Desarrollo de una solución oral no estéril, sin azúcar y conteniendo zinc 2 mg/mL, para el tratamiento de la diarrea en niños menores de 5 años

Edward Mauricio Echeverri Pineda, Daniel Fernando Echeverri Alquichire*

Universidad CES, Calle 10A #22-04, Medellín, Colombia.

*Autor para correspondencia: eecheverrip@ces.edu.co

RESUMEN

Introducción: A nivel mundial y nacional, la mayor incidencia y mortalidad de la diarrea se presenta en los niños menores de 5 años. Se ha demostrado que el zinc reduce la gravedad, duración y evitar la posterior reaparición de la diarrea hasta por 3 meses. La mejor manera de administrar un medicamento en la población pediátrica es mediante las soluciones orales, estas deben cumplir con determinadas características para facilitar la dosificación en esta población, no obstante, suelen poseer un alto contenido de azúcar, que puede interferir en el episodio de diarrea. **Metodología:** Se llevó a cabo el desarrollo de 3 lotes, de los cuales 2 tenían povidona K-90 como modificador de viscosidad, el lote restante se manufacturó sin povidona. Se prepararon los reactivos y medios de cultivo necesarios para los ensayos del producto terminado. Tras obtener el producto terminado, se realizaron las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas descritas en la monografía del sulfato de zinc solución oral de la USP 42 NF 37. **Resultados**: Se obtuvieron 2 lotes de una formulación con povidona K-90 y 1 sin povidona K-90 que cumplen con los criterios de calidad de la USP, es decir, pH, valoración y microbiología, exceptuando la gravedad especifica. **Conclusiones:** El metilparabeno fue efectivo como conservante, a pesar de que se suele utilizar en combinación con propilparabeno, es conveniente determinar ausencia de *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus Aureus* y *Pseudomonas Aeruginosa*, son análisis necesarios en un producto no estéril, además, es necesario continuar con pruebas de estabilidad y validar la técnica analítica.

Palabras clave: Sulfato de zinc, sin azúcar, diarrea, povidona, formulación.

INTRODUCCIÓN

La diarrea se define como la deposición de heces blandas o líquidas, que se presentan más de 2 o 3 veces por día, esta puede tener diferentes causas, desde una infección bacteriana (principalmente por *Escherichia Coli)*, viral (rotavirus) o parasitaria (como *Crytosporidium)*, producto del consumo de agua o alimentos contaminados, pero también puede ser causada por la desnutrición (1,2). La mayor incidencia y mortalidad de la diarrea se presenta en los niños menores de 5 años(1,3) de hecho, según estimaciones de la OMS, es la segunda causa de muerte en este rango de edad, con alrededor de 760000 de muertes cada año (2). En Colombia, los datos del instituto nacional de salud muestran que en el 2018 se reportaron más de 650000 casos de enfermedades diarreicas en niños hasta los 4 años, en cuanto a la mortalidad, para el 2017 hubo 128 muertes a causa de la diarrea aguda en niños menores de 5 años(4,5), estos datos resultan críticos si consideramos que las enfermedades diarreicas suelen ser prevenibles y tratables.

El zinc es un micronutriente involucrado en el crecimiento y la diferenciación celular, también mejora la respuesta inmunitaria y la absorción de agua y electrolitos(6,7) . Se han realizado estudios que relacionan el zinc con un aumento en la estatura en niños menores de 5 años (8,9), pero, más específicamente, se ha relacionado el zinc con una reducción en la duración y gravedad del episodio de diarrea, acompañado de un menor riesgo de una posible recurrencia del episodio diarreico en hasta 3 meses, también se ha visto que la deficiencia de zinc conlleva a una reducción del peso, junto a una menor respuesta inmunitaria, ambos factores pueden propiciar la aparición de un episodio diarreico(7). El mecanismo por el cual el zinc interviene en el episodio diarreico es amplio, el zinc mejora la regeneración del epitelio intestinal y aumenta los niveles de enzimas en el borde en cepillo, favoreciendo el transporte intestinal (6), en la respuesta inmunológica, el zinc interviene en la respuesta del huésped frente a un patógeno, generando un aumento de anticuerpos específicos para antígenos y estimulando la proliferación de linfocitos(6). La OMS recomienda las sales de rehidratación oral y la administración de 20 mg de zinc en mayores de 6 meses y 10 mg en menores de 6 meses durante 10-14 días para el tratamiento y prevención de la diarrea(7), lo que sugiere que es una adecuada estrategia de tratamiento, con claras limitaciones que incluyen el difícil acceso.

