

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 983**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08836906 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2200582**

54 Título: **Utilización de excipientes como conservantes y composiciones farmacéuticas que los contienen**

30 Prioridad:

12.09.2007 US 960043 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.07.2013

73 Titular/es:

**GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT
(100.0%)
Les Templiers 2400 Route des Colles
06410 Biot, FR**

72 Inventor/es:

MAITRE, LYDIE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 411 983 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de excipientes como conservantes y composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención se refiere a la utilización de una combinación de excipientes en el seno de una composición farmacéutica para su actividad como conservante y a la composición farmacéutica tópica que la contiene. La presente invención se apoya así igualmente en la combinación de excipientes que presenta una buena actividad de conservante.

Una composición farmacéutica o cosmética tópica es a menudo un buen sustrato para la proliferación de los microorganismos.

Existen dos grandes familias de microorganismos, las bacterias y los hongos. Las farmacopeas europea y americana, que el experto en el campo más particular de los productos farmacéuticos debe seguir, han seleccionado en total cinco gémenes representativos de estas familias, tres especies de bacterias y dos clases de hongos.

Las tres especies de bacterias siguientes son representativas de la población microbiana encontrada frecuentemente durante las contaminaciones y son susceptibles de provocar una infección en el hombre. La *Escherichia Coli* es una bacteria gram negativa. Tiene una pared fina permeable a las moléculas pequeñas. Tiene una forma de bastoncillo, llamado bacilo. Esta bacteria está presente esencialmente en las deyecciones fecales. Su presencia puede provocar diversas enfermedades tales como la gastro-enteritis. El *Staphylococcus aureus* es una bacteria gram positiva. Tiene por tanto una pared más gruesa que es impermeable a las moléculas pequeñas. Su forma es esférica, se llama coco, como su nombre indica. El *Staphylococcus aureus* es la especie más patógena del género *Staphylococcus*. Es responsable de intoxicaciones alimentarias, de infecciones localizadas supurativas. La *Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria gram negativa del género *Pseudomonas*. Los bacilos son finos, rectos y muy móviles gracias a un flagelo polar. Es patógena y se encuentra frecuentemente en las infecciones nosocomiales.

Los hongos son eucariotas con un núcleo rodeado de una membrana y conteniendo los cromosomas. Existen dos clases, las levaduras y los mohos. La *Candida Albicans* es la especie de levadura más importante y la más conocida del género *Candida*. Es un organismo vivo en estado natural en la boca y en el tubo digestivo del ser humano. Se encuentra en el 80 % de la población, y habitualmente no supone ninguna enfermedad o síntoma en particular. Es un organismo comensal saprofito que se convierte en patógeno si el organismo portador se debilita. El moho estudiado es el *Aspergillus Niger*. Está muy extendido (frutas y legumbres enmohecidas, forraje, productos lácteos). Se utiliza mucho en la industria agroalimentaria para la producción de diversos ácidos. Esta especie puede ser patógena (aspergilosis del conducto auditivo, producción de ocratoxina).

Las posibles fuentes de contaminaciones microbianas de los productos tópicos son muy numerosas. Los microorganismos provienen principalmente del hombre o del medio ambiente e intervienen en diferentes momentos del proceso, del almacenaje o de la utilización del producto.

El formulador de la composición farmacéutica debe integrar por lo tanto esta problemática muy pronto en el desarrollo de una composición tópica. La ayuda de un agente conservante es a menudo la solución adoptada.

El documento WO2006/075123 describe "pre-formulaciones" bioadhesivas, por ejemplo un anti-inflamatorio, la bencilamina, etanol al 10 %, propilenglicol al 5 %, palmitato de ascorbilo al 0,001 %, dioleato de glicerol y fosfatidilcolina, con el fin de resolver el problema técnico del aumento de la duración de acción de los agentes bioactivos y evitar la pérdida de eficacia por la desaparición de estos de su sitio de acción. En este documento se precisa que en un modo preferido las pre-formulaciones no contienen glicerol, ni etilenglicol o propilenglicol y no contienen más que unas trazas de agua.

Un conservante antimicrobiano es una sustancia o un conjunto de sustancias que se añaden voluntariamente a una fórmula con el fin de evitar la proliferación de los microorganismos. Estos conservantes se deben introducir en pequeña cantidad, deben tener un espectro de acción amplio, estar desprovistos de toxicidad y no deben afectar a la eficacia de los principios activos utilizados.

Un agente conservante no tiene siempre un espectro de actividad bastante grande para inhibir el conjunto de los gémenes enunciados anteriormente. Por eso, su asociación según su actividad es una vía utilizada frecuentemente. Combinándolos correctamente, el sistema conservante obtenido actúa sobre la totalidad de los microorganismos.

Existe una gran variedad de agentes conservantes antimicrobianos utilizables en los productos tópicos. Sin embargo, aunque esta lista es amplia para los productos de uso cosmético, es restringida para los productos farmacéuticos. En efecto, solamente una decena de conservantes se utiliza usualmente en este medio.

Esta diferencia viene del hecho de que durante el estudio clínico, se impone a los productos farmacéuticos, una tolerancia o inocuidad perfecta sobre los seres humanos.

5 Los conservantes usualmente utilizados en el campo farmacéutico son, por ejemplo, los generadores de formaldehído, tal como la imidazolidinilurea, o la diazolidinilurea, los derivados tiazínicos tal como el Kathon CG, los derivados clorados, tal como la clorhexidina, los derivados fenólicos, tales como los parabenos, los derivados alcohólicos, tal como el bronopol, el fenoxietanol, el bronopol, el cloroxilenol, los derivados ácidos, tal como el ácido sórbico, el ácido benzoico o el cloruro de benzalconio.

Los conservantes preferidos y más clásicamente utilizados en las composiciones farmacéuticas son los parabenos, especialmente metilparabeno, propilparabeno, etilparabeno, butilparabeno y el fenoxietanol solos o en mezclas.

10 Los agentes conservantes más frecuentes son los parabenos, idealmente asociados con el fenoxietanol.

Sin embargo, el fenoxietanol puede llegar a ser una sustancia tóxica para el usuario a dosis altas. Para las personas sanas, las concentraciones necesarias para llegar a la toxicidad son elevadas. No obstante el fenoxietanol es un alérgeno reconocido. Su utilización puede provocar placas de eczemas en algunas personas.

Por otro lado, los parabenos también presentan toxicidad a dosis altas.

15 De forma general, los expertos en la técnica saben que los conservantes normalmente utilizados en las fórmulas tópicas pueden ser potencialmente sensibilizantes, irritantes y/o alérgizantes. Por todas estas razones, es importante limitar su utilización o incluso eliminarlos completamente de las fórmulas. Ahora bien, si no se añade un sistema conservante, la protección antimicrobiana no será efectiva. Por eso, es importante determinar otro método que pueda asegurar esta función.

20 Ciertos factores, tales como la temperatura del medio, el pH, el contenido en agua influyen en la colonización por los micro-organismos y los expertos en la técnica han estudiado la posibilidad de modificar estos factores. La temperatura del medio no tiene realmente ningún efecto bactericida ni fungicida. Las bacterias se desarrollan alrededor de los 32,5 °C y los hongos alrededor de los 22,5 °C. Si una fórmula se conserva por encima o por debajo de estas temperaturas por ejemplo en refrigerador a + 4 °C, los gérmenes se inactivan y no se desarrollan. Si la temperatura vuelve a ser favorable, los microorganismos podrán crecer de nuevo. El mantenimiento a una temperatura alta (>+75 °C) o baja (<+4 °C) presenta numerosas dificultades tanto durante la producción como durante la utilización.

25 Si el pH de la composición es muy ácido o muy básico, el desarrollo de los gérmenes será limitado. Sin embargo, los mohos son tolerantes a un intervalo de pH muy grande, así que su desarrollo será posible a pesar de todo. La utilización de una composición tópica a pH alto o bajo tiene igualmente sus límites. En efecto, la aplicación de una solución o crema muy ácida o básica sobre la piel puede tener efectos irritantes.

