

80. CONSERVANTES

CONSERVANTES ANTIMICROBIANOS

Son sustancias auxiliares que se incorporan a las preparaciones farmacéuticas no estériles para protegerlas de la contaminación microbiana.

En las preparaciones farmacéuticas estériles multidosis los conservantes son incorporados para inhibir el crecimiento de microorganismos que puedan ser introducidos durante la dosificación. En ningún caso se debe emplear un conservante para prevenir contaminaciones debidas a malas prácticas de elaboración.

Para evitar efectos adversos, la concentración de los conservantes en el producto terminado debe ser la concentración mínima que presenta el efecto antimicrobiano buscado y considerablemente más baja que la concentración tóxica en seres humanos.

Se establecen a continuación los ensayos de *Eficacia Antimicrobiana y Contenido*.

EFICACIA ANTIMICROBIANA

La concentración de un conservante antimicrobiano agregado puede mantenerse al mínimo si los ingredientes activos de la formulación poseen eficacia antimicrobiana intrínseca. La eficacia antimicrobiana, ya sea inherente al producto o debida a la adición de un conservante antimicrobiano, debe ser demostrada para todos los productos estériles en envases multidosis y para las preparaciones farmacéuticas categorizadas en *Tabla 1*.

Estos ensayos se aplican al producto de ser posible en su envase original, asegurando la eficacia antimicrobiana durante toda su vida útil.

Categorización de Preparaciones Farmacéuticas

Para los fines de los ensayos, las preparaciones farmacéuticas han sido divididas en cuatro categorías (ver *Tabla 1*). Los criterios de eficacia antimicrobiana para estas preparaciones se establecen en función de la vía de administración.

Tabla 1. Categorización de Preparaciones Farmacéuticas

Categoría	Descripción del Producto
1	Inyectables, otras preparaciones estériles con bases o vehículos

	acuosos y productos óticos.
2	Todas las preparaciones no estériles con bases o vehículos acuosos, a excepción de las preparaciones de administración oral.
3	Preparaciones orales con bases o vehículos acuosos, a excepción de antiácidos.
4	Antiácidos preparados con base acuosa.

Microorganismos de ensayo

Emplear cultivos con no más de cinco pasajes desde su extracción del cultivo original de los microorganismos que figuran en la *Tabla 2*.

Para los fines del ensayo, un pasaje se define como la transferencia de microorganismos desde un cultivo establecido a un medio nuevo. Todas las transferencias cuentan. En el caso de microorganismos mantenidos mediante técnicas de siembra en lote, cada ciclo consiste en congelar, descongelar y hacer desarrollar los microorganismos en un medio nuevo, se considera un único pasaje.

Pueden utilizarse cepas aptas para tales fines pertenecientes a colecciones de cultivos microbianos reconocidas por la World Federation of Culture Collections (WFCC).

Se recomienda incorporar *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92) para preparaciones orales que contengan alta concentración de azúcar.

Además de los microorganismos mencionados, se pueden incluir otros, especialmente aquellos que puedan introducirse durante el uso del producto.

Medios

Para el cultivo inicial de los microorganismos se debe seleccionar el medio indicado en *Tabla 2*.

Tabla 2. Microorganismos de Ensayo

Microorganismo	Preparación de Cepas de Prueba
<i>Staphylococcus aureus</i> Por ejemplo ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 - 35 °C 18-24 horas

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Por ejemplo ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 o NBRC 13275	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 - 35 °C 18 - 24 horas
<i>Escherichia coli</i> Por ejemplo ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 o NBRC 3972	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 - 35 °C 18 - 24 horas.
<i>Candida albicans</i> Por ejemplo ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 o NBRC 1594	Agar Sabouraud Dextrosa, Caldo Sabouraud Dextrosa 20 - 25 °C 48 horas. Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 - 35 °C 24 - 48 horas.
<i>Aspergillus brasiliensis</i> Por ejemplo ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 o NBRC 9455	Agar Sabouraud Dextrosa 20 - 25 °C 5-7 días o hasta alcanzar una buena esporulación.