Las soluciones orales pueden ser la manera más efectiva de administrar un medicamento o suplemento en la población pediátrica, por su facilidad para tragar(10), sin embargo, se hace necesario enmascarar el sabor mediante el uso de edulcorantes calóricos o no calóricos, debido a que el principio activo se encuentra disuelto en el líquido, lo cual favorece el estímulo de las papilas gustativas, el sabor es importante en la población pediátrica, porque tiene una gran influencia en la facilidad para administrar un medicamento o suplemento en el niño, para enmascarar el sabor del principio activo, se suele utilizar sacarosa como agente edulcorante, la cual es ampliamente utilizada en las formulaciones farmacéuticas orales en hasta el 67% p/p (11), debido a su estabilidad en un amplio rango de pH, su capacidad para modificar la viscosidad de un preparado líquido, es

soluble en agua y además, dependiendo de la concentración, puede funcionar como un conservante(10), sin embargo, la sacarosa es bien conocida por su potencial cariogénico, además, puede empeorar el episodio de diarrea, puesto que estimula al intestino a expulsar el agua y los electrolitos (12), por esta razón se desarrolló una formulación de sulfato de zinc sin azúcar, para el tratamiento de la diarrea en niños menores de 5 años, considerando los componentes de una formulación oral líquida, tales como el disolvente, edulcorante, tampón de pH, colorante, modificadores de la viscosidad, entre otros, cuya elección debe ir ligada a las características que debe poseer una formulación oral líquida, como la completa solubilidad, viscosidad, preservación de la calidad y la apariencia del producto, es decir, relacionando su sabor con un color característico que se asocie a dicho sabor, todo esto haciendo uso de la tecnología de fabricación adecuada y cumpliendo con los parámetros de calidad fisicoquímicos y microbiológicos descritos en la monografía de la USP 42 NF 37 para el sulfato de zinc solución oral.

METODOLOGÍA

Materiales

La preparación de las formulaciones se realizó en beakers de 250 mL, las materias primas utilizadas para las formulaciones fueron: sulfato de zinc heptahidratado (Merck KGaA ®), ácido cítrico (Quimifast SAS), Sorbitol 70% (Protokimica), metilparabeno sódico (Quimifast SAS), povidona K-90 (Químicos JM), sucralosa (Quimifast SAS), sabor a fresa (Disaromas SA) y color rojo FD&C No.40, estas se obtuvieron del centro para la ciencia y la investigación farmacéutica (CECIF) y se pesaron en balanza analítica (Shimadzu), el agitador mecánico (DragonLAB ®), calentador (Thermo scientific), medidor de pH (Hach ®), autoclave (Gemmy), reactivos como el negro de eriocromo T (Merck KGaA ®), clorhidrato de hidroxilamina (Merck KGaA ®), metanol (Scharlab), cloruro de amonio (Scharlab), hidróxido de amonio (Scharlab), los medios de cultivo como el agar digerido de caseína y soja (Merck KGaA ®), agar sabouraud dextrosa (Merck KGaA ®) y el medio de enriquecimiento caldo casoy (Merck KGaA ®) fueron puestos a disposición por el centro para la ciencia y la investigación farmacéutica (CECIF) para el desarrollo de las formulaciones, junto con el respectivo análisis fisicoquímico y microbiológico de estas. Se fabricaron 3 lotes, 2 de ellos con povidona K-90 como modificador de viscosidad y 1 lote sin povidona.