30 El contenido en agua es igualmente un punto muy importante. En efecto, la presencia de agua es indispensable para la proliferación de los gérmenes. Así, si el medio es completamente anhidro, su proliferación será inhibida. Sin embargo, los expertos en la técnica en el campo farmacéutico y cosmético no pueden considerar únicamente las composiciones anhidras que muy a menudo son menos agradables que las composiciones de tipo emulsión o gel. Por otra parte, numerosos principios activos farmacéuticos son solubles en agua y necesitan por tanto la presencia de ésta en el seno de las composiciones. Sin tener que eliminar el agua, los expertos en la técnica deben tener en cuenta la actividad del agua en el seno de la composición. La actividad del agua no es exactamente la cantidad de agua, sino la cantidad de agua libre en un medio. El agua libre es el agua que no sirve para solvatar las moléculas introducidas en el medio acuoso.

35 Este agua libre es por tanto completamente accesible para los gérmenes para asegurar su proliferación. La actividad del agua (aw) es un valor intrínseco del medio estudiado, no depende de ningún parámetro exterior. La actividad del agua varía de 1,00 para el agua pura a 0,00 para un medio completamente anhidro.

40 Las necesidades de agua de cada uno de los gérmenes son diferentes. Las bacterias por ejemplo son más sensibles a su presencia que los mohos.

La tabla 1 que sigue representa la actividad del agua necesaria para que se puedan desarrollar diferentes gérmenes.

Tabla 1: Valores de la actividad del agua necesaria para el crecimiento de gérmenes

| Microorganismo | Actividad del agua |
|-------------------------------|--------------------|
| Media de las bacterias | 0,91 |
| <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> | 0,97 |
| <i>Escherichia Coli</i> | 0,95 |

| Microorganismo | Actividad del agua |
|------------------------------|--------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,86 |
| Media de las levaduras | 0,86 |
| <i>Candida Albicans</i> | 0,88 |
| Media de los mohos | 0,80 |
| <i>Aspergillus Niger</i> | 0,77 |

Así, si la actividad del agua es inferior a 0,77, los gérmenes enunciados en esta tabla, no tendrán la facultad de desarrollarse.

Es por tanto muy importante conocer los medios que inducen una reducción de la actividad del agua.

5 El primero y más evidente es reducir la cantidad introducida de agua en el interior de las fórmulas. El segundo consiste en determinar las moléculas que tendrían un poder solvatante importante. Así, el agua sería más movilizadora para solvatar esas moléculas y estaría menos disponible para los gérmenes. Los humectantes, las sales minerales, los hidrocoloides pueden desempeñar este papel.

10 La utilización de la medida de la actividad del agua de las formulaciones ha sido objeto muy recientemente de un capítulo de los métodos generales de la farmacopea americana ("Application of water activity determination to nonsterile pharmaceutical products <1112> USPC Official 5/1/07-7/31/07, 2007").

15 La bibliografía describe composiciones auto-protegidas y proporciona listas de los excipientes conocidos por presentar una actividad de conservante. Así, Jon J.Kabara (y D.S. Orth en "Preservative-free and self-preserving Cosmetics and Drugs - Principles and Practice", edition Dekker, New York, 1996) lista diferentes categorías de excipientes susceptibles de tener una actividad de tipo conservante en el seno de la composición, tales como, el alcohol, los tensioactivos, los ésteres o ácidos grasos, los fosfolípidos, antioxidantes, agentes quelantes. Sin embargo, buen número de estos ingredientes solos o en mezcla no satisfacen los criterios exigidos por las farmacopeas, o los satisfacen a concentraciones que no son aceptables en el seno de una composición farmacéutica. No pueden ser utilizados por tanto fácilmente por los expertos en la técnica enfrentados a las exigencias reglamentarias, en el seno de las composiciones farmacéuticas.

20 Los tensioactivos más activos son los catiónicos. Sin embargo, estos últimos son esencialmente utilizables en el seno de las composiciones bajo la forma de champús, forma farmacéutica que no es importante en la actividad. En efecto, los expertos en la técnica formulan más particularmente emulsiones o geles.

25 Por otro lado, J.J. Kabara ha descrito que la proliferación de los micro-organismos se puede impedir con etanol, pero a partir del 25 % (v/v). Sin embargo, por una parte estos porcentajes son extremadamente elevados para una buena tolerancia de una composición farmacéutica tópica, y por otra parte, nada confirma en la bibliografía que las reducciones efectivamente observadas de cada micro-organismo sean tales que deban estar de acuerdo con las farmacopeas.

30 El problema que se propone resolver aquí la presente invención, es por tanto encontrar una alternativa a los conservantes clásicos con el fin de proteger eficazmente una composición tópica, farmacéutica, contra los microorganismos citados anteriormente.

35 Por conservantes conocidos, se entiende, por ejemplo, los generadores de formaldehído, tal como la imidazolidinilurea, o la diazolidinilurea, los derivados tiazínicos tal como Kathon CG, los derivados clorados, tal como la clorhexidina, los derivados fenólicos, tal como los parabenos, los derivados alcohólicos, tal como el bronopol, el fenoxietanol, el bronopol, el cloroxilenol, los derivados ácidos, tal como el ácido sórbico, el ácido benzoico o el cloruro de benzalconio.

Los conservantes más clásicamente utilizados en las composiciones, especialmente para el solicitante son los parabenos, especialmente metilparabeno, propilparabeno, etilparabeno, butilparabeno y el fenoxietanol solos o en mezclas.

40 El problema que se propone resolver la invención es por tanto limitar, o incluso suprimir los conservantes en una composición tópica farmacéutica.

45 Un problema particular que debe resolver la invención es el de proteger eficazmente una composición tópica farmacéutica que responda a la vez a los criterios exigidos por las farmacopeas europeas y americanas. En efecto, ya que la composición farmacéutica tiene por finalidad convertirse en un producto farmacéutico con una autorización de comercialización, es imperativo que la composición según la invención satisfaga estos criterios. Con el fin de verificar este punto y determinar la acción antimicrobiana de las diferentes mezclas de excipientes según la invención, existe un protocolo de ensayo denominado ensayo de eficacia de los conservantes (PET). El ensayo de

- eficacia de los conservantes consiste en inocular artificialmente a las composiciones un número conocido de gérmenes, y determinar después la reducción de estos últimos en las composiciones ensayadas a los tiempos dados. El protocolo de este ensayo se prepara con el fin de respetar las recomendaciones de las farmacopeas europea y americana. El ensayo así como las recomendaciones de las farmacopeas europea y americana se describen en el ejemplo 1 de la presente solicitud. La mezcla de excipientes como conservantes descrita en la presente invención debe cumplir por lo tanto los criterios de estas farmacopeas en el ensayo de eficacia de los conservantes.
- 5 La presente invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica tópica que contiene como conservante una mezcla de excipientes, caracterizada porque la composición no contiene ningún otro conservante clásico.
- 10 Por composición farmacéutica tópica, se entiende toda composición que los expertos en la técnica puedan considerar y especialmente pero no exclusivamente, las composiciones en forma líquida, o pastosa, y más particularmente en forma de emulsiones, cremas, leches, pomadas, tampones empapados, jabones sin jabón, toallitas, geles, pulverizaciones, espumas, lociones, bastoncillos, champús, o bases lavantes.
- 15 De forma preferible, puesto que la protección de las composiciones que contienen agua es la más compleja, la presente invención se refiere a una composición que contiene al menos una fase acuosa que contiene agua, esto es preferiblemente, una emulsión o una loción.
- La composición farmacéutica que comprende la mezcla de excipientes conservantes según la invención se destina al tratamiento de la piel y se administra por tanto por vía tópica. Por vía tópica, se entiende una aplicación sobre la piel o las mucosas.
- 20 Por mezcla de excipientes conservantes, se entiende una mezcla de ingredientes clásicamente utilizada como base de formulación, en el seno de la cual se introducen el ingrediente o ingredientes activos. Se puede listar a título indicativo de excipientes, los disolventes, especialmente de tipo etanólico tal como el etanol, los tensioactivos, los humectantes, los glicoles.
- 25 Como se ha indicado anteriormente, los expertos en la técnica saben que el etanol presenta una acción antimicrobiana y antifúngica importante a partir del 25 % en el seno de la composición. Pero esta concentración es difícilmente compatible con una buena tolerancia para una aplicación tópica sobre la piel de un paciente.
- El solicitante ha descubierto de manera sorprendente que asociando el etanol con otros excipientes, era posible obtener una buena protección anti-microbiana a la vez que se reduce la concentración de etanol en el seno de la composición.
- 30 Los excipientes preferidos según la invención para asociar con el etanol son especialmente los humectantes, los anti-oxidantes, los tensioactivos, los quelantes, y/o los espesantes.
- Como humectantes se entienden los humectantes utilizados frecuentemente por vía tópica. Su acción permite mantener la tasa de humedad en el estrato córneo. Los humectantes utilizables según la invención son especialmente pero no exclusivamente el glicerol y derivados, los glicoles, tal como propilenglicol, polietilenglicol.
- 35 Los humectantes preferidos según la invención son el propilenglicol, la glicerina o glicerol, o el polietilenglicol
- Como anti-oxidantes, se entienden según la invención los anti-oxidantes de tipo natural, tales como los ascórbicos, los cítricos, los tártricos, los lactatos, los tocoferoles, o los anti-oxidantes sintéticos, tal como el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), la butilhidroquinona terciaria (TBHQ), o el propilgalato.
- 40 Como tensioactivos utilizables según la invención, se pueden citar, los tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros o no iónicos. Se prefieren los tensioactivos catiónicos y especialmente los amonios cuaternarios y las aminimidadas.
- Como agentes quelantes utilizables según la invención, se pueden citar los quelantes débiles o lábiles y los quelantes fuertes tal como el EDTA.
- 45 Como agentes espesantes utilizables según la invención, se entienden especialmente los derivados de ácido acrílico, tales como los Carbopol (tal como Ultrez 10 NF), los derivados celulósicos, tal como Natrosol, y la goma xantán.
- Según la invención, la mezcla de excipientes que presenta una buena actividad antimicrobiana comprende en el seno de la composición farmacéutica, al menos:
- etanol,
 - al menos un humectante, un anti-oxidante, un tensioactivo, un quelante, y/o un espesante.

