reservado para su análisis. A continuación, el extracto es diluido 1:12,5 con solución de dilución de muestra. Se utilizaron luego 100 µL por pocillo en el ensayo.

#### 4.2.2 Análisis de muestras:

Los contenidos del Kit de ensayo fueron llevados a temperatura ambiente. Se insertaron la cantidad suficiente de pocillos necesarios en el soporte de micropocillos para todos los estándares y muestras a ejecutar. Se agregaron 100 µL de cada solución estándar o muestra preparada a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el contenido de los pocillos fue descartado y estos fueron llenados con 250 µL de solución de lavado diluido. Este paso fue repetido otras dos oportunidades. A continuación, se agregaron 100 µL del conjugado marcado con enzima diluido a cada pocillo, y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente para seguir con un nuevo proceso de lavado de los micropocillos con solución de lavado. A continuación, se agregaron 50 µl de sustrato y 50 µl de cromógeno a cada pocillo para luego incubar durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo de incubación los micropocillos positivos desarrollaron un color azul, lo que indica la presencia de gliadinas. Se agregaron a continuación 100 µL de reactivo de

detención. Finalmente se leyeron absorbancias en un lector de microplacas ELISA con una OD de 450 nm.

Para el cálculo de los resultados se utilizó una planilla Excel validada para el procesamiento de los datos.

#### **4.3 Parámetros de validación aplicados y sus criterios de aceptabilidad.**

En cada muestra se realizaron análisis para la estimación de: límite de detección, límite de cuantificación, precisión, veracidad e incertidumbre. El número de análisis por parámetro fue igual a 10. En algunos casos, datos obtenidos para la estimación de un parámetro fueron utilizados para la evaluación de otro. Los parámetros de validación que se consideraron realizar siguieron directrices de la Norma ISO/IEC 17025 (2017). De acuerdo a la Norma se documentó un plan de validación en el que se especificaron las pruebas a realizar y los criterios de aceptación para los parámetros y variables estadísticas comprometidas.

La aceptabilidad de las variables estadísticas aplicadas en la validación correspondió a las declaradas por el fabricante del kit en su validación (R-Biopharm, 2016) y a las señaladas en el apéndice F de la AOAC (AOAC, 2016).

Previo a la determinación de los parámetros de validación cada una de las muestras fue analizada 10 veces con fin de establecer si estas correspondían a una “matriz cero”. Una “matriz cero” no debería contener cantidades cuantificables de gluten, y debiera ser “libre de gluten” según el límite regulatorio especificado en el Art 518 del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA). Dado que las muestras que se validaron tienen un origen farmacéutico, y que el criterio de aceptabilidad para declarar un excipiente como libre de gluten no está aún abordado en la regulación farmacéutica nacional, se estableció el criterio de aceptación con la regulación que aplica a alimentos (RSA), por lo tanto, una “matriz cero” debía contener menos de 5 mg/kg de gluten.

Una vez que se determinó que las muestras eran “libres de gluten” se dio inicio a la determinación de los parámetros de validación.

4.3.1 Límite de detección (LOD): para ambas muestras los datos obtenidos del ensayo “matriz cero” se analizaron con una función polinomial de segundo grado, para luego estimar la media de las concentraciones obtenidas (mg/kg de gliadina) y sumar 3 desviaciones estándar.

No se consideró la aplicación de un criterio de aceptabilidad para este parámetro ya que de acuerdo a la validación del método oficial (R-Biopharm, 2016) este parámetro es matriz dependiente.

4.3.2 Límite de cuantificación (LOQ): para ambas muestras se realizaron fortificados en matriz en el nivel 5 mg/kg de gluten. Esta concentración corresponde al LOQ declarado por el proveedor del Kit de análisis. Para fortificar se utilizó un material de referencia del Prolamin Working Group (MR-PWG). El material fue preparado de acuerdo a las instrucciones de su proveedor y llevado a una concentración de trabajo 10 µg/mL. Una alícuota de 63 µL fue adicionada a las muestras para continuar con el proceso de la metodología de acuerdo al punto 4.3.

El criterio de aceptabilidad de este parámetro fue obtener el valor de LOQ declarado por el proveedor del Kit de análisis con una recuperación aceptable entre 80 y 110% y con un CV% menor o igual al determinado en la validación del método oficial (R-Biopharm, 2016).

4.3.3 Precisión como repetibilidad intralaboratorio. para ambas muestras se realizaron fortificados en diferentes niveles de concentración. En el caso del almidón de maíz en el nivel 5 mg/kg, 40 mg/kg y 80 mg/kg de gluten. En caso del almidón de maíz pregelatinizado en el nivel 5 mg/kg y 40 mg/kg de gluten. Para fortificar se siguieron pasos indicados en el punto 4.3.2. De acuerdo al nivel de fortificación, se ajustó la alícuota de material a adicionar a las muestras. Las muestras continuaron

con el proceso de la metodología de acuerdo al punto 4.2. Este proceso fue realizado en condiciones de repetibilidad intralaboratorio: participó un analista en el proceso de extracción y un analista en el proceso de análisis, actividades realizadas en un mismo día por cada uno.

Una vez obtenidas las concentraciones en cada nivel, se estimaron los coeficientes de variación (CV%).

El criterio de aceptabilidad de este parámetro fue obtener un CV% igual o inferior al determinado en la validación del método oficial (R-Biopharm, 2016). Los CV% obtenidos en la validación fueron diferentes de acuerdo al nivel de concentración, pero para este estudio se consideró el mayor de los CV% obtenidos que fue de un 14%.

4.3.4 Precisión como reproducibilidad intralaboratorio: para ambas muestras se realizaron fortificados en diferentes niveles de concentración. En el caso del almidón de maíz en el nivel 5 mg/kg, 40 mg/kg y 80 mg/kg de gluten. En caso del almidón de maíz pregelatinizado en el nivel 5 mg/kg y 40 mg/kg de gluten. Para fortificar se siguieron pasos indicados en el punto 4.3.2. De acuerdo al nivel de fortificación, se ajustó la alícuota de material a adicionar a las muestras. Las muestras continuaron con el proceso de la metodología de acuerdo al punto 4.. Este proceso fue realizado en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio: participó un analista en el proceso de extracción y un analista en el proceso de análisis. Las actividades fueron realizadas en días diferentes y por analistas diferentes a los ensayos para estimar la repetibilidad intralaboratorio.

Una vez obtenidas las concentraciones en cada nivel, se estimaron los coeficientes de variación (CV%). El número de datos para la evaluación fue igual a 20 ya que se consideraron los resultados obtenidos en el ensayo para estimar la repetibilidad intralaboratorio para uno de los días y uno de los analistas.

El criterio de aceptabilidad de este parámetro fue obtener un CV% igual o inferior al determinado en la validación del método oficial (R-Biopharm, 2016). Los CV%

obtenidos en la validación fueron diferentes de acuerdo al nivel de concentración, pero para este estudio se consideró el mayor de los CV% obtenidos que fue de un 14%.

4.3.5 Veracidad en términos de recuperación: con los datos obtenidos en el ensayo para determinar el parámetro repetibilidad intralaboratorio, para cada nivel de fortificado se estimó el % de recuperación.

El criterio de aceptabilidad de este parámetro fue obtener una recuperación entre 80-110% de acuerdo a Apéndice F de la AOAC (AOAC, 2016).

4.3.6 Incertidumbre de la medición: se consideraron las desviaciones estándar relativas de las muestras fortificadas en el nivel 5mg/kg de gluten obtenidas en el ensayo para determinar el parámetro repetibilidad intralaboratorio en la matriz almidón de maíz. El cálculo se realizó utilizando la desviación estándar relativa de las muestras fortificadas en ese nivel, con un nivel de confianza del 95%. Como guía se utilizó el Instructivo de estimación de la incertidumbre de la medición en métodos de ensayo de la sección química de alimentos.

Para el cálculo de los parámetros y la estimación de incertidumbre se utilizó una planilla Excel validada para el procesamiento de los datos.

#### **4.4 Evaluación de la respuesta del método en una muestra de producto farmacéutico comercial.**

Se realizaron ensayos en una muestra de comprimidos trirranurados de clonazepam 0,5 mg. En un mismo batch se analizó 6 veces esta muestra con fin de determinar si correspondía a una “matriz cero”, aplicando directrices señaladas en el punto 4.3 para su evaluación. Además, se incluyeron controles para evaluar la precisión incluyendo un duplicado para el fortificado en el nivel 5 mg/kg de gluten y controles

para evaluar la veracidad, con fortificados en matriz en el nivel 5, 40 y 60 mg/kg de gluten. Para fortificar se siguieron pasos indicados en el punto 4.3.2.

#### **4.5 Materiales, insumos y equipos.**

Reactivos contenidos en el Kit ELISA RIDASCREEN® Gliadin R7001 (placa, estándar de gliadina en 6 diferentes concentraciones: 0, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL de gliadina, anticuerpo conjugado concentrado, sustrato peróxido de urea, cromógeno tetrametilbenzidina, solución de detención 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solución diluyente de la muestra concentrada 20 Mm PBS-Tween, buffer de lavado concentrado 20 mM PBS, solución de cóctel patentado (β- mercaptoetanol e hidrocloreuro de guanidina. Además, material de Referencia del Prolamin Working Group: PWG Gliadin, Etanol p.a ≥ 99.9 %, micropipeta multicanal, micropipetas de volumen variable, tubos Eppendorf de 1,5 mL, tubos de falcon de 15 mL, gradillas para tubos, pizeta de laboratorio y elementos de protección personal (EPP). En cuanto al equipamiento utilizado: espectrofotómetro para placas de ELISA con longitud de lecturas a 450 nm, centrífuga multipropósito o microcentrífuga, agitador orbital, baño termostático, vórtex, balanza analítica y campana extractora de gases.