Desarrollo de las formulaciones

Inicialmente se realizó una revisión bibliográfica para determinar los excipientes que podrían hacer parte de la formulación, una vez definidos, se revisó que no hubiera incompatibilidad entre estos y se desarrolló un lote previo, a partir de la cual se estandarizó el método de fabricación y se modificó la cantidad de ácido cítrico que sería utilizada en los 3 lotes del ensayo. Una vez definidos los cambios a realizar en el método de fabricación y en las materias primas, se desarrollaron 2

formulaciones, cuya variación fue la presencia de povidona como modificador de viscosidad de la solución. Las tablas 1 y 2 muestran las formulaciones desarrolladas.

Tabla 1. Formulación con povidona

Materia prima	Función	Cantidad por producto (g/100 mL)	Cantidad por lote (g/200 mL)	% p/v
Sulfato de zinc heptahidratado	Principio activo	0,8793	1,7586	0,8793
Sucralosa	Edulcorante	0,5	1	1
Metilparabeno sódico	Conservante antimicrobiano	0,18	0,36	0,18
Povidona K-90	Modificador de viscosidad	5	10	5
Sorbitol 70%	Edulcorante	40	80	40
Ácido cítrico	Buffer	0,5	1	0,5
Sabor a fresa	Saborizante	1	2	1
Color rojo N°40	Colorante	0,01	0,02	0,01
Agua tipo II c.s.p 200 mL	Disolvente	51,4	102,8	51,4

Tabla 2. Formulación sin povidona

Materia prima	Función	Cantidad por producto (g/100 mL)	Cantidad por lote (g/200 mL)	% p/v
Sulfato de zinc heptahidratado	Principio activo	0,8793	1,7586	0,8793
Sucralosa	Edulcorante	0,5	1	1
Metilparabeno sódico	Conservante antimicrobiano	0,18	0,36	0,18
Sorbitol 70%	Edulcorante	40	80	40
Ácido cítrico	Buffer	0,5	1	0,5
Sabor a fresa	Saborizante	1	2	1
Color rojo N°40	Colorante	0,01	0,02	0,01
Agua tipo II c.s.p 200 mL	Disolvente	56,34	112,68	56,34

Fabricación de la formulación con povidona

El **desarrollo** de la **formulación con povidona** se llevó a cabo en 3 fases, la **fase A** consistió en calentar 60g de agua hasta 70°C, una vez alcanzada la temperatura objetivo, se adicionó 10g de povidona, se mezcló manualmente durante 5 minutos y se mantuvo la temperatura entre 70°C y 85°C, pasados los 5 minutos se llevó el beaker con la mezcla al agitador mecánico, con aspa de corte y se ajustó a 1200 rpm durante 10 minutos. La **fase B** consistió en mezclar manualmente 1,7586g de sulfato de zinc heptahidratado con 20g de agua hasta alcanzar completa solubilidad, seguido de la adición de 0,36g de metilparabeno sódico, se mezcló manualmente hasta alcanzar completa solubilidad. La **última fase** fue la adición de la fase B en la fase A, seguido de agitación mecánica con aspas de hélice a 1200 rpm durante 10 minutos, una vez alcanzado el tiempo se adicionó 1g de sucralosa y 1g de ácido cítrico, seguido de una adición lenta de 80g de sorbitol, se procedió a mezclar con el agitador mecánico a 1200 rpm durante otros 10 minutos, finalmente se adicionó 2g del saborizante, 0.02g del colorante rojo y agua c.s.p 200 mL, seguido de agitación mecánica con aspas de hélice hasta alcanzar completa solubilidad.

Fabricación de la formulación sin povidona

La **formulación sin povidona** se preparó mezclando manualmente 20g de agua con 0,36g de metilparabeno sódico y 1,7586g de sulfato de zinc heptahidratado, seguido de la adición de 20g de agua con 1g de ácido cítrico y 1g de sucralosa con un leve mezclado manual, posteriormente se llevó al agitador mecánico con aspas de hélice, se adicionó 80g de sorbitol y 20g de agua, se ajustó el agitador a 1200 rpm durante 10 minutos, cumplido el tiempo se agregó 1g de saborizante y 0.02g del colorante rojo, se mezcló a 1200 rpm hasta lograr completa solubilidad.