La invención se refiere más particularmente a una composición farmacéutica tópica que comprende una mezcla de excipientes que contiene al menos etanol y humectantes.

Los humectantes preferidos según la invención son a título indicativo, propilenglicol, glicerina o polietilenglicol, especialmente el PEG 400 utilizados solos o en mezcla.

5 Según la invención, la mezcla de excipientes que presenta una buena actividad antimicrobiana comprende en el seno de la composición farmacéutica, al menos:

- etanol,

- al menos un humectante, elegido entre propilenglicol, glicerina o glicerol, polietilenglicol, solo o en mezcla.

10 Preferiblemente, la mezcla de excipientes que presenta una buena actividad antimicrobiana comprende en el seno de la composición farmacéutica, al menos:

- entre 5 y 25 % de etanol,

- entre 1 y 50 % de un humectante, elegido entre propilenglicol, glicerina o glicerol, polietilenglicol, solo o en mezcla.

De manera más preferible, la composición comprende igualmente en el seno de la mezcla de excipientes conservantes, un antioxidante.

15 Preferiblemente el antioxidante es el palmitato de ascorbilo a una concentración de al menos 0,5 %, con preferencia a una concentración de 1 % en peso con respecto al peso total de la composición.

Según otro modo según la invención, la composición comprende igualmente en el seno de la mezcla de excipientes conservantes, un espesante.

20 Preferiblemente el espesante es un derivado celulósico, tal como el Natrosol, presente a una concentración de al menos 0,5 %, con preferencia a una concentración de 1,5 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La presente invención se refiere igualmente a la composición farmacéutica que comprende la mezcla de excipientes según la invención.

La presente invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica tópica caracterizada porque comprende una mezcla de excipientes que presenta una actividad anti-microbiana, comprendiendo dicha mezcla de excipientes:

25 - etanol y al menos un excipiente elegido entre los humectantes, anti-oxidantes, tensioactivos, quelantes, y espesantes.

- una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %,

En un modo preferido según la invención, la composición comprende por tanto una mezcla de excipientes como conservante, que comprende:

30 • un antioxidante,

• un humectante,

• una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %.

En otro modo la composición según la invención puede tener en cuenta también la actividad del agua en el seno de la composición.

35 En un modo preferido según la invención, la composición comprende por tanto una mezcla de excipientes como conservante, que comprende:

• palmitato de ascorbilo al 1 % en masa

• propilenglicol al 5 % en masa

• un porcentaje de agua inferior al 50 % en masa

40 • una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %.

La presente invención tiene asimismo por objeto una composición farmacéutica tópica caracterizada porque comprende una mezcla de excipientes que presenta una actividad anti-microbiana, comprendiendo dicha mezcla de excipientes:

5 - etanol y palmitato de ascorbilo a una concentración de 1 % en masa; propilenglicol al 5 % en masa; un porcentaje de agua inferior al 50 % en masa;

- una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %, y

10 conteniendo dicha composición de 0 a 1,8 % en masa de conservantes elegidos entre los generadores de formaldehído, tal como la imidazolidinilurea, o la diazolidinilurea, los derivados tiazínicos tal como Kathon CG, los derivados clorados, tal como la clorhexidina, los derivados fenólicos, tal como los parabenos, los derivados alcohólicos, tal como el bronopol, el fenoxietanol, el bronopol, el cloroxilenol, los derivados ácidos, tal como el ácido sórbico, el ácido benzoico y/o el cloruro de benzalconio.

Dicha composición está con preferencia bajo la forma de emulsión.

Dicha mezcla de excipientes de la composición tal como se ha definido antes es una mezcla de etanol, humectantes, anti-oxidantes, tensioactivos, quelantes, y/o espesantes.

15 Dicha mezcla de excipientes comprende con preferencia;

- entre 5 y 25 % de etanol,

- entre 1 y 50 % de humectantes elegidos entre propilenglicol, glicerina o glicerol, y/o polietilenglicol.

Con preferencia el humectante es el propilenglicol.

Dicha mezcla de excipientes comprende igualmente un antioxidante, que es con preferencia palmitato de ascorbilo.

20 Dicha mezcla de excipientes puede comprender además un espesante presente a una concentración de al menos 0,5 % en masa. Dicho espesante es con preferencia un derivado celulósico tal como el Natrosol.

Dicha composición tal como se ha definido antes comprende una relación etanol/fase acuosa que está comprendida de 10 a 15 %.

Dicha mezcla de excipientes comprende más particularmente;

25 - palmitato de ascorbilo a una concentración entre 0,5 % y 1 % en masa

- propilenglicol al 5 % en masa

- un porcentaje de agua inferior a 50 % en masa

- una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %.

30 Más particularmente dicha composición tal como se ha definido antes contiene menos de 0,8 % de parabenos, y con preferencia menos de 0,4 % de propilparabeno.

La composición farmacéutica según la invención es utilizable como medicamento.

En particular, la invención tiene igualmente por objeto la utilización de la composición según la invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar las afecciones dermatológicas, especialmente humanas.

35 Se van a dar ahora, como ilustración y sin ningún carácter limitativo, diversas formulaciones de composiciones según la invención.

Ejemplo 1: Ensayo de eficacia de conservantes (PET) y exigencias de las farmacopeas europeas y americanas.

Este ensayo consiste en contaminar artificialmente alícuotas de la formulación por medio de un inóculo calibrado de microorganismos específicos y en su incubación a temperaturas precisas. La toma de muestras a partir de las alícuotas contaminadas se efectúa a intervalos de tiempo dados con el fin de contar los micro-organismos.

40 La farmacopea europea describe las exigencias que se deben respetar para este ensayo. Exige comprobar los gérmenes siguientes:

Bacterias

Pseudomonas aeruginosa, Referencia ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118.

Staphylococcus aureus, Referencia ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 4.83.

Hongos

Candida albicans, Referencia ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72.

- 5 *Aspergillus Niger*, Referencia ATCC 16404; IMI 149007; IP 1431.83.

La farmacopea exige igualmente estudiar las reducciones de población de los microorganismos introducidos en la formulación según dos criterios de aceptabilidad.

Siendo los criterios A los más estrictos, generalmente se pide que se les satisfaga.

- 10 En casos justificados, cuando no se pueden respetar los criterios A, por ejemplo en razón de un aumento del riesgo de reacciones indeseables, se aplican los criterios B, menos drásticos.

Tabla 2: Criterios de la farmacopea europea

| | | Reducción logarítmica a los tiempos indicados | | | |
|-----------|-----------|---|---------|----------|----------|
| | Criterios | T48 h | T7 días | T14 días | T28 días |
| Bacterias | A | 2 | 3 | --- | NI |
| | B | --- | --- | 3 | NI |
| Hongos | A | --- | --- | 2 | NI |
| | B | --- | --- | 1 | NI |

NI (ningún aumento) significa que no debe haber aumento del número de gérmenes.