### **5. Resultados**

#### **5.1 Validación de la metodología oficial de análisis para la determinación de gluten en la muestra excipiente farmacéutico almidón de maíz, grado farmacopea**

Para esta muestra todos los ensayos se realizaron con uso de un mismo Lote de Kit de ensayo, Lote 22300.

Los resultados de las pruebas experimentales realizadas se detallan a continuación:

### 5.1.1 Ensayos para determinar “matriz cero”

El análisis de 10 muestras evidenció que el almidón de maíz corresponde a una matriz cero al no obtener resultados cuantificables de gluten. Los resultados en promedio fueron menores a 5 mg/kg de gluten.

### 5.1.2 Límite de detección:

El límite de detección fue estimado en 1 mg/kg de gluten.

El resumen de los valores obtenidos y los cálculos para la estimación del LOD se detalla en tabla 2 y 3. La gráfica de tendencia de la curva estándar de gliadina v/s la absorbancia para la estimación del LOD se detalla en figura 1.

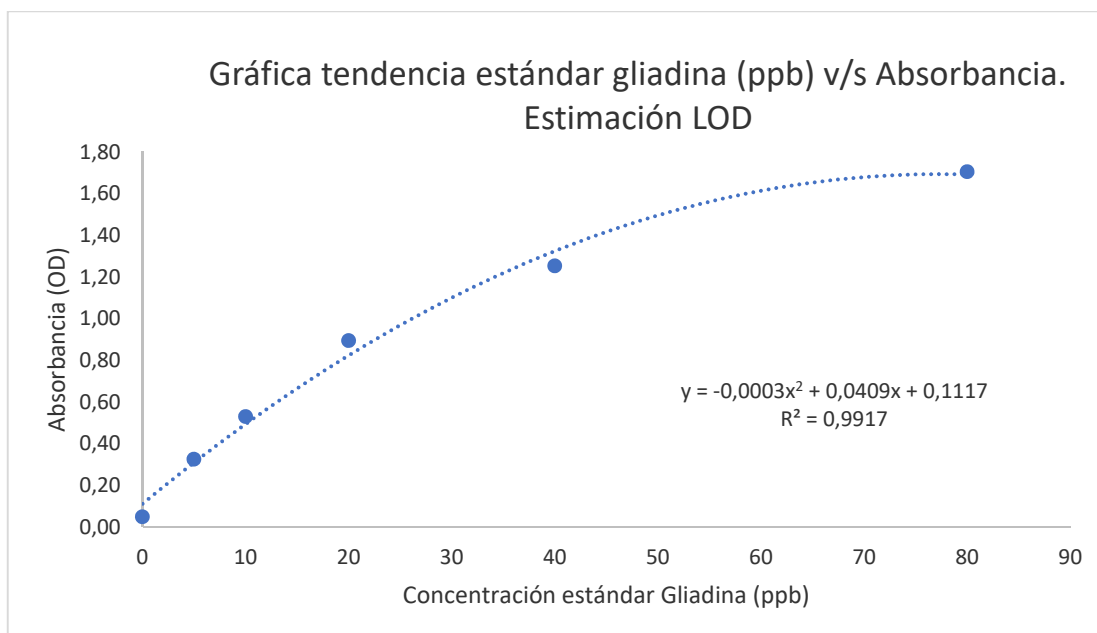
**Tabla N° 2** Resultados ensayos para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz

| <b>Ensayo</b> | <b>Absorbancia 1 (OD)</b> | <b>Absorbancia 2 (OD)</b> | <b>Promedio Absorbancias</b> | <b>Valor X función cuadrática</b> | <b>Concentración (mg/kg gliadina)</b> |
|---------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>1</b>      | 0,10                      | 0,10                      | 0,10                         | -0,27                             | -0,14                                 |
| <b>2</b>      | 0,09                      | 0,09                      | 0,09                         | -0,48                             | -0,24                                 |
| <b>3</b>      | 0,09                      | 0,10                      | 0,09                         | -0,43                             | -0,22                                 |
| <b>4</b>      | 0,09                      | 0,08                      | 0,09                         | -0,64                             | -0,32                                 |
| <b>5</b>      | 0,09                      | 0,09                      | 0,09                         | -0,55                             | -0,28                                 |
| <b>6</b>      | 0,08                      | 0,08                      | 0,08                         | -0,75                             | -0,37                                 |
| <b>7</b>      | 0,10                      | 0,10                      | 0,10                         | -0,41                             | -0,20                                 |
| <b>8</b>      | 0,09                      | 0,08                      | 0,09                         | -0,662                            | -0,33                                 |
| <b>9</b>      | 0,09                      | 0,08                      | 0,09                         | -0,64                             | -0,32                                 |
| <b>10</b>     | 0,10                      | 0,10                      | 0,10                         | -0,31                             | -0,16                                 |

**Tabla N° 3:** Resultado ensayo curva de calibración (media y desviación estándar) para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.

| <b>Estándar (ng/mL de gliadina)</b> | <b>Absorbancia (OD)</b>              |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>0</b>                            | 0,05                                 |
| <b>5</b>                            | 0,33                                 |
| <b>10</b>                           | 0,53                                 |
| <b>20</b>                           | 0,89                                 |
| <b>40</b>                           | 1,25                                 |
| <b>80</b>                           | 1,70                                 |
| <b>Promedio Absorbancias</b>        | 0,3 mg /kg gliadina                  |
| <b>Desviación estándar (s)</b>      | 0,1 mg/kg gliadina                   |
| <b>s * 3</b>                        | 0,2 mg/kg gliadina                   |
| <b>Promedio + 3s</b>                | 0,5 mg/kg gliadina                   |
| <b>LOD</b>                          | 0,5 mg/kg gliadina (~1 mg/kg gluten) |





**Figura N° 1:** Gráfica de tendencia de la curva estándar de gliadina v/s la absorbancia para la estimación del LOD, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.

### 5.1.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación fue estimado en 5 mg/kg de gluten.

Los criterios de aceptabilidad establecidos fueron aprobados. El valor estimado se corresponde con el valor de LOQ que declara el proveedor, el % de recuperación fue de 95% y el CV% fue menor al obtenido por el proveedor en su validación.

El detalle de los valores obtenidos de cada medición para la estimación se detalla en Tabla 4.

**Tabla N° 4:** Resultado ensayos para la estimación del límite de cuantificación, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.

| <b>Ensayo</b>                                    | <b>Valor obtenido (mg/kg gluten)</b> |
|--|--------------------------------------|
| <b>1</b>   | 4,9                                  |
| <b>2</b>   | 4,8                                  |
| <b>3</b>   | 4,9                                  |
| <b>4</b>   | 4,7                                  |
| <b>5</b>   | 5,1                                  |
| <b>6</b>   | 4,2                                  |
| <b>7</b>   | 4,7                                  |
| <b>8</b>   | 4,7                                  |
| <b>9</b>   | 5,0                                  |
| <b>10</b>  | 4,5                                  |
| <b>Promedio</b>                                  | 4,8 mg/kg gluten                     |
| <b>Desviación estándar (s)</b>                   | 0,3 mg/kg gluten                     |
| <b>N</b>   | 10                                   |
| <b>Coefficiente de variación (CV%)</b>           | <b>5%</b>                            |
| <b>Coefficiente de variación proveedor (CV%)</b> | <b>11%</b>                           |
| <b>Porcentaje de recuperación promedio</b>       | <b>95%</b>                           |

#### 5.1.4 Precisión en términos de repetibilidad Intralaboratorio

Para la estimación de este parámetro en el nivel 5 mg/kg de gluten se consideraron los antecedentes de la determinación del límite de cuantificación.

Los criterios de aceptabilidad determinados fueron aprobados en todos los niveles de fortificación, con un CV% menor al 14, que fue el CV% obtenido por el proveedor en su validación para este parámetro.

Los resultados de la concentración obtenida en cada nivel de fortificación y sus CV% se presentan en tabla 5.

**Tabla N° 5:** Resultados ensayos para la estimación de la repetibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz

| <b>Ensayo</b>            | <b>Valor obtenido<br/>fortificación 5<br/>mg/kg gluten</b> | <b>Valor obtenido<br/>fortificación 40<br/>mg/kg gluten</b> | <b>Valor obtenido<br/>fortificación 80<br/>mg/kg gluten</b> |
|--------------------------|--|---|---|
| <b>1</b>                 | 4,9  | 47,9  | 68,7  |
| <b>2</b>                 | 4,8  | 40,2  | 101,1   |
| <b>3</b>                 | 4,9  | 41,1  | 75,3  |
| <b>4</b>                 | 4,7  | 41,0  | 80,2  |
| <b>5</b>                 | 5,1  | 37,5  | 77,0  |
| <b>6</b>                 | 4,2  | 42,8  | 75,2  |
| <b>7</b>                 | 4,7  | 38,4  | 88,8  |
| <b>8</b>                 | 4,7  | 41,4  | 87,4  |
| <b>9</b>                 | 5,0  | 42,4  | 101,3   |
| <b>10</b>                | 4,5  | 42,9  | 78,4  |
| <b>SD</b>                | <b>0,3</b>   | <b>2,9</b>  | <b>11,1</b>   |
| <b>CV%</b>               | <b>5</b>   | <b>7</b>  | <b>13</b>   |
| <b>CV%<br/>aceptable</b> |  | <b>14%</b>  |   |

#### 5.1.5 Precisión en términos de reproducibilidad intralaboratorio

Para la estimación de este parámetro en todos los niveles de fortificado se consideraron los antecedentes de la determinación de la repetibilidad intralaboratorio (n=10) y se sumaron 10 ensayos más.

Los criterios de aceptabilidad establecidos fueron aprobados en los niveles de fortificación 5 y 40 mg/kg de gluten, con un CV% menor al 14. En el nivel 80 mg/kg de gluten el CV% obtenido fue de 22%, mayor al CV% obtenido por el proveedor en su validación para este parámetro.

Los resultados de la concentración obtenida en cada nivel de fortificación y sus CV% se presentan en tabla 6.