Preparación del inóculo

Antes de llevar a cabo el ensayo, inocular en superficie sendas placas de Petri que contengan un volumen apropiado del medio seleccionado, con cultivos madre recientemente desarrollados de cada uno de los microorganismos especificados. Incubar los cultivos según lo indicado en *Tabla 2*. Recolectar los cultivos bacterianos y de *C. albicans* empleando Solución fisiológica (SR) estéril. Transferir el líquido a un recipiente apropiado y agregar suficiente Solución fisiológica (SR) estéril para obtener un recuento microbiano aproximado de 10^8 unidades formadoras de colonias por mL (ufc/mL). Para recolectar el cultivo de *A. brasiliensis*, emplear Solución fisiológica (SR) estéril que contenga 0,05 % de Polisorbato 80 y ajustar el número de esporas aproximado de 10^8 ufc/mL, agregando Solución fisiológica (SR) estéril de ser necesario. Alternativamente, los microorganismos del cultivo madre pueden desarrollarse en un medio líquido apropiado y las células recolectarse por centrifugación, lavarse y resuspenderse en Solución fisiológica (SR) estéril hasta llegar al número ufc/mL requerido.

Determinar en cada suspensión preparada el número de ufc/mL utilizando el método de recuento en placa. Este valor sirve para calcular el tamaño del inóculo a ser empleado en el ensayo.

Procedimiento

Inocular la cantidad calculada de las suspensiones preparadas en sendos envases originales del producto.

Cuando el envase del producto se presenta con un tapón de goma, que permita acceder al contenido asépticamente por medio de una aguja y una jeringa, llevar a cabo el ensayo en cinco envases originales del producto.

Si el envase del producto no permite la inoculación aséptica, transferir muestras de 20 g ó mL del producto a cada uno de cinco tubos de ensayo u otro recipiente apropiado estéril y cerrado.

Inmediatamente después de la inoculación, cada envase o recipiente debe contener entre 10^5 y 10^6 ufc/g ó mL para las Categorías 1, 2 y 3 y entre 10^4 y 10^5 ufc/g ó mL para la Categoría 4. El volumen de inóculo no debe ser mayor al 1% del volumen total del producto.

Verificar el número de microorganismos viables en cada suspensión del inóculo por el método de recuento en placa para calcular la concentración inicial de microorganismos por g ó mL del producto en ensayo. Esta determinación se deberá efectuar en el momento de la inoculación de cada suspensión preparada en el producto.

Mantener los envases o recipientes inoculados a una temperatura entre 20 y 25 °C. Tomar muestras de cada envase o recipiente en, al menos, los intervalos especificados en *Tabla 3*. Registrar cualquier cambio de aspecto y determinar el número de microorganismos viables presentes en cada intervalo de tiempo utilizando un método cuya aptitud haya sido demostrada. Calcular la concentración de cada microorganismo en cada etapa del ensayo.

Interpretación de Resultados

Los requisitos de eficacia antimicrobiana se cumplen si se alcanzan los criterios especificados en *Tabla 3*. La expresión "ningún incremento" se define como no más de 0,5 unidades de \log_{10} por encima del valor de comparación.

Tabla 3. Criterios de aceptación para microorganismos evaluados.

Productos de Categoría 1	
Bacterias	A los 7 días, una reducción logarítmica de no menos de 1,0 desde el recuento calculado en el inicio; a los 14 días, una reducción logarítmica de no menos de 3,0 del recuento inicial; y a los 28 días ningún incremento del recuento de los 14 días.
Levaduras y Hongos filamentosos	Ningún incremento a los 7, 14 y 28 días respecto del recuento inicial.
Productos de Categoría 2	
Bacterias	A los 14 días, una reducción logarítmica de no menos de 2,0 desde el recuento inicial; y a los 28 días ningún incremento del recuento de los 14 días.
Levaduras y Hongos filamentosos	Ningún incremento a los 14 y 28 días respecto del recuento inicial.
Productos de Categoría 3	
Bacterias	A los 14 días, una reducción logarítmica de no menos de 1,0 del recuento inicial; y a los 28 días ningún incremento del recuento de los 14 días.
Levaduras y Hongos filamentosos	Ningún incremento a los 14 y 28 días respecto del recuento inicial.
Productos de Categoría 4	
Bacterias, Levaduras y Hongos filamentosos	Ningún incremento a los 14 y 28 días respecto del recuento inicial.