La farmacopea americana describe también las exigencias que deben ser respetadas con el fin de que la formulación sea protegida. Impone igualmente comprobar los gérmenes siguientes:

- 15 Bacterias

Escherichia Coli, Referencia ATCC 8739

Pseudomonas aeruginosa, Referencia ATCC 9027.

Staphylococcus aureus, Referencia ATCC 6538.

Hongos

- 20 *Candida albicans*, Referencia ATCC 10231.

Aspergillus Niger, Referencia ATCC 16404.

Esta farmacopea impone reducciones logarítmicas de la población de microorganismos que son diferentes de las de la farmacopea europea.

En el caso de los productos tópicos, las condiciones son:

- 25 Tabla 3: Criterios de la farmacopea americana

| | | Reducción logarítmica a los tiempos indicados | | | |
|-----------|--|---|---------|----------|----------|
| | | T48 h | T7 días | T14 días | T28 días |
| Bacterias | | --- | --- | 2 | NI |
| Hongos | | --- | --- | NI | NI |

Ejemplo 2: Estudio de la acción antimicrobiana del etanol solo.

Este estudio está ligado a las formas "lociones" muy corrientes en dermatología. El etanol es un excipiente frecuentemente utilizado para este tipo de fórmula.

- 30 El fin de este estudio es determinar la proporción límite de etanol que asegura la conservación antimicrobiana sin adición de conservantes. Se ha evaluado igualmente el efecto de excipientes complementarios con el fin de reducir la concentración inhibidora de etanol.

Búsqueda de la relación etanol/agua que satisfaga los criterios de las diferentes farmacopeas en vigor.

J.J. Kabara en 1997 ha descrito que la proliferación de los micro-organismos se puede impedir a partir del 25 % (v/v) de etanol.

- 5 Sin embargo, no describe en este extracto, las reducciones observadas de cada microorganismo estudiado durante el ensayo de eficacia de los conservantes. No es posible por tanto afirmar que los criterios de las farmacopeas europea y americana se satisfacen a esta concentración.

Por lo tanto se han estudiado en este sentido mezclas simples de etanol/agua.

Las concentraciones de etanol han variado de 5 % a 30 % en intervalos de 5 %.

Resultados de los análisis

- 10 Tabla 4: Concentración de etanol 5 %

| | Reducción observada en log | Criterios a respetar | Satisface, No satisface | Conclusión general |
|----------|--|--|--|--|
| T2 días | <i>Sta</i> : 0,2 <i>Pseu</i> : 0,4 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para las bacterias | <i>Sta</i> : No satisface <i>Pseu</i> : No satisface | No satisface los criterios A de la farmacopea europea. |
| T14 días | <i>Coli</i> : 0,2 <i>Sta</i> : 5,8 <i>Pseu</i> : 0,9 | Eur. Criterio B 3 log de reducción para las bacterias | <i>Sta</i> : Satisface <i>Pseu</i> : No satisface | No satisface los criterios B de la farmacopea europea. |
| | | USP. 2 log de reducción para las bacterias | <i>Coli</i> : No satisface <i>Sta</i> : Satisface <i>Pseu</i> : No satisface | No satisface los criterios de la USP. |

Tabla 5: Concentración de etanol 10 %

| | Reducción observada en log | Criterios a respetar | Satisface, No satisface | Conclusión general |
|----------|--|--|---|--|
| T2 días | <i>Sta</i> : 1 <i>Pseu</i> : 1,6 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para las bacterias | <i>Sta</i> : No satisface <i>Pseu</i> : No satisface | No satisface los criterios A de la farmacopea europea. |
| T14 días | <i>Coli</i> : 0,9 <i>Sta</i> : 5,8 <i>Pseu</i> : 6 <i>Asp</i> : 0,2 | Eur. Criterio B 3 log de reducción para las bacterias 1 log de reducción para los hongos | <i>Sta</i> : Satisface <i>Pseu</i> : Satisface <i>Asp</i> : No satisface | No satisface los criterios B de la farmacopea europea. |
| | | USP. 2 log de reducción para las bacterias Ningún crecimiento para los hongos | <i>Coli</i> : No satisface <i>Sta</i> : Satisface <i>Pseu</i> : Satisface <i>Asp</i> : Satisface | No satisface los criterios de la USP. |

Tabla 6: Concentración de etanol 15 %

| | Reducción observada en log | Criterios a respetar | Satisface, No satisface | Conclusión general |
|----------|--|--|---|--|
| T2 días | <i>Sta</i> : 4 <i>Pseu</i> : 4 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para las bacterias | <i>Sta</i> : Satisface <i>Pseu</i> : Satisface | No satisface los criterios A de la farmacopea europea. |
| T14 días | <i>Coli</i> : 6 <i>Sta</i> : 6 <i>Pseu</i> : 6 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para los hongos | <i>Can</i> : Satisface <i>Asp</i> : No satisface | |

| | Reducción observada en log | Criterios a respetar | Satisface, No satisface | Conclusión general |
|--|------------------------------------|--|--|--|
| | <i>Can:</i> 3,9 <i>Asp:</i> 0,6 | Eur. Criterio B 3 log de reducción para las bacterias 1 log de reducción para los hongos | <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface <i>Can:</i> Satisface <i>Asp:</i> No satisface | No satisface los criterios B de la farmacopea europea. |
| | | USP. 2 log de reducción para las bacterias Ningún crecimiento para los hongos | <i>Coli:</i> Satisface <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface <i>Asp:</i> Satisface | Satisface los criterios de la USP. |

Tabla 7: Concentración de etanol 20 %

| | Reducción observada en log | Criterios a respetar | Satisface, No satisface | Conclusión general |
|----------|---|--|--|--|
| T2 días | <i>Sta:</i> 4 <i>Pseu:</i> 4 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para las bacterias | <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface | No satisface los criterios A de la farmacopea europea. |
| T14 días | <i>Coli:</i> 6 <i>Sta:</i> 6 <i>Pseu:</i> 6 <i>Can:</i> 3,9 <i>Asp:</i> 1,6 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para los hongos | <i>Can:</i> Satisface <i>Asp:</i> No satisface | |
| | | Eur. Criterio B 3 log de reducción para las bacterias 1 log de reducción para los hongos | <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface <i>Can:</i> Satisface <i>Asp:</i> Satisface | Satisface los criterios B de la farmacopea europea. |
| | | USP. 2 log de reducción para las bacterias Ningún crecimiento para los hongos | <i>Coli:</i> Satisface <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface <i>Asp:</i> Satisface | Satisface los criterios de la USP. |

Tabla 8: Concentración de etanol 25 %

| | Reducción observada en log | Criterios a respetar | Satisface, No satisface | Conclusión general |
|----------|---|--|--|---|
| T2 días | <i>Sta:</i> 4 <i>Pseu:</i> 4 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para las bacterias | <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface | Satisface los criterios A de la farmacopea europea. |
| T14 días | <i>Coli:</i> 6 <i>Sta:</i> 6 <i>Pseu:</i> 6 <i>Can:</i> 3,9 <i>Asp:</i> 3,8 | Eur. Criterio A 2 log de reducción para los hongos | <i>Can:</i> Satisface <i>Asp:</i> Satisface | |
| | | Eur. Criterio B 3 log de reducción para las bacterias 1 log de reducción para los hongos | <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface <i>Can:</i> Satisface <i>Asp:</i> Satisface | Satisface los criterios B de la farmacopea europea. |
| | | USP. 2 log de reducción para las bacterias Ningún crecimiento para los hongos | <i>Coli:</i> Satisface <i>Sta:</i> Satisface <i>Pseu:</i> Satisface <i>Asp:</i> Satisface | Satisface los criterios de la USP. |

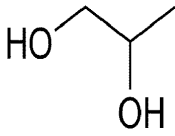
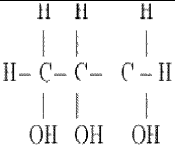
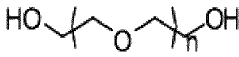
Estos resultados muestran que a partir de una concentración de etanol del 15 % en la mezcla acuosa, su acción bactericida satisface los criterios A de la farmacopea europea y los criterios de la USP. Sin embargo, esta concentración es insuficiente para inhibir completamente los hongos. Al aumentar la concentración de etanol a 25 %, la acción fungicida es satisfactoria para el conjunto de las farmacopeas. Pero la concentración a la que presenta una actividad fungicida es difícilmente compatible con una buena tolerancia para una aplicación tópica sobre la piel de un paciente.

Ejemplo 2: Estudio de la acción antimicrobiana del etanol acoplado a humectantes.