**Tabla N° 6:** Resultados ensayos para la estimación de la reproducibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz

| <b>Ensayo</b>        | <b>Valor obtenido fortificación 5 mg/kg gluten</b> | <b>Valor obtenido fortificación 40 mg/kg gluten</b> | <b>Valor obtenido fortificación 80 mg/kg gluten</b> |
|----------------------|--|---|---|
| <b>1</b>             | 4,8  | 48,0  | 68,7  |
| <b>2</b>             | 4,8  | 40,2  | 101,1   |
| <b>3</b>             | 4,9  | 41,1  | 75,2  |
| <b>4</b>             | 4,7  | 41,0  | 80,2  |
| <b>5</b>             | 5,1  | 37,5  | 77,0  |
| <b>6</b>             | 4,2  | 42,8  | 75,2  |
| <b>7</b>             | 4,7  | 38,4  | 88,8  |
| <b>8</b>             | 4,7  | 41,4  | 87,4  |
| <b>9</b>             | 5,0  | 42,4  | 101,3   |
| <b>10</b>            | 4,5  | 42,9  | 78,4  |
| <b>11</b>            | 4,7  | 47,2  | 142,9   |
| <b>12</b>            | 5,5  | 38,0  | 109,9   |
| <b>13</b>            | 6,0  | 37,0  | 73,1  |
| <b>14</b>            | 4,8  | 37,8  | 110,3   |
| <b>15</b>            | 4,9  | 35,3  | 82,3  |
| <b>16</b>            | 4,4  | 36,2  | 85,0  |
| <b>17</b>            | 5,4  | 37,8  | 111,7   |
| <b>18</b>            | 4,6  | 40,0  | 118,6   |
| <b>19</b>            | 4,8  | 36,5  | 110,0   |
| <b>20</b>            | 4,8  | 35,1  | 69,8  |
| <b>SD</b>            | <b>0,4</b>   | <b>3,6</b>  | <b>19,9</b>   |
| <b>CV%</b>           | <b>8</b>   | <b>9</b>  | <b>22</b>   |
| <b>CV% aceptable</b> |  | <b>14%</b>  |   |

Nota 1: la prueba Q de Dixon, utilizada para identificar y rechazar valores atípicos fue ejecutada para evaluar valores posiblemente anómalos en los resultados de los ensayos de fortificación en el nivel 80 mg/kg de gluten. La prueba concluyó que son aceptables todos los valores.

#### 5.1.6 Veracidad

Los resultados del parámetro repetibilidad intralaboratorio fueron utilizados para la evaluación de la recuperación del método.

Los criterios de aceptabilidad establecidos fueron aprobados. El % de recuperación promedio obtenido en cada nivel de fortificado fue entre 80 y 110%.

Los resultados en porcentaje de recuperación (%R) para cada nivel de fortificación y la evaluación respecto del criterio de aceptabilidad se presentan en Tabla 7.

**Tabla N° 7:** Resultados % de recuperación para cada nivel de fortificación para la estimación de la veracidad, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz.

| <b>Ensayo</b>        | <b>Valor obtenido fortificación 5 mg/kg gluten</b> | <b>Valor obtenido fortificación 40 mg/kg gluten</b> | <b>Valor obtenido fortificación 80 mg/kg gluten</b> |
|----------------------|--|---|---|
| <b>1</b>             | 97,0   | 119,9   | 85,9  |
| <b>2</b>             | 95,4   | 100,5   | 126,4   |
| <b>3</b>             | 98,2   | 102,8   | 94,0  |
| <b>4</b>             | 94,6   | 102,6   | 100,2   |
| <b>5</b>             | 102,6  | 93,8  | 96,2  |
| <b>6</b>             | 84,2   | 107,0   | 94,0  |
| <b>7</b>             | 94,6   | 96,0  | 111,0   |
| <b>8</b>             | 93,8   | 103,5   | 109,2   |
| <b>9</b>             | 100,2  | 105,9   | 126,7   |
| <b>10</b>            | 90,8   | 107,3   | 98,0  |
| <b>% R Promedio</b>  | <b>95%</b>   | <b>104%</b>   | <b>104%</b>   |
| <b>% R aceptable</b> |  | <b>80-110%</b>                                      |   |

## **5.2 Validación de la metodología oficial de análisis para la determinación de gluten en la muestra excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado, grado farmacopea.**

Para esta muestra todos los ensayos se realizaron con uso de un mismo Lote de Kit de ensayo, Lote 22300 y 24172.

Los resultados de las pruebas experimentales realizadas se detallan a continuación:

### **5.2.1 Límite de detección:**

El límite de detección fue estimado en 3 mg/kg de gluten.

El resumen de los valores obtenidos y los cálculos para la estimación del LOD se detalla en Tabla 8 y 9. La gráfica de tendencia de la curva estándar de gliadina v/s la absorbancia para la estimación del LOD se detalla en Figura 2.

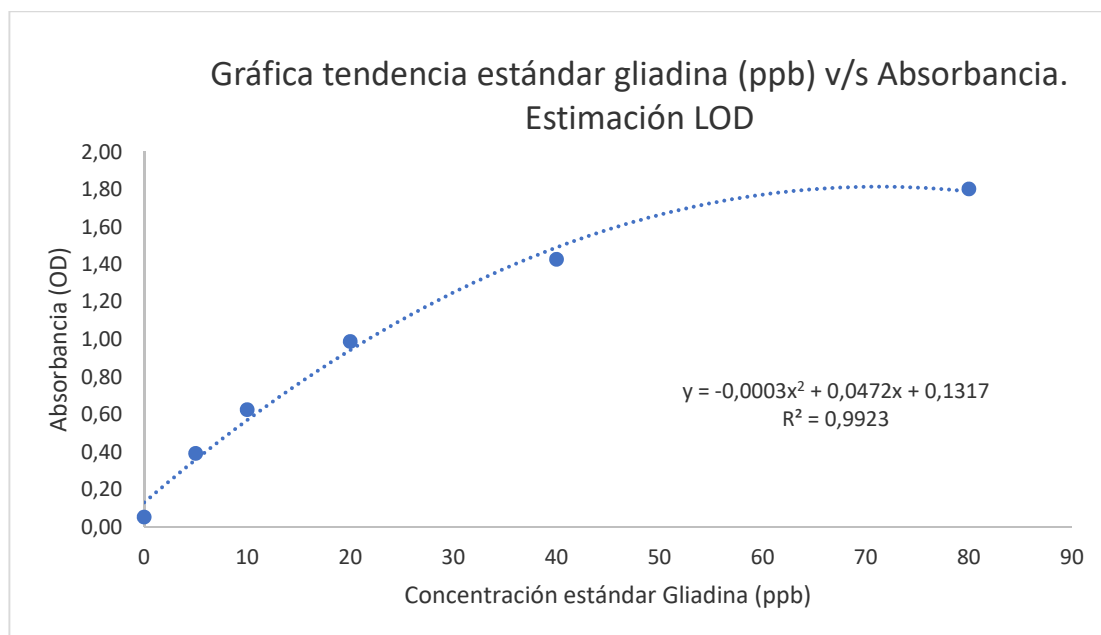
**Tabla N° 8:** Resultados ensayos para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado

| <b>Ensayo</b> | <b>Absorbancia<br/>1 (OD)</b> | <b>Absorbancia<br/>2 (OD)</b> | <b>Promedio<br/>Absorbancias</b> | <b>Valor X<br/>función<br/>cuadrática</b> | <b>Concentración<br/>(mg/kg gliadina)</b> |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---|---|
| <b>1</b>      | 0,14                          | 0,14                          | 0,14                             | 0,19                                      | 0,10                                      |
| <b>2</b>      | 0,06                          | 0,06                          | 0,06                             | -1,50                                     | -0,75                                     |
| <b>3</b>      | 0,05                          | 0,06                          | 0,06                             | -1,60                                     | -0,80                                     |
| <b>4</b>      | 0,06                          | 0,07                          | 0,07                             | -1,34                                     | -0,70                                     |
| <b>5</b>      | 0,05                          | 0,05                          | 0,05                             | -1,70                                     | -0,85                                     |
| <b>6</b>      | 0,05                          | 0,04                          | 0,05                             | -1,80                                     | -0,90                                     |
| <b>7</b>      | 0,07                          | 0,05                          | 0,06                             | -1,50                                     | -0,75                                     |
| <b>8</b>      | 0,06                          | 0,06                          | 0,06                             | -1,50                                     | -0,75                                     |
| <b>9</b>      | 0,05                          | 0,06                          | 0,06                             | -1,60                                     | -0,80                                     |
| <b>10</b>     | 0,10                          | 0,09                          | 0,10                             | -0,76                                     | -0,38                                     |

**Tabla N° 9:** Resultado ensayo curva de calibración (media y desviación estándar) para la estimación del límite de detección, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.

| <b>Estándar (ng/mL de gliadina)</b> | <b>Absorbancia (OD)</b>              |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>0</b>                            | 0,053                                |
| <b>5</b>                            | 0,392                                |
| <b>10</b>                           | 0,625                                |
| <b>20</b>                           | 0,988                                |
| <b>40</b>                           | 1,426                                |
| <b>80</b>                           | 1,801                                |
| <b>Promedio Absorbancias</b>        | 0,7 mg /kg gliadina                  |
| <b>Desviación estándar (s)</b>      | 0,3 mg/kg gliadina                   |
| <b>s * 3</b>                        | 0,9 mg/kg gliadina                   |
| <b>Promedio + 3s</b>                | 1,6 mg/kg gliadina                   |
| <b>LOD</b>                          | 1,6 mg/kg gliadina (~3 mg/kg gluten) |





**Figura N° 2:** Gráfica de tendencia de la curva estándar de gliadina v/s la absorbancia para la estimación del LOD, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.