CONTENIDO

Los métodos proporcionados aquí se emplean para demostrar que el conservante está presente y su concentración no excede en más de 20 % la cantidad declarada.

La concentración de un conservante agregado a una preparación parenteral, ótica, nasal u oftálmica, monodosis o multidosis puede disminuir durante la vida útil del producto. Debido a esto, el elaborador determinará la menor concentración a la cual el conservante es eficaz. En el momento de su elaboración y durante el período de vida útil, el producto debe contener la cantidad declarada de conservante (dentro de $\pm 20\%$, considerando las variaciones debidas al proceso de elaboración y al almacenamiento hasta la fecha de vencimiento).

Los agentes más comúnmente empleados incluyen, los cuatro ésteres homólogos del ácido *p*-hidroxibenzoico, fenol, alcohol bencílico, clorobutanol y dos derivados mercuriales, nitrato fenilmercurio y timerosal. Para la determinación de los derivados mercuriales se emplean métodos polarográficos, mientras que la cromatografía de gases se emplea en la determinación de los otros agentes. En caso de emplear un conservante o un método de cuantificación, diferente a los descritos a continuación, deberá realizarse su cuantificación empleando un método debidamente validado (ver 1130. *Validación de métodos analíticos*).

A menos que se indique de otro modo, preparar las soluciones estándar con una materia prima o un reactivo analítico de calidad adecuada.

MÉTODO GENERAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Los procedimientos generales que se establecen a continuación son aplicables a la determinación cuantitativa del alcohol bencílico, clorobutanol, fenol y los ésteres metílico, etílico, propílico y butílico del ácido *p*-hidroxibenzoico, tratándose éstos últimos como un grupo, aunque el método puede emplearse para la determinación individual. Preparar la *Solución del estándar interno* y la *Preparación estándar* para cada agente según se indica a continuación para cada

caso. A menos que se indique de otro modo, preparar la *Preparación muestra* con porciones exactamente medidas de la *Solución del estándar interno* y la muestra, de modo que la concentración del conservante y la composición del solvente sean similares a la concentración y a la composición de la *Preparación estándar*. Los parámetros operativos sugeridos para el cromatógrafo de gases se indican en la *Tabla 4*. Emplear un detector de ionización a la llama y helio o nitrógeno como gas transportador.

Tabla 4. Parámetros operativos sugeridos para el cromatógrafo de gases.

	Fase estacionaria y soporte	Dimensiones de la columna	Caudal (mL/min)	Temperatura de la columna (°C)
Alcohol bencílico	Polietilenglicol al 5 % (peso molecular entre 15.000 y 20.000) sobre soporte de tierra silíceo calcinada y lavada con ácido.	1,8 m × 3 mm	50	140
Clorobutanol	Polietilenglicol al 5 % (peso molecular entre 15.000 y 20.000) sobre soporte de tierra silíceo calcinada y lavada con ácido.	1,8 m × 2 mm	20	110
Fenol	Polietilenglicol al 5 % (peso molecular entre 15.000 y 20.000) sobre soporte de tierra silíceo calcinada y lavada con ácido.	1,2 m × 3 mm	50	145
Parabenos	Dimetilpolisiloxano al 5 % sobre soporte de tierra silíceo calcinada y lavada con ácido.	1,8 m × 2 mm	20	150

Alcohol bencílico

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 380 mg de fenol a un matraz aforado de 200 mL. Disolver en 10 mL de metanol, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 180 mg de alcohol bencílico, exactamente pesados, a un matraz aforado de 100 mL. Disolver en 20,0 mL de metanol, completar a volumen con *Solución del estándar interno* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas con el sistema cromatográfico establecido en la *Tabla 4* y medir las respuestas de los picos correspondientes a alcohol bencílico y al estándar interno en los cromatograma de la

Preparación muestra y la *Preparación estándar*. Calcular el contenido de alcohol bencílico (C₇H₈O) en la muestra en ensayo.