Pruebas fisicoquímicas y microbiológicas

Medición del pH y la gravedad especifica

El pH se midió por cada lote, utilizando un medidor de pH. La gravedad especifica se calculó utilizando la ecuación 1, para un producto con povidona y sin povidona, haciendo uso de un picnómetro y de la balanza analítica.

$$\frac{\text{[illegible]} - \text{[illegible]}}{\text{[illegible]} - \text{[illegible]}} \qquad \textbf{(1)}$$

Preparación de las soluciones de reactivos (SR)

Previo a las pruebas de valoración de la materia prima y del producto terminado, se prepararon las soluciones de reactivo (SR) siguiendo las instrucciones de la USP 42 NF 37. Para el buffer cloruro de amonio-hidróxido de amonio se mezclaron 100 mL de agua y 100 mL de hidróxido de amonio y se saturó la solución con cloruro de amonio. El indicador negro de eriocromo se preparó disolviendo 200 mg de negro de eriocromo T y 2g de clorhidrato de hidroxilamina en metanol hasta obtener 50 mL. El EDTA 0.05 M fue preparado llevando 18,6g de edetato disódico a un volumen de 1000 mL con agua tipo II.

Valoración del sulfato de zinc heptahidratado

Para la valoración de la materia prima sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$) se siguió el procedimiento descrito en la USP 42 NF 37 para valoración de sulfato de zinc ($ZnSO_4$), el cual menciona que es necesario pesar una cantidad equivalente a 170 mg de $ZnSO_4$, por lo cual se pesaron arbitrariamente alrededor de 50 mg (50,8 mg) de $ZnSO_4.7H_2O$ para calcular la cantidad de $ZnSO_4.7H_2O$ que equivaldrían a 170 mg de $ZnSO_4$, es decir, 302,77 mg de $ZnSO_4.7H_2O$. Adicionalmente, se utilizaron los 50,8 mg de $ZnSO_4.7H_2O$ para verificar que la solución se tornara color azul como indicativo tras la titulación.

A los 302,77 mg de $ZnSO_4.7H_2O$ se le adicionó 100 mL de agua tipo II, 5 mL del buffer y alrededor de 0,1 mL del indicador, se tituló con EDTA 0,05M hasta obtener una solución color azul como indicativo.

Valoración del producto terminado

Teniendo en cuenta que en cada mililitro de solución hay 2 mg de zinc elemental y que 8,793 mg de $ZnSO_4.7H_2O$ contienen 2 mg de zinc elemental, se calculó la cantidad en mililitros de muestra que debían tomarse para realizar la valoración del producto terminado, esto es, 34.434 mL del producto.

A partir del volumen calculado, y de la gravedad específica, se halló la cantidad en gramos de muestra necesaria para el análisis de valoración de producto terminado, de manera que se tomaron 38,07g de muestra de cada lote con povidona y 37,83g de muestra del lote sin povidona, seguido de la adición de 100 mL de agua tipo II, 5 mL del buffer y alrededor de 0,1 mL del indicador en cada muestra, titulándose con EDTA 0,05M hasta obtener un cambio en el color rojizo de la solución y se midió el volumen consumido de EDTA, este procedimiento se realizó por triplicado para cada lote y el porcentaje de valoración se calculó haciendo uso de la ecuación 2.

$$\frac{[\square\square * \square * \square * \square . \square]}{\square\square\square\square * \square} * 100\% \qquad \textbf{(2)}$$

Vs = Volumen de EDTA consumido por la muestra (mL)

M = Masa molar del EDTA (mmol/mL)

F = Peso molecular del $ZnSO_4.7H_2O$, es decir, 287.579 mg/mmol

g.e = Gravedad especifica (g/mL)

Dosis = 8,793 mg/mL

W = Peso de la muestra

Pruebas microbiológicas

Se llevó a cabo pruebas microbiológicas para mesófilos aerobios, utilizando como medio de cultivo agar digerido de caseína y soja, también se llevaron a cabo pruebas para hongos filamentosos y levaduras, utilizando agar sabouraud dextrosa como medio de cultivo, para el enriquecimiento de las muestras se utilizó caldo de tripticasa de soya.