### 5.2.2 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación fue estimado en 5 mg/kg de gluten.

Los criterios de aceptabilidad establecidos fueron aprobados. El valor estimado se corresponde con el valor de LOQ que declara el proveedor, el % de recuperación fue de 90% y el CV% fue menor al obtenido por el proveedor en su validación.

El detalle de los valores obtenidos de cada medición para la estimación se detalla en Tabla 10.

**Tabla N° 10:** Resultado ensayos para la estimación del límite de cuantificación, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.

| <b>Ensayo</b>                                    | <b>Valor obtenido (mg/kg gluten)</b> |
|--|--------------------------------------|
| <b>1</b>   | 4,5                                  |
| <b>2</b>   | 4,6                                  |
| <b>3</b>   | 4,5                                  |
| <b>4</b>   | 4,3                                  |
| <b>5</b>   | 4,8                                  |
| <b>6</b>   | 4,7                                  |
| <b>7</b>   | 4,6                                  |
| <b>8</b>   | 4,5                                  |
| <b>9</b>   | 4,4                                  |
| <b>10</b>  | 4,5                                  |
| <b>Promedio</b>                                  | 4,5 mg/kg gluten                     |
| <b>Desviación estándar (s)</b>                   | 0,13 mg/kg gluten                    |
| <b>N</b>   | 10                                   |
| <b>Coefficiente de variación proveedor (CV%)</b> | <b>3%</b>                            |
| <b>Coefficiente de variación proveedor (CV%)</b> | <b>11%</b>                           |
| <b>Porcentaje de recuperación promedio</b>       | <b>90 %</b>                          |

### 5.2.3 Precisión en términos de repetibilidad Intralaboratorio

Para la estimación de este parámetro en el nivel 5 mg/kg de gluten se consideraron los antecedentes de la determinación del límite de cuantificación.

Los criterios de aceptabilidad determinados fueron aprobados en todos los niveles de fortificación, con un CV% menor al 14, que fue el CV% obtenido por el proveedor en su validación para este parámetro.

Los resultados de la concentración obtenida en cada nivel de fortificación y sus CV% se presentan en Tabla 11.

**Tabla N° 11:** Resultados ensayos para la estimación de la repetibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado

| Ensayo               | Valor obtenido fortificación | Valor obtenido fortificación |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|
|                      | 5 mg/kg gluten               | 40 mg/kg gluten              |
| 1                    | 4,5                          | 42,6                         |
| 2                    | 4,6                          | 39,4                         |
| 3                    | 4,5                          | 41,4                         |
| 4                    | 4,3                          | 37,4                         |
| 5                    | 4,8                          | 34,4                         |
| 6                    | 4,7                          | 37,0                         |
| 7                    | 4,5                          | 34,5                         |
| 8                    | 4,5                          | 43,2                         |
| 9                    | 4,4                          | 35,3                         |
| 10                   | 4,5                          | 32,4                         |
| <b>SD</b>            | <b>0,1</b>                   | <b>3,7</b>                   |
| <b>CV%</b>           | <b>3</b>                     | <b>10</b>                    |
| <b>CV% aceptable</b> | <b>14%</b>                   |                              |

#### 5.2.4 Precisión en términos de reproducibilidad intralaboratorio

Para la estimación de este parámetro en todos los niveles de fortificado se consideraron los antecedentes de la determinación de la repetibilidad intralaboratorio,

Los criterios de aceptabilidad establecidos fueron aprobados en el nivel de fortificado 5 mg/kg gluten, con un CV% menor al 14, que fue el CV% obtenido por el proveedor en su validación para este parámetro. Sin embargo, para el nivel 40 mg/kg de gluten el CV% obtenido fue de 15%.

Los resultados de la concentración obtenida en cada nivel de fortificación y sus CV% se presentan en Tabla 12.

**Tabla N° 12:** Resultados ensayos para la estimación de la reproducibilidad intralaboratorio, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.

| <b>Ensayo</b> | <b>Valor obtenido<br/>fortificación 5 mg/kg<br/>gluten</b> | <b>Valor obtenido fortificación<br/>40 mg/kg gluten</b> |
|---------------|--|---|
| <b>1</b>      | 4,5  | 43  |
| <b>2</b>      | 4,6  | 39  |
| <b>3</b>      | 4,5  | 41  |
| <b>4</b>      | 4,3  | 37  |
| <b>5</b>      | 4,8  | 34  |
| <b>6</b>      | 4,7  | 37  |
| <b>7</b>      | 4,6  | 35  |
| <b>8</b>      | 4,5  | 43  |
| <b>9</b>      | 4,4  | 35  |
| <b>10</b>     | 4,5  | 32  |
| <b>11</b>     | 5,5  | 62  |
| <b>12</b>     | 5,7  | 50  |
| <b>13</b>     | 5,0  | 46  |
| <b>14</b>     | 5,5  | 41  |
| <b>15</b>     | 5,1  | 48  |
| <b>16</b>     | 5,5  | 47  |
| <b>17</b>     | 4,9  | 54  |
| <b>18</b>     | 5,1  | 43  |
| <b>19</b>     | 5,3  | 49  |
| <b>20</b>     | 5,4  | 49  |
| <b>SD</b>     | <b>0,4</b>   | <b>9</b>  |
| <b>CV%</b>    | <b>6,2</b>   | <b>15</b>   |

Nota 2: la prueba Q de Dixon, utilizada para identificar y rechazar valores atípicos fue ejecutada para evaluar valores posiblemente anómalos en los resultados de los ensayos de fortificación en el nivel 40 mg/kg de gluten. La prueba concluyó que son aceptables todos los valores, sin embargo, aunque no resultó ser significativamente atípico ( $P$  mayor a 0,05), el dato 11 es el más alejado del resto de los valores y se consideró dejarlo fuera para la evaluación del coeficiente de variación entre datos.

#### 5.2.5 Veracidad

Los resultados del parámetro repetibilidad intralaboratorio fueron utilizados para la evaluación de la recuperación del método.

Los criterios de aceptabilidad establecidos fueron aprobados El % de recuperación promedio obtenido en cada nivel de fortificado fue entre 80 y 110%.

Los resultados en porcentaje de recuperación (%R) para cada nivel de fortificación y la evaluación respecto del criterio de aceptabilidad se presentan en Tabla13.

**Tabla N° 13:** Resultados % de recuperación para cada nivel de fortificación para la estimación de la veracidad, validación a excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.

| Ensayo               | Valor obtenido                  | Valor obtenido                   |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                      | fortificación 5 mg/kg<br>gluten | fortificación 40 mg/kg<br>gluten |
| 1                    | 91                              | 107                              |
| 2                    | 91                              | 99                               |
| 3                    | 90                              | 104                              |
| 4                    | 87                              | 94                               |
| 5                    | 95                              | 86                               |
| 6                    | 93                              | 93                               |
| 7                    | 91                              | 86                               |
| 8                    | 90                              | 108                              |
| 9                    | 88                              | 88                               |
| 10                   | 89                              | 81                               |
| <b>% R Promedio</b>  | <b>90%</b>                      | <b>94%</b>                       |
| <b>% R aceptable</b> | <b>80-110%</b>                  |                                  |

### 5.3 Estimación de la Incertidumbre de medición.

La incertidumbre expandida porcentual del método, para muestras excipiente farmacéutico fue estimada en 20%. Los resultados para la estimación de este parámetro se presentan en Tabla 14.

**Tabla N° 14:** Estimación de la incertidumbre de la medición a partir de fortificados, resultados para matriz excipiente farmacéutico.

| <b>Ensayo</b>                            | <b>Valor obtenido<br/>(mg/kg gluten)</b> | <b>% de<br/>recuperación</b>   | <b>Bias</b> | <b>(Bias) 2</b> |
|--|--|--------------------------------|-------------|-----------------|
| <b>1</b>                                 | 4,9                                      | 97,0                           | 3,0         | 9,0             |
| <b>2</b>                                 | 4,8                                      | 95,4                           | 4,6         | 21,1            |
| <b>3</b>                                 | 4,9                                      | 98,2                           | 1,8         | 3,2             |
| <b>4</b>                                 | 4,7                                      | 94,6                           | 5,4         | 29,1            |
| <b>5</b>                                 | 5,1                                      | 102,6                          | -2,6        | 6,7             |
| <b>6</b>                                 | 4,2                                      | 84,2                           | 15,8        | 249,6           |
| <b>7</b>                                 | 4,7                                      | 94,6                           | 5,4         | 29,1            |
| <b>8</b>                                 | 4,7                                      | 93,8                           | 6,2         | 38,4            |
| <b>9</b>                                 | 5,0                                      | 100,2                          | -0,2        | 0,0             |
| <b>10</b>                                | 4,6                                      | 90,8                           | 9,2         | 84,6            |
| <b>N</b>                                 | 10                                       | Sumatoria Bias                 |             | 471,2           |
| <b>Promedio</b>                          | 4,8                                      | n                              |             | 10              |
| <b>Desviación<br/>estándar</b>           | 0,26                                     | [Sum (bias)2]/n                |             | 47,1            |
| <b>Coefficiente de<br/>variación (%)</b> | 5,4                                      | RMbias=raíz ([Sum<br>bias)2]/n |             | 6,865           |

Grados de libertad: 9

Us Incertidumbre del sesgo: 6,936

Uc Incertidumbre combinada: 8,773

Ur incertidumbre de la precisión: 5,371

Factor de cobertura k: 2,3

$U = k * U_c$

U= 20,2

#### 5.4 Evaluación de la respuesta del método en una muestra de producto farmacéutico comercial.

El total de 6 ensayos realizados en la muestra obtuvo resultados menores a 5 mg/kg de gluten. Como control de la precisión el CV% entre duplicados fue igual a 7%. En cuanto a los fortificados, las recuperaciones fluctuaron entre 60 y 90%.

Los resultados se presentan en Tabla 15. En la Figura 3 se puede observar de forma cualitativa los resultados de esta evaluación.