Clorobutanol

[NOTA: mantener el inyector a 180 °C y el detector a 220 °C].

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 140 mg de benzaldehído a un matraz aforado de 100 mL, agregar 10 mL de metanol y agitar hasta disolución. Completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 125 mg de clorobutanol, exactamente pesados, a un matraz aforado de 25 mL. Agregar 2 mL de metanol, agitar hasta disolución, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 mL de esta solución y 5,0 mL de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 25 mL y mezclar

Preparación muestra - Diluir, si fuera necesario, un volumen exactamente medido de la muestra, cuantitativamente con metanol, hasta obtener una solución que contenga no más de 5,0 mg de clorobutanol por mL. Transferir 3,0 mL de esta solución a un recipiente apropiado, agregar 3,0 mL de *Solución del estándar interno* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,8 para benzaldehído y 1,0 para clorobutanol; la resolución, *R*, entre los picos de benzaldehído y clorobutanol no debe ser menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas con el sistema cromatográfico establecido en la *Tabla 4* y medir las respuestas de los picos correspondientes a clorobutanol y al estándar interno. Calcular la cantidad de clorobutanol (C₄H₇Cl₃O) en la muestra en ensayo.

Fenol

Solución del estándar interno - Transferir 1 mL de alcohol bencílico a un matraz aforado de 500 mL, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 75 mg de fenol, exactamente pesados, a un matraz aforado de 100 mL, disolver con 7,5 mL de metanol y agregar 20,0 mL de *Solución del estándar interno*. Completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 3 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas con el sistema cromatográfico establecido en la *Tabla 4* y medir las respuestas de los picos correspondientes a fenol y al estándar interno. Calcular el contenido de fenol (C₆H₆O), en la muestra en ensayo.

Metilparabeno y Propilparabeno

[NOTA: se recomienda trabajar bajo campana de extracción durante la preparación de las soluciones.]

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 200 mg de benzofenona a un

matraz aforado de 250 mL, completar a volumen con éter y mezclar.

Preparación estándar - Transferir 100 mg de metilparabeno y 10 mg de propilparabeno, exactamente pesados, a un matraz aforado de 200 mL, completar a volumen con *Solución del estándar interno* y mezclar. Transferir 10 mL de esta solución a un erlenmeyer de 25 mL y proceder según se indica para la *Preparación muestra*, comenzando donde dice "Agregar 3 mL de piridina...".

Preparación muestra - Transferir 10 mL de muestra y 10 mL de *Solución del estándar interno* a una ampolla de decantación. Agitar vigorosamente y dejar que las fases se separen. Transferir la fase acuosa a una segunda ampolla de decantación y la fase etérea a un erlenmeyer a través de un embudo que contenga sulfato de sodio anhidro. Extraer la fase acuosa con dos porciones de 10 mL de éter y filtrar los extractos a través de sulfato de sodio anhidro. Evaporar los extractos combinados bajo una corriente de aire seco hasta que el volumen se reduzca a 10 mL aproximadamente. Transferir el residuo obtenido a un erlenmeyer de 25 mL. Agregar 3 mL de piridina, completar la evaporación del éter y calentar a ebullición sobre una placa calefactora hasta que el volumen se reduzca a 1 mL aproximadamente. Enfriar y agregar 1,0 mL de un agente silanizante apropiado, como hexametildisilazano al cual se le ha agregado trimetilclorosilano (2:1 o 3:1 v/v), bis(trimetilsilil)acetamida, o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. Mezclar y dejar reposar durante no menos de 15 minutos.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas con el sistema cromatográfico establecido en la *Tabla 4* y medir las respuestas de los picos correspondientes a metilparabeno, propilparabeno y benzofenona. Calcular el contenido de metilparabeno (C₈H₈O₃) y propilparabeno (C₁₀H₁₂O₃) en la muestra en ensayo.