El solicitante ha ensayado la mezcla de etanol con humectantes con el fin de reducir la concentración de etanol en el seno de la composición y de evaluar la protección anti-microbiana resultante.

- 5 Tres excipientes utilizados como humectantes se utilizan frecuentemente por vía tópica. Su acción permite mantener la tasa de humedad en el estrato córneo. El propilenglicol (PG), el glicerol y el PEG 400 son compuestos de este tipo. Se ha estudiado el impacto de estos excipientes sobre las concentraciones de etanol descritas anteriormente.

Fórmulas desarrolladas de los humectantes utilizados

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| Propilenglicol | Glicerol | Polietilenglicol |

Se ha estudiado un número limitado de combinaciones entre los humectantes y el etanol.

- 10 Se ha buscado, a una concentración dada de humectante, la concentración más baja de etanol que satisfaga los diferentes criterios.

Cada uno de los tres humectantes ha sido incorporado a diferentes concentraciones que varían de 0 % a 30 % en intervalos de 5 % a las soluciones de etanol, que varían en las mismas proporciones. Así se han ensayado 49 soluciones por cada humectante.

Conclusión sobre las acciones antimicrobianas de las mezclas de humectante/etanol

- 15 Propilenglicol:

Un 10 % de PG permite reducir la concentración de etanol de 25 % a 15 % para satisfacer los criterios A de la farmacopea europea.

Un 30 % másico en una solución acuosa permite satisfacer los criterios de la USP sin añadir etanol.

- 20 Además a esta concentración, se inhiben las bacterias con lo que se satisfacen los criterios A de la farmacopea europea.

El PG tiene por tanto una acción sobre el conjunto de las bacterias (todas, gram+ y gram-).

Sin embargo esta acción es limitada para los hongos. En efecto, el PG solo, no asegura la disminución de estos gérmenes, en particular del *Aspergillus Niger*. Es necesario por tanto utilizar etanol para evitar la proliferación de estos últimos

- 25 Glicerina:

Un 5 % en masa de glicerina permite reducir la concentración de etanol de 25 % a 15 % para satisfacer los criterios A de la farmacopea europea.

La zona de aceptabilidad global de los criterios de la farmacopea europea es similar a la obtenida con el PG.

- 30 Un 10 % en masa de glicerina permite reducir la concentración de etanol de 15 % a 5 % para satisfacer los criterios de la USP.

Sin embargo, la acción bactericida de la glicerina es menos importante que la del PG. En efecto, una solución acuosa al 30 % másico de glicerina permite satisfacer únicamente los criterios B de la farmacopea europea para las bacterias, pero no satisface los criterios de la USP. La eliminación de los hongos, en particular del *Aspergillus Niger*, es siempre un punto bloqueante que necesita el aporte importante de etanol.

- 35 Polietilenglicol 400:

Un 20 % másico de PEG 400 permite reducir la concentración de etanol de 25 % a 10 % para satisfacer los criterios A de la farmacopea europea.

Un 20 % másico de PEG 400 permite reducir la concentración de etanol de 15 % a 5 % para satisfacer los criterios de la USP.

La acción bactericida es menos importante que la del PG, pero superior a la del glicerol.

5 Los humectantes ensayados han permitido reducir la concentración de etanol introducido en el seno de la solución acuosa.

Según las farmacopeas, las siguientes soluciones de tipo "loción" son las que permiten asegurar la protección antimicrobiana sin adición de conservantes. (Tabla nº 9)

Tabla 9: soluciones que aseguran la protección antimicrobiana.

| | Farmacopea europea | Farmacopea USP |
|------------------------|--|--|
| Propilenglicol (PG) | a partir de 15 % de EtOH a partir de 5 % de PG | a partir de 30 % de PG a partir de 0 % de EtOH |
| Glicerina | a partir de 15 % de EtOH a partir de 5 % de Glicerina | a partir de 5 % de EtOH a partir de 10 % de Glicerina |
| Polietilenglicol (PEG) | a partir de 10 % de EtOH a partir de 20 % de PEG | a partir de 5 % de EtOH a partir de 20 % de PEG |

10 Los humectantes estudiados favorecen la acción antimicrobiana del etanol a la vez que permiten disminuir su concentración en la composición. Sin embargo, sus acciones no son similares. Es posible determinar un orden según su acción bactericida.

PG > PEG 400 > glicerina

En consecuencia, será por tanto más interesante seleccionar el PG o el PEG como humectante por sus propiedades sobre las bacterias.

15 Ejemplo 2: Estudio de la actividad del agua de las composiciones

La acción inhibidora demostrada con la adición de etanol y de los tres humectantes se puede interpretar como bactericida y fungicida directa.

Sin embargo, estos excipientes tienen igualmente la facultad de modificar la cantidad de agua libre disponible en la formulación. Su acción puede estar ligada por tanto a la actividad del agua.

20 Además, la viscosidad de las lociones para uso tópico se puede aumentar potencialmente por la adición de un espesante (a menudo hidrocoloideos). Estos últimos tienen por definición la particularidad de atrapar las moléculas de agua libre presentes en una formulación. Tienen por tanto la propiedad de reducir la actividad del agua, lo que influye en la proliferación microbiana.

25 El estudio consiste en medir la influencia de las diferentes composiciones, lociones y geles y en relacionar la actividad del agua con los criterios de aceptación de las diferentes farmacopeas.

Actividad del agua de las mezclas glico-etánolicas

Véase el método de análisis en el anexo

Los humectantes estudiados antes han sido analizados igualmente a través de la actividad del agua.

Efecto del propilenglicol (PG)

30 Figura nº 1: Reducción de la actividad del agua en función de la concentración del PG

Efecto del glicerol

Figura nº 2: Reducción de la actividad del agua en función de la concentración del glicerol

Efecto del PEG 400

Figura nº 3: reducción de la actividad del agua en función de la concentración del PEG

35 A igual concentración, el propilenglicol reduce la actividad del agua de manera más importante que el PEG 400, la glicerina y que el etanol.

Ejemplo A: mezclas de 10 % de humectante / 10 % de etanol

Actividad del agua, PG = 0,9036

Actividad del agua, Glicerina: 0,9242

Actividad del agua, PEG 400: 0,9380

5 PG > Glicerina > PEG

Ejemplo B:

Actividad del agua, 30 % de PG = 0,8906

Actividad del agua, 30 % de etanol = 0,9040

Actividad del agua, 30 % de glicerina = 0,9070

10 PG > etanol > glicerina

Es por tanto más interesante seleccionar el PG por su mejor acción sobre la actividad del agua.

Ejemplo 4: Relación entre la actividad del agua de las fórmulas y la satisfacción de los criterios de farmacopea

Tabla nº10: Relación entre los valores de la actividad del agua (Aw) y la acción del ensayo de eficacia de los conservantes (PET)

| Composición | | Aw | PET | Valor límite de Aw para asegurar el crecimiento |
|----------------|-----------|--------|------------------|---|
| | | | | <i>aw = 0,97 Pseu</i> |
| | 5 % EtOH | 0,9564 | ni A ni B ni USP | <i>aw = 0,95 Coli</i> |
| 20 % PEG 400 | 5 % EtOH | 0,9442 | USP | |
| | 10 % EtOH | 0,9422 | Ni A ni B ni USP | |
| 10 % glicerina | 5 % EtOH | 0,9400 | USP | |
| | 15 % EtOH | 0,9382 | USP | |
| 5 % glicerina | 10 % EtOH | 0,9382 | USP | |
| 10 % PEG 400 | 10 % EtOH | 0,9380 | USP | |
| 15 % glicerina | 5 % EtOH | 0,9290 | USP | |
| | 20 % EtOH | 0,9280 | USP, EP B | |
| 20 % PEG 400 | 10 % EtOH | 0,9258 | USP, EP A | |
| 10 % glicerina | 10 % EtOH | 0,9242 | USP | |
| 10 % PEG 400 | 15 % EtOH | 0,9218 | USP, EP A | |
| 5 % glicerina | 15 % EtOH | 0,9210 | USP, EP A | |
| | 25 % EtOH | 0,9140 | USP, EP A | |
| 20 % PEG 400 | 15 % EtOH | 0,9082 | USP, EP A | |
| 30 % glicerina | 0 % EtOH | 0,9070 | Ni A ni B ni USP | |
| | 30 % EtOH | 0,9040 | USP, EP A | |

| Composición | | Aw | PET | Valor límite de Aw para asegurar el crecimiento |
|-------------|-----------|--------|-----------|---|
| 10 % PG | 10 % EtOH | 0,9036 | USP | aw = 0,88 Can |
| 15 % PG | 5 % EtOH | 0,9026 | USP | |
| 5 % PG | 15 % EtOH | 0,8954 | USP, EP A | |
| 30 % PG | 0 % EtOH | 0,8906 | USP | |
| 15 % PG | 10 % EtOH | 0,8876 | USP | |
| 10 % PG | 15 % EtOH | 0,8868 | USP, EP A | |

Figura nº 4: Búsqueda de la correlación entre Aw y el PET

Se puede observar que los resultados obtenidos por los ensayos de eficacia de los conservantes (PET) no están en relación directa con la actividad del agua de las fórmulas.