El caldo tripticasa de soya se preparó llevando 12g a 300 mL de agua tipo II, se calentó y agito con un magneto hasta alcanzar completa solubilidad, durante el calentamiento se retiraron 4 mL y se agregaron 4 mL de polisorbato 80 al 1%, se envasó en 3 frascos, quedando distribuido en 90 mL por frasco, dejando un ligero excedente de 30 mL. Los 3 frascos de 90 mL se llevaron a un autoclave durante 1 hora.

Para el agar digerido de caseína y soja se tomaron 7,2g de agar y se le añadió 105 mL de agua tipo II, se calentó y agito con un magneto hasta completa solubilidad, se envaso en un solo frasco.

El agar sabouraud dextrosa se preparó tomando 11,7g de agar y se le adicionó 105 mL de agua tipo II, se calentó y agito con un magneto hasta completa solubilidad, se envaso en un solo frasco. Los dos agares envasados se llevaron a un autoclave durante 1 hora.

Para la siembra de las muestras, se tomaron 10g de muestra por cada uno de los 3 lotes y se adicionaron en 3 frascos diferentes que contenían 90 mL del medio de enriquecimiento, posteriormente, haciendo uso de una micropipeta, se tomó 1 mL de muestra enriquecida y se adicionó en una caja de petri, seguido de la adición de aproximadamente 15 mL del agar correspondiente, este procedimiento se realizó para cada muestra enriquecida de cada lote y por duplicado para cada agar, además se prepararon dos blancos, uno con agar digerido de caseína y soja y otro con agar sabouraud dextrosa.

Se incubaron las placas con agar digerido de caseína y soja a una temperatura entre 30-35°C durante 5 días, las placas con agar sabouraud dextrosa se incubaron a una temperatura entre 20-25°C durante 7 días y se evaluó el crecimiento microbiano haciendo un recuento del número de colonias.

RESULTADOS

Organolépticos

Como resultado del método de fabricación y de los excipientes implicados en el proceso, se obtuvieron tres lotes que corresponden a dos formulaciones liquidas color rojo y con sabor a fresa, de fácil administración vía oral, debido a sus propiedades reológicas modificadas principalmente por la povidona y/o el sorbitol 70%.

Fisicoquímicos y microbiológicos

Durante la evaluación fisicoquímica del lote fabricado para realizar ajustes en el proceso de fabricación y en las materias primas, se encontró que el pH estaba en el límite inferior, es decir, 2.5, razón por la cual, para la elaboración de los lotes piloto se modificó la cantidad de ácido cítrico, pasando de 2g a 1g por lote. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos para los 3 lotes fabricados.

Tabla 3. Resultados fisicoquímicos y microbiológicos

Lote	pH	Gravedad especifica	%Valoración / %RSD	RTMA	RTCML
1 (Con povidona)	2,72	1,1057	100,5 / 4,03	<200 UFC/mL	<20 UFC/mL
2 (Con povidona)	2,71	1,1057	101,8 / 2,41	<200 UFC/mL	<20 UFC/mL
3 (Sin povidona)	2,62	1,0986	100,7 / 1,23	<200 UFC/mL	<20 UFC/mL

*%Valoración/%RSD para una muestra de n = 3
*RTMA = Recuento total de microorganismos aerobios
*RTCHL = Recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras

La cantidad de EDTA consumida por el blanco fue de 0.3 mL. Se presentó crecimiento microbiano en el blanco de agar digerido de caseína y soya.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIOENES

El producto desarrollado cumplió con las especificaciones de calidad descritas en la USP, esto es, valoración entre 90%-110%, pH entre 2,5-4,5, a excepción de la gravedad específica, la cual estuvo por debajo de la especificación, que es entre 1,18-1,24, sin embargo, esto es lógico si se considera que las monografías de la USP para las soluciones orales se basan en el supuesto de que estas contendrán sacarosa como agente edulcorante, por lo que la cantidad elevada de sacarosa conlleva a un aumento en la gravedad específica, una formulación que contenga un edulcorante artificial no alcanzará la especificación, puesto que el % p/v de edulcorante artificial utilizado siempre será menor al % p/v de sacarosa.