[NOTA: el etilparabeno y el butilparabeno pueden determinarse del mismo modo.]

MÉTODO POLAROGRÁFICO

Nitrato fenilmercúrico

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 100 mg de nitrato fenilmercúrico, exactamente pesados, a un matraz aforado de 1 litro, disolver en hidróxido de sodio 0,1 M y calentar moderadamente, si fuera

necesario, para disolver. Completar a volumen con hidróxido de sodio 0,1 M y mezclar. Transferir 10 mL de esta solución a un matraz aforado de 25 mL y proceder según se indica en *Preparación muestra*, comenzando donde dice "agregar 2 mL de solución de nitrato de potasio 1 % p/v...".

Preparación muestra - Transferir 10 mL de muestra a un matraz aforado de 25 mL, agregar 2 mL de nitrato de potasio 1 % p/v y 10 mL de solución reguladora alcalina de borato pH 9,2 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*). Ajustar a pH 9,2, si fuera necesario, con ácido nítrico 2 M. Agregar 1,5 mL de una solución de gelatina 0,1 % p/v recientemente preparada, completar a volumen con solución reguladora alcalina de borato pH 9,2 y mezclar.

Procedimiento (ver 700. *Polarografía*) - Transferir una porción de *Preparación muestra* a la celda polarográfica y quitar el aire con la ayuda de nitrógeno durante 15 minutos. Insertar el electrodo capilar de mercurio de un polarógrafo apropiado y registrar el polarograma de -0,6 a -1,5 voltios, empleando un electrodo de calomel saturado, como referencia. Determinar la corriente de difusión de la *Preparación muestra*, $(i_d)_D$ como la diferencia entre la corriente residual y la corriente limitante. En forma similar y en sucesión inmediata determinar la corriente de difusión, $(i_d)_E$ de la *Preparación estándar*. Calcular la cantidad, en μg , de nitrato fenilmercurio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgNO}_3$) en cada mL de muestra en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$2,5C[(i_d)_D / (i_d)_E]$$

en la cual C es la concentración, en μg por mL de nitrato fenilmercurio en la *Preparación estándar* y los otros términos son los definidos anteriormente.

Timerosal

Preparación estándar - En el día del ensayo, transferir aproximadamente 25 mg de timerosal, exactamente pesados, a un matraz aforado de 250 mL, completar a volumen con agua y mezclar. [NOTA: proteger esta solución de la luz.] Transferir 15 mL de esta solución a un matraz aforado de 25 mL, agregar 1,5 mL de solución de gelatina 0,1 % p/v, completar a volumen con nitrato de potasio 1 % p/v y mezclar.

Preparación muestra - Transferir 15 mL de muestra a un matraz aforado de 25 mL, agregar 1,5 mL de solución de gelatina 0,1 % p/v, completar a volumen con nitrato de potasio 1 % p/v y mezclar.

Procedimiento (ver 700. *Polarografía*) - Transferir una porción de *Preparación muestra* a una celda polarográfica y quitar el aire con ayuda de nitrógeno durante 15 minutos. Insertar el electrodo capilar de mercurio de un polarógrafo apropiado y registrar el polarograma de -0,2 a -1,4 voltios, empleando un electrodo de calomel saturado, como referencia. Determinar la corriente de difusión, $(i_d)_D$ como la diferencia entre la corriente residual y la corriente limitante. En forma similar y en sucesión inmediata determinar la corriente de difusión $(i_d)_E$ de la *Preparación estándar*. Calcular la cantidad, en μg , de timerosal ($\text{C}_6\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$) en cada mL de muestra en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$1,667C[(i_d)_D / (i_d)_E]$$

en la cual C es la concentración, en μg por mL, de timerosal en la *Preparación estándar* y los otros términos son los definidos anteriormente.