- 5 En efecto, la aceptación de los criterios A de la farmacopea europea que son los más exigentes, no se satisface únicamente por las fórmulas que tienen una baja actividad del agua.

Además, las actividades del agua obtenidas nunca son más bajas que 0,8876. Este contenido permite únicamente la inhibición de *Pseu* y de *Coli*. Ahora bien ciertas fórmulas aseguran la inhibición del conjunto de los gérmenes satisfaciendo así los criterios A de la farmacopea europea (EP) o los criterios de la USP.

- 10 No es por tanto el contenido en agua libre presente en las fórmulas el que asegura la conservación sino más bien la acción antimicrobiana de los acoplamientos de humectante / etanol.

Ejemplo 3: Estudio del efecto de los espesantes en las mezclas etanólicas

Los espesantes clásicos del formulador son:

Carbopol (Ultrez 10 NF) al 0,5 %

- 15 Natrosol (HHX 250) al 1,5 %

y la goma xantán (Xantural 180) al 2 %.

Los espesantes no tienen todos el mismo poder gelificante. Sin embargo, los geles analizados deben tener una viscosidad similar. Por eso las concentraciones de espesante introducidas en estos últimos son diferentes.

Efecto sobre las propiedades anti-microbianas

- 20 La acción de estos diferentes gelificantes ha sido estudiada en primer lugar sobre mezclas de agua / etanol de concentración 10 y 15 % de alcohol que son las concentraciones críticas.

El Natrosol es el espesante que permite reducir la concentración de etanol de 25 % a 15 % a la vez que satisface los criterios A de la farmacopea europea.

- 25 El conjunto de los espesantes ensayados permite reducir la concentración de etanol de 15 a 10 % a la vez que satisface los criterios de la USP.

La goma xantán no asegura una buena reducción del *Sta*. Por eso, el 15 % de etanol acoplado a la goma xantán solamente asegura los criterios B de la farmacopea europea. El Carbopol y el Natrosol acoplados al 15 % de etanol aseguran la reducción de las bacterias a la vez que satisfacen los criterios A de la farmacopea europea.

- 30 La gran diferencia reside en la eliminación del *Aspergillus Niger*. Solo el acoplamiento de etanol/Natrosol asegura su eliminación (2,4 log de reducción en 14 días) conforme a los criterios A de la farmacopea europea.

Sus acciones no son por tanto similares. Es posible determinar un orden de acción antimicrobiana.

Natrosol > Carbopol > Goma xantán

Es por tanto más interesante seleccionar el Natrosol acoplado al 15 % de etanol para su acción sobre el *Aspergillus Niger*.

Se ha medido la actividad del agua de los diferentes geles.

La presencia de cada espesante tiene como consecuencia hacer caer más o menos la actividad del agua.

La bajada más importante se observa con el Natrosol cuando se introduce en el 15 % de etanol.

Ejemplo 3: Estudio del efecto de los espesantes en las mezclas glico-etánolicas

- 5 Como se ha demostrado antes, los espesantes tienen la facultad de hacer caer la actividad del agua y por tanto de asegurar una conservación con una tasa más baja de etanol desplazando así la zona de aceptabilidad.

Siempre con vistas a reducir la cantidad de etanol aportado a la solución, se debe considerar la acumulación de la acción de los humectantes y de los espesantes.

El espesante elegido es el Natrosol al 1,5 % y los humectantes elegidos son el PG y el PEG 400.

- 10 Propilenglicol

Se han analizado dos fórmulas:

Natrosol al 1,5 %, PG al 30 %: gel 1

Natrosol al 1,5 %, 10 % de etanol, 15 % de PG: gel 2

- 15 Se ensayan estas fórmulas para determinar si es posible eliminar completamente el etanol de las fórmulas (gel 1) y si es posible desplazar de la zona de aceptabilidad de los criterios A o B de la farmacopea europea.

Sin el gelificante, estas fórmulas no pasarían ni los criterios A, ni los criterios B de esta farmacopea.

El análisis realizado sobre el gel 1 demuestra que no satisface los criterios A y B de la farmacopea europea. El Natrosol no ha aportado para estas concentraciones una variación de la zona de aceptación de los criterios de la farmacopea europea.

- 20 Para el gel 2, los criterios A se satisfacen para el conjunto de los gérmenes con la excepción del *Aspergillus Niger*. La reducción observada para éste es de 1,2 log. Por lo tanto únicamente se satisfacen los criterios B.

El Natrosol aporta una cierta mejora sobre la aceptación de los criterios de esta farmacopea. La variación de la actividad del agua tiene una consecuencia directa a ciertas concentraciones puesto que gelificada la mezcla de 10 % de etanol y 15 % de PG, pasa los criterios B de la farmacopea europea.

- 25 PEG 400

Se han analizado dos fórmulas por las mismas razones que precedentemente

Natrosol al 1,5 %, PEG al 30 %: gel 3

Natrosol al 1,5 %, 10 % de etanol, 10 % de PEG: gel 4

- 30 La acción del PEG es menos importante que la del PG en las mismas condiciones. Los geles de PEG estudiados no permiten hacer variar la zona de aceptabilidad de los criterios de la farmacopea europea ni de la USP.

Conclusión sobre los sistemas etánolicos:

- 35 La asociación del etanol con los glicoles, en particular el propilenglicol, es una opción interesante ya que ellos tienen la facultad de hacer caer la actividad del agua. El PG posee igualmente una acción bactericida importante que permite reducir la concentración de alcohol. La relación entre el etanol y la fase acuosa que asegura la conservación cae el 15 %.

La misma relación ha sido determinada gracias al estudio de los geles de Natrosol hidro-etanólico.

Ejemplo de mezcla glico-etanólica utilizable en una composición de tipo emulsión o loción:

15 % de etanol, 5 % de PG y 3,5 % de glicerol.

- 40 Esta asociación de glicol ha permitido poner en evidencia su sinergia puesto que esta emulsión cumple ampliamente los criterios A de la farmacopea europea.

Ejemplo 4: Otros aditivos que tienen una eficacia anti-microbiana.

ES 2 411 983 T3

El fin de este estudio es trabajar sobre las familias de moléculas que podrían tener una acción antimicrobiana gracias a funciones químicas específicas.

Los quelantes y los antioxidantes van a ser analizados en el seno de una emulsión tipo de la formulación.

La emulsión elegida es clásica y puede ser considerada como una emulsión típica del servicio de formulación.

5 La composición de la fórmula es:

| | CONSTITUYENTES | Porcentaje p/p |
|-------------|---------------------|-----------------------|
| Fase grasa | Alcohol estearílico | 4,90 |
| | EUMULGIN B2 PH | 2,10 |
| | Alcohol cetílico | 1,50 |
| | Aceite de parafina | 15,00 |
| Fase acuosa | Agua estéril | Completar hasta 100 % |

Esta fórmula va a ser la base del conjunto de los siguientes análisis. Así, las moléculas que van a ser ensayadas serán introducidas en ella.

10 Esta fórmula ha sido analizada utilizando el ensayo de eficacia de los conservantes (PET) con el fin de verificar que esta fórmula no contiene ningún elemento que pueda inhibir la proliferación microbiana.

Tabla n° 11: Resultados del análisis de la emulsión tipo

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 6,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| <i>Sta</i> | 6,0 | 0,2 | 0,3 | 1,7 |
| <i>Pseu</i> | 6,1 | 0 | -0,2 | -0,2 |
| <i>Can</i> | 6,0 | --- | --- | 0 |
| <i>Asp</i> | 6,0 | --- | --- | 0 |

15 Es bien visible que la emulsión elegida no tiene ninguna acción antimicrobiana puesto que no se observa ninguna reducción significativa de gérmenes durante los tiempos de análisis. Esta emulsión no satisface ningún criterio de ninguna farmacopea. Las reducciones logarítmicas son muy débiles incluso inexistentes para el conjunto de los gérmenes.