**Tabla N° 15:** Resultados del análisis a muestra de producto final farmacéutico clotiazepam 0,5 mg comprimidos trirranurados.

| <b>Ensayo</b>                                     | <b>Valor obtenido (mg de gluten/kg)</b> |
|---|---|
| <b>1</b>  | < 5 mg/kg                               |
| <b>2</b>  | < 5 mg/kg                               |
| <b>3</b>  | < 5 mg/kg                               |
| <b>4</b>  | < 5 mg/kg                               |
| <b>5</b>  | < 5 mg/kg                               |
| <b>6</b>  | < 5 mg/kg                               |
| <b>Fortificado nivel 5 mg/kg gluten</b>           | 3,0 mg/kg gluten; recuperación de 61 %  |
| <b>Fortificado nivel 5 mg/kg gluten duplicado</b> | 3,3 mg/kg gluten, recuperación de 66 %  |
| <b>Fortificado nivel 40 mg/kg gluten</b>          | 26 mg/kg gluten, recuperación de 65%    |
| <b>Fortificado nivel 60 mg/kg gluten</b>          | 54 mg/kg gluten, recuperación de 90%    |





**Figura N° 3:** Placa ELISA conteniendo pocillos de ensayo en muestra de clotiazepam comprimidos trirranurados. Etapa posterior a la adición e incubación con el sustrato y cromógeno. Los pocillos coloreados en azul indican presencia de gliadina en la muestra.

## 6. Discusión

La prevalencia de enfermedad celiaca a nivel país, sumado al aumento de casos de alergia al trigo y de sensibilidad al gluten no celiaca revelan un problema de salud pública.

Siendo el único tratamiento la mantención de una dieta libre de gluten de por vida (Husby et al., 2012), la regulación de los alimentos aptos para las personas que padecen enfermedad celiaca es fundamental.

Por otra parte, los pacientes con esta enfermedad deben tener precauciones además con la ingesta de medicamentos (Dávila, 2018) ya que ellos contienen como excipiente almidones derivados de diferentes tipos de cereal y eventualmente podrían estar contaminados.

Si bien la concentración en que pudieran estarlo es baja, los diferentes umbrales de tolerancia al gluten que se presentan en los pacientes celíacos tiene implicancias cuando un medicamento es consumido, por ejemplo, de forma permanente debido a tratamientos prolongados o bien crónicos (Doña, 2009).

A nivel nacional la regulación de los alimentos libres de gluten es abordada con el control de buenas prácticas de fabricación de productos y el establecimiento de un límite de concentración que determina que un alimento es libre de gluten.

En este sentido, el análisis cuantitativo del gluten tiene un rol fundamental. Internacionalmente el método recomendado por el *Codex Alimentarius* es el método AOAC 2012.01 que determina gluten como proteína total en matrices que no han sido hidrolizadas, a través de un ELISA tipo sándwich (*Codex Alimentarius*, 2008)

Cuando se trata de matrices que han sido sometidas a un proceso de hidrólisis, entendido como alimentos fermentados o sometidos a adición de enzimas, aplica el método AOAC 2015.05, un ELISA de tipo competitivo que cuantifica péptidos de gluten. Si bien este método tiene aprobación AOAC, la FDA cree que no existe un método analítico científicamente válido y efectivo para determinar el gluten en este tipo de alimentos (Scherf K, 2021).

En cuanto a la regulación de medicamentos, a nivel nacional existe una resolución que dictamina que los medicamentos declaren el cereal origen del almidón que forma parte de sus excipientes. No están definidas directrices de buenas prácticas que eviten la contaminación con gluten en el proceso de elaboración de medicamentos ni está definido un límite de concentración que determine que un medicamento es libre de gluten o no.

En cuanto al análisis de gluten en medicamentos, no hay referencias de un método en específico y lo que internacionalmente se aplica, de acuerdo a algunas regulaciones revisadas, son metodologías de análisis en alimentos que se validan para su aplicación en los excipientes farmacéuticos de implicancia como también en el producto farmacéutico comercial.

En el presente estudio se evaluó la validez del método AOAC 2012.01 para determinar gluten en excipientes de origen farmacéutico.

Se establecieron los parámetros de validación: determinación de límites, precisión, veracidad e incertidumbre y se consideraron criterios de aceptabilidad.

En cuanto al límite de detección, no se estableció un criterio de aceptabilidad ya que, de acuerdo a la validación del método oficial, se determinó que este es matriz dependiente. En caso del almidón de maíz se estableció en 1 mg/kg de gluten y en caso del almidón de maíz pregelatinizado en 3 mg/kg de gluten.

En cuanto a la precisión, los criterios de aceptabilidad fueron aprobados en el parámetro repetibilidad intralaboratorio en ambos excipientes y en todas las concentraciones evaluadas.

En términos de reproducibilidad intralaboratorio, hubo resultados que no cumplieron criterios de aceptabilidad. Para el almidón de maíz, en el nivel 40 mg/kg de gluten, el CV% observado fue de 15 y para el almidón de maíz pregelatinizado, en el nivel 80 mg/kg de gluten, el CV% observado fue de 22.

En cuanto a la veracidad, el criterio de aceptabilidad fue aprobado en ambos excipientes. Sin embargo, para el nivel 80 mg/kg de gluten, hubo porcentajes de recuperación por sobre 120%.

Se presentaron desviaciones en términos de precisión y veracidad en el nivel 80 mg/kg. Este nivel de concentración es el rango superior en el que el método oficial tiene alcance. El método oficial ha declarado que su rango de trabajo es entre 5 y 80 mg/kg de gluten. El nivel superior define la concentración a la que se observan anomalías significativas (Instituto de Salud Pública, 2022).

En cuanto al tipo de muestra, y probables diferencias que se pudieron observar en sus resultados, es importante indicar que el almidón de maíz pregelatinizado -en comparación con el almidón de maíz no pregelatinizado - en su proceso de elaboración, es sometido a calor entre 62–72°C. Las proteínas desnaturalizadas y entrecruzadas, comúnmente resultantes del procesamiento térmico, son difíciles de disolver en la solución de extracción de muestras y, por lo tanto, son matrices más complejas que las no tratadas térmicamente o productos que contienen solo proteínas nativas (R Biopharm, 2010). El procedimiento de extracción empleado resultó adecuado para el almidón de maíz pregelatinizado. Los porcentajes de recuperación promedio obtenidos en este estudio, en ambos excipientes, fueron aceptables de acuerdo al rango de recuperación definido.

En cuanto a la incertidumbre, esta fue estimada en un 20%. Para métodos ELISA en general se describen incertidumbres que varían entre +/- 20-30% (R-Biopharm, 2015).

En cuanto a la evaluación del comportamiento del método en un producto farmacéutico comercial, se obtuvo una precisión aceptable en el ensayo, sin embargo, en términos de veracidad, las recuperaciones obtenidas estuvieron bajo el % de recuperación mínimo aceptable para el método. Está descrito que la actividad enzimática del conjugado disminuye a lo largo de la vida útil del Kit (R-Biopharm, 2015), lo que pudo tener implicancia en los resultados que se obtuvieron.

La validación de métodos de ensayo es un requisito normativo de los laboratorios que trabajan bajo la Norma ISO/IEC 17025:2017. El cumplimiento de este requisito es fundamental para demostrar capacidad de los laboratorios en generar resultados válidos. Es un requisito normativo ejecutar una validación del método si se amplía su alcance para incluir analitos adicionales, y/o matrices adicionales (Instituto de Salud Pública, 2022).

La validación realizada en este estudio demostró que el método es veraz y preciso para el fin previsto, que en este caso es ampliar el alcance de la metodología a los excipientes de uso farmacéutico. Este estudio es una contribución a la regulación de medicamentos que puedan declararse como libres de gluten en base al control de sus excipientes de origen en cereales. Este estudio se podría proyectar a productos farmacéuticos comerciales, considerando sus diferentes posibles presentaciones: comprimidos, cápsulas, jarabe, etc. dado que la forma farmacéutica podría influir en la recuperación del gluten.

## **7. Conclusiones**

Este estudio permitió comprobar que el método oficial de análisis AOAC 2012.01 CODEX Tipo I que aplica a matrices de alimentos es aplicable también a matrices de origen farmacéutico como los excipientes almidón de maíz y almidón de maíz pregelatinizado.

La sensibilidad del método fue establecida en términos del límite de detección, el que quedó definido en 1 mg/kg de gluten para el excipiente almidón de maíz y en 3 mg/kg de gluten para el almidón de maíz pregelatinizado.

Los parámetros de precisión y veracidad del método fueron aprobados en consideración de los criterios de aceptabilidad establecidos y que tienen como referencia la validación del método oficial y el apéndice F de la AOAC.

La validación realizada demuestra que el método es veraz y preciso para el fin previsto, que en este caso es ampliar el alcance de la metodología a los excipientes de uso farmacéutico.

La validación demostró que el método no es tan preciso en niveles de concentración altos. Se sugiere considerar este antecedente ante futuros planes de validación.

Si bien no se ejecutó una validación en la muestra de producto farmacéutico comercial, la evaluación de la respuesta obtenida al método permite tener una primera señal de la idoneidad del método para este fin. Para aseverar que la metodología pueda tener este alcance, es necesario realizar una validación.

## 8 Bibliografía

1. Agencia Europea de Medicamentos (EMA) 2017. Annex to the European Commission guideline on Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use. EMA/CHMP/302620/2017.
2. AOAC Official Method 2012.01. 2016. Gliadin as a measure of Gluten in rice- and Corn- based foods. Enzyme Immunoassay method. Base don a specific monoclonal antibody to yhe potentially celiac toxic amino acid prolamin sequences. First action. 2016.
3. Catassi C, Gatti S, Lionetti E. 2015. World Perspective and Celiac Disease Epidemiology. Dig Dis.;33(2):141-6.
4. Chile. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. 2010. Encuesta Nacional de Salud ENS. Tomo I. 2009-2010.
5. Chile. Ministerio de Salud Chile. 2013. Norma técnica n°127. Norma técnica buenas prácticas de manufactura (BPM) para la Industria de productos farmacéuticos. Santiago, Chile.
6. Chile. Ministerio de Salud. 2015. Subsecretaría de Salud Pública. División de prevención y control de enfermedades. Departamento de Ciclo vital. Búsqueda, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celiaca. Guía Clínica.
7. Chile. Ministerio de Salud. 2018. División Jurídica. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto N° 977/96. Actualizado a Julio 2018.