El metilparabeno fue efectivo para la conservación del medicamento contra microorganismos aerobios y mohos-levaduras, a pesar de que este conservante se suele utilizar en combinación con propilparabeno, en una relación 9:1 para lograr una adecuada conservación del producto, sin embargo, el crecimiento microbiano en el blanco de agar digerido de caseína y soja sugiere una contaminación del agar previo a la extensión de este sobre la caja de petri, a pesar de estos resultados, es conveniente realizar determinados análisis microbiológicos para determinar ausencia de *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus Aureus* y *Pseudomonas Aeruginosa*, puesto que son análisis necesarios en un producto no estéril.

Si bien los resultados sugieren un cumplimiento fisicoquímico y en cierta medida microbiológico del producto desarrollado, sería necesario continuar con pruebas de estabilidad natural y acelerada, esto con el fin de comprobar si las características de calidad evaluadas se mantienen a lo largo del tiempo dentro de las especificaciones descritas, estas pruebas no se desarrollaron debido a una limitación de tiempo, además tampoco fue posible medir la viscosidad del producto, puesto que no se contaba con el equipo necesario para este fin.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal técnico del centro para la ciencia y la investigación farmacéutica (CECIF) por su ayuda durante el desarrollo del proyecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. WHO | Enfermedades diarreicas [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 23 de mayo de 2021]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact sheets/detail/diarrhoeal-disease

2. MSF | Diarrea [Internet]. MSF. Médicos Sin Fronteras Colombia. 2016 [citado 23 de mayo de 2021]. Disponible en: https://www.msf.org.co/conocenos/enfermedades/diarrea

3. Galvis Ramírez V, Bustamante García MA, Sarmiento Limas CA. Guia de atención de la enfermedad diarreica aguda [Internet]. Ministerio de salud; Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/17Atencion%20de%20EDA.PDF

4. Instituto nacional de salud. EDA PE XIII 2018.pdf [Internet]. [citado 30 de mayo de 2021]. Disponible en:

https://www.ins.gov.co/buscador/Informesdeevento/EDA%20PE%20XIII%202018.pdf#search=EDA%202018

5. Delgado Malagón M. Informe de evento XII. COLOMBIA, 2017. 2018;(03):17.

6. Bajait C, Thawani V. Role of zinc in pediatric diarrhea. Indian J Pharmacol. 2011;43(3):232-5.

7. OMS | Administración de suplementos de zinc en el tratamiento de la diarrea [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 23 de mayo de 2021]. Disponible en: https://www.who.int/elena/titles/bbc/zinc_diarrhoea/es/

8. WHO | Zinc supplementation and growth in children [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 23 de mayo de 2021]. Disponible en: https://www.who.int/elena/bbc/zinc_stunting/en/

9. Imdad A, Bhutta ZA. Effect of preventive zinc supplementation on linear growth in children under 5 years of age in developing countries: a meta-analysis of studies for input to the lives saved tool. BMC Public Health. 13 de abril de 2011;11(Suppl 3):S22.

10. Aulton M. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2.ª ed. España: ELSEVIER; 2004. 681 p.

11. Rowe R, Sheskey P, Quinn M. Handbook of pharmaceutical excipients. 6.ª ed. 2009. 888 p.

12. Harvard Health. Is something in your diet causing diarrhea? [Internet]. Harvard Health. 2019 [citado 23 de mayo de 2021]. Disponible en: https://www.health.harvard.edu/digestive-health/is-something-in-your-diet-causing-diarrhea