Así, las eventuales reducciones que será posible observar a lo largo de los siguientes análisis serán claramente debidas a los efectos antimicrobianos de los compuestos ensayados.

20 Las concentraciones que se han utilizado son las concentraciones límites superiores toleradas en el campo farmacéutico. Así, si no se satisfacen los criterios, no será necesario aceptar el constituyente como un inhibidor potencial de microorganismos.

Quelantes, el EDTA disódico, dihidratado.

El EDTA ha sido introducido en la fase acuosa al 0,15 %. Esta concentración es la concentración máxima a utilizar en el campo farmacéutico.

25 Antioxidantes

Los antioxidantes que se presentan a continuación, son antioxidantes normalmente utilizados en formulación.

Antioxidantes analizados

| | | |
|--------------------------|------------------------|---|
| Antioxidantes naturales | Ácido cítrico | 2 % en la fase acuosa |
| | Ascorbato de sodio | 2 % en la fase acuosa |
| | Tocoferol | 0,05 % en la emulsión preparada y enfriada puesto que la molécula es sensible al calor. |
| Antioxidantes sintéticos | BHT | 1 % en la fase grasa |
| | Propilgalato | 0,1 % en la fase grasa |
| | Palmitato de ascorbilo | 1 % en la fase acuosa a 70 °C |

Resultados

Tabla nº 12: Análisis de los resultados obtenidos con cada uno de los aditivos sobre cada germen estudiado

| Aditivos | % | Mohos | Levaduras | Bacterias Gram + | Bacterias Gram - | |
|------------------------|------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | | <i>Aspergillus Niger</i> | <i>Candida Albicans</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Escherichia Coli</i> |
| Emulsión blanca | | - | - | - | - | - |
| EDTA | 0,15 | - | - | - | ++ | - |
| Ácido cítrico | 2 | - | ++ | ++ | ++ | + |
| Ascorbato de sodio | 2 | - | - | ++ | - | + |
| Tocoferol | 0,05 | - | - | - | - | - |
| BHT | 1 | - | - | - | - | - |
| Propilgalato | 0,1 | - | - | - | ++ | - |
| Palmitato de ascorbilo | 1 | - | - | ++ | ++ | + |
| Total | | - | ++ | ++ | ++ | + |

Leyenda:

5 - no se satisface ningún criterio, ni de la farmacopea europea, ni de la USP,

+ para el *Coli*: se satisfacen los criterios de la USP

++: se satisfacen los criterios A de la farmacopea europea

El estudio de las diferentes acciones de estos aditivos revela una gran diversidad de su comportamiento frente a los microorganismos.

10 Es posible distinguir 3 comportamientos bien distintos.

✓ El tocoferol y el BHT no tienen una eficacia significativa sobre el conjunto de los gérmenes. Su utilización no será por tanto aceptada para asegurar una conservación antimicrobiana.

✓ El EDTA y el propilgalato inhiben únicamente la *Pseudomonas aeruginosa* a la vez que satisfacen los criterios A de la farmacopea europea.

15 El ascorbato de sodio tiene una muy buena acción sobre el *Staphylococcus aureus* a la vez que satisface los criterios A de la farmacopea europea y sobre la *Escherichia Coli* a la vez que satisface los criterios de la USP.

✓ El ácido cítrico y el palmitato de ascorbilo tienen un espectro de eficacia más amplio. En efecto, los dos son bactericidas. La acción del ácido cítrico es más importante puesto que inhibe además de las bacterias, la *Candida Albicans* gracias a un pH muy bajo (pH = 2,04).

20 Conclusión

Los resultados muestran que no es posible obtener un espectro de acción completo que inhiba la totalidad de los gérmenes.

El *Aspergillus Niger* es bloqueante. Ninguno de los aditivos estudiados ha permitido una inhibición ni siquiera mínima.

25 La eliminación de los mohos es el problema recurrente para cada una de las vías de autoprotección estudiadas. Solo el etanol a alta concentración ha permitido inhibir su desarrollo.

Es por lo tanto importante determinar un sistema de conservación que asegure la inhibición del conjunto de los gérmenes y en particular del *Aspergillus Niger*.

Ejemplo 5: Utilización parcial de un sistema conservante clásico.

30 Con el fin de asegurar la conservación total de una matriz, es importante que el sistema conservante asegure la inhibición de las bacterias y de los hongos.

Clásicamente, se utiliza una combinación de conservantes antimicrobianos, varios parabenos y fenoxietanol.

Las concentraciones de estos conservantes están reguladas, la mezcla de los parabenos no debe exceder el 0,8 % de la fórmula y la concentración del fenoxietanol se limita al 1 %. El conjunto del sistema conservante clásico representa por tanto el 1,8 % de la masa de la fórmula.

5 El estudio precedente ha señalado numerosas vías de estudio que pueden reemplazar parcialmente el sistema conservante. Así, se han señalado aditivos tales como antioxidantes o humectantes que podrían asegurar la acción bactericida del sistema conservante.

La utilización de conservante está limitada por tanto a su acción fungicida.

10 Para esto, se ha decidido seleccionar el palmitato de ascorbilo que asegura la acción bactericida. No se ha elegido el ácido cítrico porque la influencia del pH es un parámetro que constituiría un estudio mucho más importante. Los resultados obtenidos no serían significativos porque entran en juego dos criterios, el pH y la acción de la propia molécula.

15 El sistema fungicida se puede obtener únicamente por el propilparabeno que tiene una acción más importante sobre estos gérmenes que el metilparabeno y el etilparabeno. En efecto, 250 ppm de propilparabeno permiten inhibir el *Aspergillus Niger* y la *Candida Albicans* mientras que harían falta 1000 ppm de metilparabeno para obtener el mismo resultado. [9]

Con el fin de reducir al máximo el aporte de conservantes antimicrobianos, se han ensayado varias concentraciones de propilparabeno.

Se ha analizado un intervalo de concentración que va de 0,4 % (porcentaje máximo autorizado por la regulación) a 0,1 % en intervalos de 0,1 %.

20 Composiciones de las emulsiones analizadas

| N° | CONSTITUYENTES | % | % | % | % |
|---------------|------------------------|------|------|------|------|
| Fase orgánica | Alcohol estearílico | 4,9 | 4,9 | 4,9 | 4,9 |
| | EUMULGIN B2 PH | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,1 |
| | Alcohol cetílico | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| | Aceite de parafina | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Fase acuosa | Agua estéril | 75,1 | 75,2 | 75,3 | 75,4 |
| Antioxidante | Palmitato de ascorbilo | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Conservantes | Propilparabeno | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |

Resultados del ensayo de eficacia de los conservantes (PET)

Tabla n° 13: Resultados de la eficacia del sistema palmitato de ascorbilo / propilparabeno

Emulsión al 0,4 % de propilparabeno

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 5,9 | >3,9 | 4,8 | 5,9 |
| <i>Sta</i> | 5,9 | >3,9 | 4,2 | 4,8 |
| <i>Pseu</i> | 5,9 | >3,9 | 4,3 | 4,5 |
| <i>Can</i> | 5,9 | --- | --- | >4,0 |
| <i>Asp</i> | 5,9 | --- | --- | 3,3 |

Emulsión al 0,3 % de propilparabeno

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 5,9 | >3,9 | 4,5 | 5,9 |
| <i>Sta</i> | 5,9 | >3,9 | 4,7 | 4,7 |
| <i>Pseu</i> | 5,9 | >3,9 | 4,8 | 4,9 |
| <i>Can</i> | 5,9 | --- | --- | >4,0 |
| <i>Asp</i> | 5,9 | --- | --- | 3,0 |

25 Emulsión al 0,2 % de propilparabeno

ES 2 411 983 T3

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Sta</i> | 5,9 | >3,9 | 4,8 | 5,9 |
| <i>Pseu</i> | 5,9 | >3,9 | 4,8 | 5,9 |
| <i>Can</i> | 5,9 | --- | --- | >4,0 |
| <i>Asp</i> | 5,9 | --- | --- | 2,0 |

Emulsión al 0,1 % de propilparabeno

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 5,9 | >3,9 | 3,7 | 4,6 |
| <i>Sta</i> | 5,9 | >3,9 | 3,7 | 4,2 |
| <i>Pseu</i> | 5,9 | >3,9 | 3,8 | 4,2 |
| <i>Can</i> | 5,9 | --- | --- | 4,8 |
| <i>Asp</i> | 5,9 | --- | --- | 2,0 |

5 El conjunto de las fórmulas estudiadas por el ensayo de eficacia de los conservantes (PET) cumple todos los criterios de las farmacopeas europea y americana. Sin embargo, para las fórmulas que contienen 0,2 % y 0,1 % de propilparabeno, la reducción del Asp observada es justo igual a 2,0. Para mayor seguridad en los resultados, la fórmula seleccionada es la que contiene 0,3 % de propilparabeno y 1 % de palmitato de ascorbilo.