8. Corporación de apoyo al celiaco COACEL. 2019. Quiénes somos (En línea) <<http://www.coacel.cl/quienes-somos>>. Alimentos/Listado. (En línea) <<http://www.coacel.cl/alimentos/listado>>(consulta 20 de abril 2019).
9. Dávila B. Análisis internacional y recomendaciones para Chile, respecto a la reglamentación para medicamentos libres de gluten. Tesis. Unidad de práctica prolongada para optar al título de química farmacéutica. Universidad de Chile. 2018. 51p.
10. Dewar DH, Amato M, Ellis HJ, et al. 2006. The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. Eur J Gastroenterol. 18: 493-491.
11. Doña, V. Desarrollo de métodos cuantitativos de alto poder de detección de proteínas en alimentos. Certificación de alimentos destinados a enfermos celíacos. Tesis para optar a título de doctor de la Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de la Plata. 2009. 140p.
12. España. Ministerio de Industria, energía y Turismo. 2012. VIM Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. 3ª Edición en español. Centro Español de Metrología. 2012.
13. España. Ministerio de Sanidad, consumo y bienestar social. 2018. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios en colaboración con la Federación de asociaciones de celíacos de España. En línea



<<https://cima.aemps.es/cima/resources/docs/medicamentosygluten.pdf>> (consulta 17 de abril 2019).

14. Estévez V, Araya M. 2016. La dieta sin gluten y los alimentos libres de gluten. Revista Chilena de Nutrición. Volumen 43, N°4.
15. EURACHEM. 2005. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Segunda Edición (Traducción de la obra original en inglés: The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Primera Edición 1998.).
16. FDA. Food and Drug Administration. 2017. Gluten in drug products and associated labeling recommendations. Draft guidance. (En línea) <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM588216.pdf>> (consulta 17 de abril 2019).
17. FDA. Food and Drug Administration. 2019. Manual de Laboratorio ORA. Volumen II. Estimación de la Incertidumbre de medida ORA-LAB 5.4.6.
18. Fundación CONVIVIR.2019. Quiénes somos. En línea: <http://www.fundacionconvivir.cl/conoce-a-convivir/#quienes-somos>. Lista alimentos certificados. En línea <<http://www.fundacionconvivir.cl/lista-alimentos-certificados>>(consulta 20 de abril 2019).

19. González JM, García E, Fernández JL, Lara G, Benito J. 2007. Informe de vigilancia tecnológica. Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos. VTmi+d. España, Madrid. 81p.
20. Henrottin J, Planque M, Huet AC, Marega R, Lamote A, Gillard N. 2019. Gluten Analysis in Processed Foodstuffs by a Multi-Allergens and Grain-Specific UHPLC-MS/MS Method: One Method to Detect Them All. (Resumen) Journal of AOAC International. Abril, 2019. PMID: 30940299.
21. Holanda. Working group on Prolamin analysis and toxicity. En línea <<https://www.wgpat.com/pwggliadin.html>> (consulta 30 de marzo, 2023).
22. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, et al. 2012. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 54(1):136-60. PubMed PMID: 22197856.
23. Instituto de Salud Pública de Chile. 2010. Guía técnica Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”.
24. Instituto de Salud Pública de Chile. 2018. Informe Técnico n°2/2018 sobre aspectos regulatorios internacionales para medicamentos libres de gluten y recomendación de los aspectos relevantes a considerar para la regulación nacional. 9 de julio, 2018.

25. Instituto de Salud Pública de Chile. 2018. Departamento Salud Ambiental. Procedimiento de Validación y Verificación de Métodos de Ensayo. Versión 8. 2018.
  
26. Instituto de Salud Pública de Chile. 2019. Prestaciones. Ficha técnica Determinación de gluten en alimentos. (En línea). <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/prestacion/2010/03/8310299.pdf>> (consulta 15-04-2019).
  
27. Instituto de Salud Pública de Chile. 2022DNRSA. Departamento Nacional de Referencia en Salud Ambiental. Procedimiento de Validación y Verificación de Métodos de Ensayo. Versión 13, 2022.
  
28. Instituto de Salud Pública de Chile. 2022. ScQAL. Sección Química de Alimentos Instructivo de Verificación y Validación de Métodos para Laboratorios de La Sección Química de Alimentos Versión 05, 2022.
  
29. Instituto de Salud Pública de Chile. 2022. ScQAL. Sección Química de Alimentos Instructivo de Verificación y Validación de Métodos ELISA cuantitativos Versión 03, 2022.
  
30. Kang JY, et al: 2013. Systematic review: worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. Aliment Pharmacol Ther. 38 (3): 226-45.
  
31. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. Gut. 62(1):43-52.

32. Lacorn M, Weiss T. 2015. Partially Hydrolyzed Gluten in Fermented Cereal-Based Products by R5 Competitive ELISA: Collaborative Study, First Action 2015.05. Journal of AOAC International. Volumen 98, N° 5.
33. Normas Internacionales de los Alimentos. 2008. Codex Alimentarius. Norma relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten CODEX STAN 118 – 1979. Adoptado en 1979. Enmiendas: 1983 y 2015. Revisión: 2008.
34. Organización Internacional de Estandarización ISO/IEC 17025. 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 11-2017.
35. Ortiz C, Valenzuela R, Lucero Y. 2017. Enfermedad celíaca, sensibilidad no celíaca al gluten y alergia al trigo: comparación de patologías diferentes gatilladas por un mismo alimento. Revista Chilena de Pediatría. 88(3):417-423.
36. Pellicer K, Huber B, Benítez F, Bignon G, Barbero R, Salum L, Copes J. 2014. Actualización en legislación de alimentos para celíacos. Revista de la facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. AnAlectA Veterinaria. 34 (1-2): 26-32.
37. Pineda P, Coral D, Arciniegas M, Rorales A, Rodríguez M. 2010. Papel del agua en la gelatinización del
38. almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. Ingeniería y Ciencia, Volumen 6, número 11, enero-junio de 2010. 129–141.

39. Raymond C Rowe, Paul J Sheskey y Siân C Owen. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. 2006.
40. R-Biopharm. Ridacreen Gliadin. Extraction efficiencies for gliadin analysis, 2010.
41. R-Biopharm. Criterios de cumplimiento para curvas estándar Ridascreen Allerguen Test (Sándwich), 2015.
42. R-Biopharm. Ridacreen Gliadin. Información del Producto, reporte de validación, 2016.
43. Rojas J, Uribe Y, Zuluaga A. 2012. Powder and compaction characteristics of pregelatinized starches. (Resumen). Pharmazie. 2012 Jun;67(6):513-7.
44. Scherf K., Cattasi C., Chirido, F., Ciclitira P., Feighery, C., Gianfrani, C., Koning, F., Lundin, K., Masci S., Schuppan, D., Smulders, M., Tranquet, O., Troncone, R., Koheler, P. 2021. Statement of the Prolamin Working Group on the Determination of Gluten in Fermented Foods Containing Partially Hydrolyzed Gluten. *Frontiers in Nutrition*. Vol 7, enero 2021.
45. Valdés, I., García, E., Llorente, M., and Méndez, E. 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(5):465–474.

## **9. Anexos**

**9.1 Anexo 1:** Ficha de seguridad, excipiente farmacéutico almidón de maíz.



**CornProducts**  
INTERNATIONAL



**CornProducts Chile**  
Inducorn S.A.

**FICHA DE SEGURIDAD DE PRODUCTO**  
**ALMIDÓN REGULAR DE MAÍZ - FARMAL® 034510**

**IDENTIFICACION DEL FABRICANTE**

- CornProducts Chile – Inducorn S.A.  
Av. Apoquindo 3669, Of. 501  
Las Condes – Santiago – Chile
- Teléfono de Emergencia: (56 2) 685 6000
- Fax: (56 2) 685 6198

**PRODUCTO**

- Almidón de Maíz grado farmacopea. FARMAL® 034510

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS**

- Apariencia Polvo blanco
- pH 5,0 - 6,0
- Solubilidad en agua Insoluble

**DATOS DE FUEGO Y/O EXPLOSIÓN**

- Punto de inflamación 320 °C
- Procedimiento especial para combate de fuego P.Q.S. Multipropósito
- Temperatura de auto-ignición N.A.
- Medio de Extinción Agua en forma de Neblina o lluvia.
- Límite Mínimo Explosivo 40 mg/l
- Temperatura Mínima de Ignición 380 °C
- Energía Eléctrica Mínima para Ignición 40 mJ

ALQUEMARSE SE DESPRENDE CO, CO2, NITROGENO ORGÁNICO

**DATOS DE REACTIVOS**

- Estabilidad Estable
- No ocurre polimerización y/o descomposición de productos peligrosos.

Planta: Balmaceda 1481 Llay-Llay, Chile  
Tel.: 34-611018 Fax: 34-611796

**9.2 Anexo 2:** Ficha de seguridad, excipiente farmacéutico almidón de maíz pregelatinizado.



# Material Safety Data Sheet



**STARCH 1500 PARTIALLY 2001  
PREGELATINIZED MAIZE  
STARCH**

## Section 1. Chemical product and company identification

### Identification of the substance or preparation

**Product name** : STARCH 1500 PARTIALLY PREGELATINIZED MAIZE STARCH  
**Product code** : 2001  
**Manufacturer** : Colorcon  
3702 E. 21st St.  
Indianapolis, IN 46218 USA  
www.colorcon.com  
E-mail: safety@colorcon.com  
Phone: +001-317-545-6211  
Fax: +001-317-545-6218  
**Emergency telephone number** : US - 800-424-9300 International - +001-703-527-3887

## Section 2. Composition, Information on Ingredients

No hazardous ingredient

## Section 3. Hazards identification

**Physical state** : Solid. (Powder.)  
**Appearance** : White Powder  
**Emergency overview** : No specific hazard.  
**Routes of entry** : Eye contact. Inhalation. Ingestion.

### Potential acute health effects

**Eyes** : This product may irritate eyes upon contact.  
**Skin** : No known significant effects or critical hazards.  
**Inhalation** : Over-exposure by inhalation may cause respiratory irritation.  
**Ingestion** : No known significant effects or critical hazards.

See toxicological Information (section 11)

## Section 4. First aid measures

**Eye contact** : Affected individual should remove contact lens, if present. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water or saline solution. Get medical attention if irritation occurs.

**Skin contact** : Wash contaminated skin with soap and water. Get medical attention if irritation develops.

**Inhalation** : If inhaled, remove to fresh air. Get medical attention if symptoms appear. If exposed person is not breathing, give artificial respiration or oxygen applied by trained personnel.

**Ingestion** : Do NOT induce vomiting unless directed to do so by medical personnel. Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical attention if symptoms appear.

**STARCH 1500 PARTIALLY 2001  
PREGELATINIZED MAIZE  
STARCH**

Page: 1/4

### Section 5. Fire fighting measures

- Flammability of the product** : Non-flammable.
- Products of combustion** : During combustion, product may emit but not limited to carbon dioxide, carbon monoxide.
- Fire fighting media and instructions** : Use DRY chemicals, CO<sub>2</sub>, water spray or foam. Use an extinguishing agent suitable for surrounding fires.
- Special protective equipment for fire-fighters** : Fire fighters should wear appropriate protective equipment and self-contained breathing apparatus (SCBA) with a full facepiece operated in positive pressure mode.
- Special remarks on explosion hazards** : Fine dust clouds may form explosive mixtures with air.

### Section 6. Accidental release measures

- Personal precautions** : Keep unnecessary personnel away. Use suitable protective equipment (Section 8).
- Environmental precautions** : Avoid dispersal of spilled material and runoff and contact with soil, waterways, drains and sewers.
- Methods for cleaning up** : If emergency personnel are unavailable vacuum or carefully scoop up spilled materials and place in an appropriate container for disposal. Avoid creating dusty conditions and prevent wind dispersal.

### Section 7. Handling and storage

- Handling** : Avoid breathing dust.
- Storage** : Keep container tightly closed. Keep container in a cool, well-ventilated area.

### Section 8. Exposure Controls, Personal Protection

- Engineering controls** : Use process enclosures, local exhaust ventilation, or other engineering controls to keep airborne levels below recommended exposure limits. If user operations generate dust, fume or mist, use ventilation to keep exposure to airborne contaminants below the exposure limit.
- Personal protection**
- Eyes** : Safety eyewear complying with an approved standard should be used when a risk assessment indicates this is necessary to avoid exposure to liquid splashes, mists or dusts.
- Skin** : Personal protective equipment for the body should be selected based on the task being performed and the risks involved and should be approved by a specialist before handling this product.
- Respiratory** : Use a properly fitted, particulate filter respirator complying with an approved standard if a risk assessment indicates this is necessary. Respirator selection must be based on known or anticipated exposure levels, the hazards of the product and the safe working limits of the selected respirator.
- Hands** : Chemical-resistant, impervious gloves or gauntlets complying with an approved standard should be worn at all times when handling chemical products if a risk assessment indicates this is necessary.
- Personal protection in case of a large spill** : Splash goggles. Full suit. Dust respirator. Boots. Gloves. A self-contained breathing apparatus should be used to avoid inhalation of the product. Suggested protective clothing might not be sufficient; consult a specialist BEFORE handling this product.

*\* Occupational Exposure Limit(s), if available, are listed in section 2*

**STARCH 1500 PARTIALLY  
PREGELATINIZED MAIZE  
STARCH**

**2001**

**Page: 2/4**

## Section 9. Physical and chemical properties

**Physical State and Appearance** : Solid. (Powder.)

**Molecular formula** : (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>

Values provided should not be construed as specifications. See product specification for additional information.

## Section 10. Stability and reactivity

**Stability and reactivity** : The product is stable.

**Hazardous polymerization** : Will not occur.

## Section 11. Toxicological information

### Toxicity data

**Chronic effects on humans** : **CARCINOGENIC EFFECTS** Classified A4 (Not classifiable for human or animal.) by ACGIH [starch].

**Other toxic effects on humans** : Slightly hazardous in case of eye contact (irritant), of inhalation (lung irritant). Non-corrosive for skin. Non-irritant for skin. Non-sensitizer for skin. Non-permeator by skin. Non-hazardous in case of ingestion. Non-sensitizer for lungs. Non-corrosive to the eyes. Non-corrosive for lungs.

### Specific effects

**Carcinogenicity / Mutagenicity / Reproductive toxicity** : No known significant effects or critical hazards.

## Section 12. Ecological information

**Products of degradation** : These products are carbon oxides (CO, CO<sub>2</sub>) and water.

## Section 13. Disposal considerations

**Waste disposal** : Waste must be disposed of in accordance with federal, state and local environmental control regulations.

Consult your local or regional authorities.

## Section 14. Transport information

**DOT Classification** : Refer to the bill of lading for proper shipping information.

## Section 15. Regulatory information

### United States

**HCS Classification** : Not regulated.

**U.S. Federal regulations** : TSCA 8(b) inventory: starch

SARA 302/304/311/312 hazardous chemicals: Not applicable.

Clean Water Act (CWA) 311 and 307/Clean Air Act (CAA) 112: This product does not contain any ingredients requiring reporting under this section.

**State regulations** : Pennsylvania RTK: starch: (generic environmental hazard)  
Massachusetts RTK: starch

### Canada

**WHMIS (Canada)** : Not controlled under WHMIS (Canada).

CEPA DSL: starch

**STARCH 1500 PARTIALLY  
PREGELATINIZED MAIZE  
STARCH**

**2001**

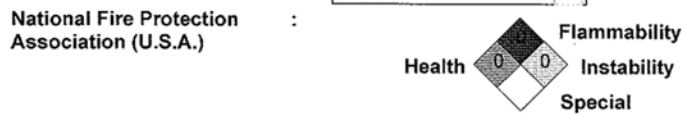
**Page: 3/4**

**International regulations**

DSCL (EEC) : This product is not classified according to the EU regulations.

**Section 16. Other information**

|  |                     |   |
|--|---------------------|---|
| Hazardous Material Information System (U.S.A.) : | Health              | 0 |
|  | Fire hazard         | 0 |
|  | Reactivity          | 0 |
|  | Personal protection | E |



**History**

Date of issue : 19 April 2005  
 Date of previous issue : No Previous Validation.  
 Version : 1



Indicates information that has changed from previously issued version.

**Notice to reader**

*To the best of our knowledge, the information contained herein is accurate. However, neither the above named supplier nor any of its subsidiaries assumes any liability whatsoever for the accuracy or completeness of the information contained herein. Final determination of suitability of any material is the sole responsibility of the user. All materials may present unknown hazards and should be used with caution. Although certain hazards are described herein, we cannot guarantee that these are the only hazards that exist.*

*The information contained in this document is proprietary to Colorcon and may not be used or disseminated inappropriately.*

### 9.3 Anexo 3: Ficha técnica Neuryl 2 mg comprimidos trirranurados.



# Neuryl® 2 mg

## CLONAZEPAM

### Comprimidos trirranurados

#### Venta bajo receta médica retenida en establecimientos tipo A

Lea cuidadosamente este folleto antes de la administración de este medicamento. Contiene información importante acerca de su tratamiento. Si tiene cualquier duda o no está seguro de algo, consulte a su médico o farmacéutico. Guarde este folleto, puede necesitar leerlo nuevamente.

**COMPOSICIÓN:**  
**Neuryl® 2 mg**  
Cada comprimido trirranurado contiene:  
Clonazepam 2 mg  
Excipientes: Lactosa monohidratada, almidón pregelatinizado, estearato de magnesio, talco, laurilsulfato de sodio, celulosa microcristalina PH 102, C.S.

**CLASIFICACIÓN:**  
Código ATC: N03AE01.  
Derivado benzodiazepínico con propiedades anticonvulsivantes, ansiolíticas y antipánico.

**INDICACIONES:**

- Tratamiento de crisis de pánico.
- Tratamiento de las ausencias típicas (petit mal), las ausencias atípicas (síndrome de Lennox-Gastaut), las convulsiones mioclónicas y las convulsiones atónicas.
- Tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas (gran mal), convulsiones parciales simples, convulsiones parciales complejas y las convulsiones generalizadas tónico-clónicas secundarias.

**DOSIS Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN:**  
El médico debe indicar la posología y el tiempo de tratamiento apropiados a su caso particular. No obstante la dosis usual recomendada es:

**Dosificación en cuadros epilépticos:**  
**Adultos:** Dosis inicial de 1,0-1,5 mg/día divididos en dos o tres tomas. De ser necesario estas dosis pueden aumentarse en 0,5 mg cada 3 días hasta lograr el control de las convulsiones o hasta que los efectos adversos impidan seguir con el incremento.  
Dosis de mantenimiento: Debe ser individualizada para cada paciente de acuerdo a la respuesta obtenida, en general suele ser de 3-6 mg diarios.  
Dosis máxima diaria: 20 mg.  
**Niños y adolescentes de 10 a 16 años:** se recomienda una dosis inicial de 1-1,5 mg/día, dividido en 2-3 tomas. La dosis puede aumentarse en 0,25-0,5 mg cada 3 días hasta alcanzar el control de las convulsiones o hasta alcanzar la dosis de mantenimiento individual (3-6 mg/día).  
**Lactantes y niños hasta diez años (o hasta 30 kg de peso):** Dosis inicial de 0,01-0,03 mg por kg y día dividido en dos o tres tomas. De ser necesario estas dosis pueden aumentarse 0,25 a 0,50 mg cada 3 días hasta lograr el control de las convulsiones, se alcance la dosis de mantenimiento, o hasta que los

efectos adversos impidan seguir con el incremento.  
Dosis de mantenimiento: 0,1 mg/kg/día. Cuando sea posible la dosis diaria debe ser dividida en tres tomas. Si las tomas no resultaran iguales, la dosis mayor debe administrarse antes de dormir.  
Dosis máxima niños hasta 10 años: 0,2 mg/kg/día.  
En lactantes debe usarse soluciones orales para un mejor ajuste posológico, mezclando con agua, té o zumo de frutas.

**Posología especial en cuadros de pánico:**  
**Adultos:** La dosis debe ajustarse a cada caso particular, recomendándose iniciar con 0,25 mg dos veces al día (0,5 mg/día) hasta alcanzar la dosis efectiva tolerable. Al cabo de 3 días puede aumentarse la dosis a 0,5 mg dos veces al día (1 mg/día). Los aumentos siguientes se harán a intervalos de 3 días hasta el control del trastorno de pánico. La dosis de mantenimiento generalmente es 1 mg dos veces al día (2 mg/día). La experiencia clínica demuestra un rango posológico de 1-3 mg diarios. El médico podrá incrementar excepcionalmente una dosis mayor.  
**Niños:** No existen suficientes estudios sobre la eficacia del producto en pacientes menores de 18 años en estos cuadros patológicos.

En pacientes que inician el tratamiento se aconseja la administración de Neuryl® a dosis bajas y como monoterapia para prevenir posibles efectos colaterales, elevando lenta y progresivamente la dosis diaria hasta alcanzar la dosis de mantenimiento necesaria. Alcanzada la dosis de mantenimiento, puede administrarse la misma en toma única antes de acostarse. Cuando se requiera un tratamiento en varias tomas, administrar la mayor toma al acostarse. El período de tiempo en que deben alcanzarse las dosis de mantenimiento oscila entre una a tres semanas de tratamiento.


Neuryl® puede administrarse junto con otros antiepilépticos, ajustando la dosis de ambos fármacos para una respuesta óptima. Al igual que con otros antiepilépticos el tratamiento con Neuryl® no debe suspenderse de forma abrupta, sino que las dosis deben ser reducidas gradualmente.

**Pautas posológicas especiales**

**Epilepsia y trastorno de pánico:**  
**Anzianos:** estos pacientes requieren un cuidado especial durante el escalamiento progresivo de la dosis.  
**Insuficiencia renal:** no se ha estudiado la seguridad y eficacia de clonazepam en pacientes con insuficiencia renal. No obstante, considerando la farmacodinámica del fármaco, no es necesario el ajuste de dosis.  
**Insuficiencia hepática:** no se ha estudiado la seguridad y eficacia de clonazepam en pacientes con insuficiencia hepática.

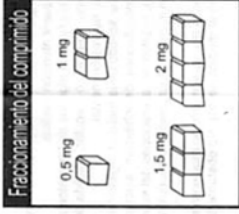
**Modo de administración:** Los comprimidos trirranurados de Neuryl® presentan la siguiente forma que facilitará la administración de la dosis indicada por su médico:

**Forma de extraer los comprimidos**



Presionar en el extremo del comprimido

**Fraccionamiento del comprimido**



#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES:

- Alergias: Usted debe comunicar a su médico si alguna vez ha presentado una reacción alérgica a este medicamento o alguna otra sustancia, ya sea alimentos, preservantes, colorantes, saborizantes u otros medicamentos.
- Embarazo: Usted debe comunicar a su médico si está embarazada o planea estarlo.
- Lactancia: Se recomienda no administrar durante la lactancia, a menos que su médico le indique lo contrario.
- Niños y Ancianos: Los efectos adversos descritos en adultos pueden presentarse con mayor probabilidad en estos grupos etáreos.
- Contraindicado en caso de antecedentes de alcoholismo o adicción a drogas o en episodios agudos de intoxicación por alcohol o drogas.
- Este medicamento puede afectar la capacidad de reacción lo que puede comprometer la capacidad de conducir o emplear maquinaria, según el uso, la dosis y grado de sensibilidad individual. Consulte a su médico.
- Este medicamento no debe administrarse en pacientes con enfermedad hepática grave, insuficiencia respiratoria grave, miastenia grave y glaucoma de ángulo estrecho.
- No se debe consumir alcohol durante el tratamiento con este producto.
- Este producto puede causar dependencia psíquica o física, especialmente cuando se toma por largo tiempo o altas dosis. Algunos signos de dependencia son:
  - Necesidad de aumentar la dosis para experimentar los efectos del medicamento.
  - Efectos de privación (por ejemplo inestabilidad, nerviosismo, alteraciones del sueño, calambres abdominales o gástricos, temblor o agitación) que aparecen después de la suspensión del medicamento.

#### INTERACCIONES:

El efecto de un medicamento puede modificarse por su administración junto con otros (interacciones). Usted debe comunicar a su médico de todos los medicamentos que está tomando ya sea con o sin receta médica antes de usar este fármaco. Se ha descrito interacciones con los siguientes medicamentos: Barbitúricos, fenitoina, carbamazepina, primidona, ácido valproílico, clozapina, medicamentos que actúan sobre el sistema nervioso central.

#### PRESENCIA DE OTRAS ENFERMEDADES:

El efecto de un medicamento puede modificarse por la presencia de una enfermedad, dando lugar a efectos no deseados, algunos de ellos severos. Usted debe comunicar a su médico si padece de alguna enfermedad, principalmente en los casos siguientes: Enfermedades cerebrales, dificultad para tragar (niños), enfermedades respiratorias crónicas (enfisema, asma, bronquitis, etc.), glaucoma, hiperactividad, depresión mental, enfermedades mentales severas, miastenia grave, apnea del sueño (detención de la respiración durante el sueño), epilepsia, o antibióticos de convulsiones, enfermedades hepáticas o renales.

#### EFFECTOS ADVERSOS (no deseados):

Los medicamentos pueden producir algunos efectos no deseados además de los que se pretende obtener. Algunos de estos efectos pueden requerir atención médica. Consulte inmediatamente el médico si presenta algunos de los síntomas siguientes: Ansiedad, confusión (más común en ancianos), pulso rápido, marcado o irregular, pérdida de la memoria de eventos ocurridos después de tomar este medicamento, depresión mental. **Raros:** Rocio alterado, pérdida del sentido de la realidad, agitación, cambios de conducta, incluyendo conducta agresiva y extravagante, convulsiones, desinhibición, alucinaciones, disminución de la presión sanguínea, debilidad muscular, fiebre, escalofríos, alteraciones del sueño, movimientos incontrolables del cuerpo, incluyendo los ojos, excitación inusual, sangramiento o aparición de hematomas nasal, cansancio inusual (severo). Pueden ocurrir otros efectos no deseados que usualmente no requieren atención médica y que desaparecen con el uso (adaptación del organismo al medicamento). No obstante si continúan o se intensifican debe comunicarlo a su médico.

Torpeza, inestabilidad, mareos, somnolencia, dificultad para hablar. Menos comunes o raros: Dolores o calambres gástricos o abdominales, visión borrosa u otras alteraciones del deseo sexual, estreñimiento, diarrea, sequedad de la boca o sed aumentada, falsa sensación de bienestar, dolor de cabeza, secreciones bronquiales aumentadas, espasmos musculares, náuseas y vómitos, problemas con la micción, agitación, cansancio o debilidad inusual. Si usted nota cualquier otro efecto molesto no mencionado consulte con el médico. Después que usted deje de tomar este medicamento, su organismo puede requerir algún tiempo para regularse. Si durante este tiempo nota alguno de los siguientes efectos, consulte inmediatamente a su médico.

Más comunes: Irritabilidad, nerviosismo, alteraciones del sueño. Poco comunes: Calambres gástricos o abdominales, confusión, pulso rápido o acentuado, audición aumentada, sensibilidad aumentada al tacto y al dolor, sudoración aumentada, pérdida del sentido de la realidad, depresión, calambres musculares, náuseas o vómitos, sensibilidad a la luz, temblores, agitación, sensación de hormigueo, ardor o picazón. Raros: Confusión en el espacio y el tiempo, convulsiones, sensación de sospecha o desconfianza, alucinaciones.

Otros efectos no señalados pueden ocurrir en algunos pacientes. Si nota otro efecto comuníquelo a su médico.

#### CONTRAINDICACIONES:

No usar en:  
- Pacientes que han demostrado hipersensibilidad (alergias) al Clonazepam, a otras benzodiazepinas (tranquilizantes menores) o a alguno de los excipientes de la formulación.  
- Pacientes con antecedentes de farmacodependencia, abuso de drogas o alcoholismo.  
- Pacientes afectados de miastenia grave.  
- Pacientes con evidencia clínica o bioquímica de enfermedad hepática.  
- Pacientes con glaucoma de ángulo estrecho.  
- Pacientes con insuficiencia respiratoria grave.

#### SOBREDOSIS:

Ante la eventualidad de una sobredosificación o ingestión accidental, consulte al médico o recurra a un centro asistencial.

#### PRESENTACIÓN:

Envase con 30 comprimidos bistranurados.

#### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:

Como todo medicamento, mantener fuera del alcance de los niños. Mantener en su envase original. Almacenar a no más de 30°C.

No use este producto después de la fecha de vencimiento indicada en el envase.

No repita el tratamiento sin consultar antes con el médico. No recomende este medicamento a otra persona.

Elaborado por Laboratorio Bagó de Chile S.A.  
Av. Vicuña Mackenna 1835, Santiago-Chile.  
Distribuido por Novofarma Service S.A.  
Victor Uribe 2280, Quilicura, Santiago-Chile.

**Bagó**