El porcentaje de conservante antimicrobiano introducido en esta emulsión es del 0,3 % contra el 1,8 % de las emulsiones clásicas. La reducción de parabenos y de conservantes por regla general se ha obtenido por tanto gracias a la utilización del 1 % de palmitato de ascorbilo.

Ejemplo 6: Combinación de los aditivos estudiados en los ejemplos precedentes

10 Con el fin de eliminar totalmente el sistema conservante clásico de una composición, se analiza la siguiente mezcla:

- Un antioxidante, el palmitato de ascorbilo al 1 % en masa
- Un humectante, el propilenglicol al 5 % en masa
- Un porcentaje de agua más bajo que precedentemente, 50 % en masa
- Una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %.

15 Composiciones de las fórmulas analizadas

| N° | CONSTITUYENTES | % | % |
|---------------|------------------------|-------|------|
| Fase orgánica | Alcohol estearílico | 4,9 | 4,9 |
| | EUMULGIN B2 PH | 4 | 4 |
| | Alcohol cetílico | 1,5 | 1,5 |
| | Aceite de parafina | 39,6 | 39,6 |
| Fase acuosa | Agua estéril | 38,13 | 39,9 |
| | etanol | 5,87 | 4,1 |
| | PG | 5 | 5 |
| Antioxidante | Palmitato de ascorbilo | 1 | 1 |

Resultados del ensayo de eficacia de los conservantes (PET)

Tabla n° 14: Resultados de las emulsiones n° 1 y n° 2

Emulsión n° 1 $R_{\text{etanol/fase acuosa}} = 15$

| | Reducción en log | | | |
|--|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |

ES 2 411 983 T3

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Sta</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Pseu</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Can</i> | 5,9 | --- | --- | >4,0 |
| <i>Asp</i> | 5,9 | --- | --- | >3,9 |

Emulsión n° 2 $R_{\text{etanol/fase acuosa}} = 10$

| | Reducción en log | | | |
|-------------|------------------|-------|---------|----------|
| | Control | T48 h | T7 días | T14 días |
| <i>Coli</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Sta</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Pseu</i> | 5,9 | >3,9 | 5,9 | 5,9 |
| <i>Can</i> | 5,9 | --- | --- | >4,0 |
| <i>Asp</i> | 5,9 | --- | --- | >3,9 |

5 El conjunto de los criterios de las farmacopeas se satisface muy ampliamente. En efecto, las reducciones observadas son muy elevadas. La reducción en log del *Aspergillus Niger* a los 14 días es superior a 3,9 para las dos fórmulas. Se puede seleccionar la emulsión n° 2 que contiene menos etanol puesto que su acción es tan buena como la de la emulsión n° 1.

La actividad del agua no desempeña aquí un papel muy importante puesto que a este valor, solamente se inhiben *Coli* y *Pseu*.

10 La acción antimicrobiana observada es debida al efecto sinérgico de la asociación de palmitato de ascorbilo, etanol y PG.

REINVIDICACIONES

1. Una composición farmacéutica tópica, caracterizada porque comprende una mezcla de excipientes que presenta una actividad anti-microbiana, comprendiendo dicha mezcla de excipientes:

- etanol y

5 - palmitato de ascorbilo a una concentración del 1 % en masa

- propilenglicol al 5 % en masa,

- un porcentaje de agua inferior al 50 % en masa

- una relación etanol / fase acuosa que va de 10 a 15 %,

10 conteniendo dicha composición de 0 a 1,8 % en masa de conservantes elegidos entre los generadores de formaldehído, tal como la imidazolidinilurea, o la diazolidinilurea, los derivados tiazínicos, los derivados clorados, tal como la clorhexidina, los derivados fenólicos, tal como los parabenos, los derivados alcohólicos, tal como el bronopol, el fenoxietanol, el bronopol, el cloroxilenol, los derivados ácidos, tal como el ácido sórbico, el ácido benzoico y/o el cloruro de benzalconio.

2. La composición según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla de excipientes comprende;

15 - entre 5 y 25 % de etanol.

3. La composición según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque la mezcla de excipientes comprende además un espesante presente a una concentración de al menos 0,5 % en masa.

4. La composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque dicha composición contiene menos de 0,8 % de parabenos.

20 5. La composición según la reivindicación 4, caracterizada porque dicha composición contiene menos de 0,4 % de propilparabeno.

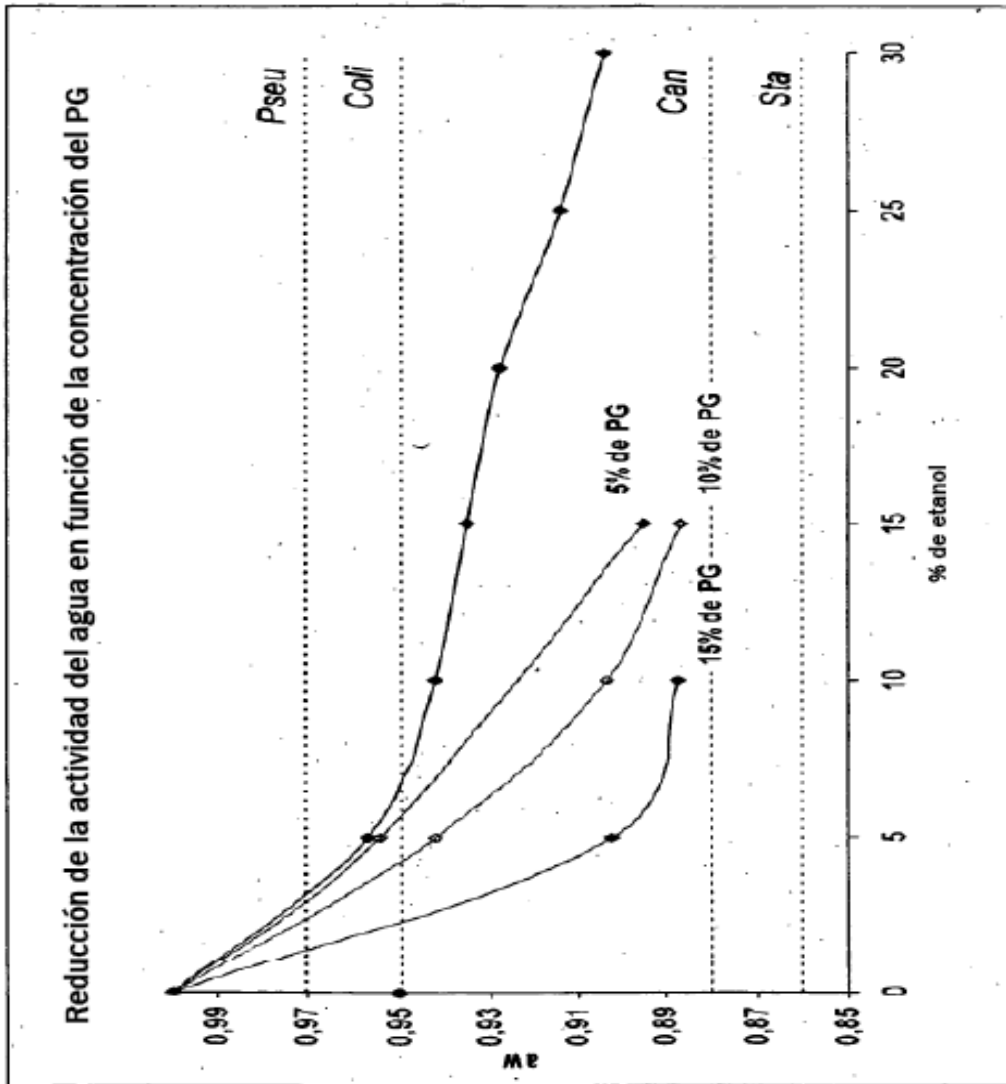


Figura 1

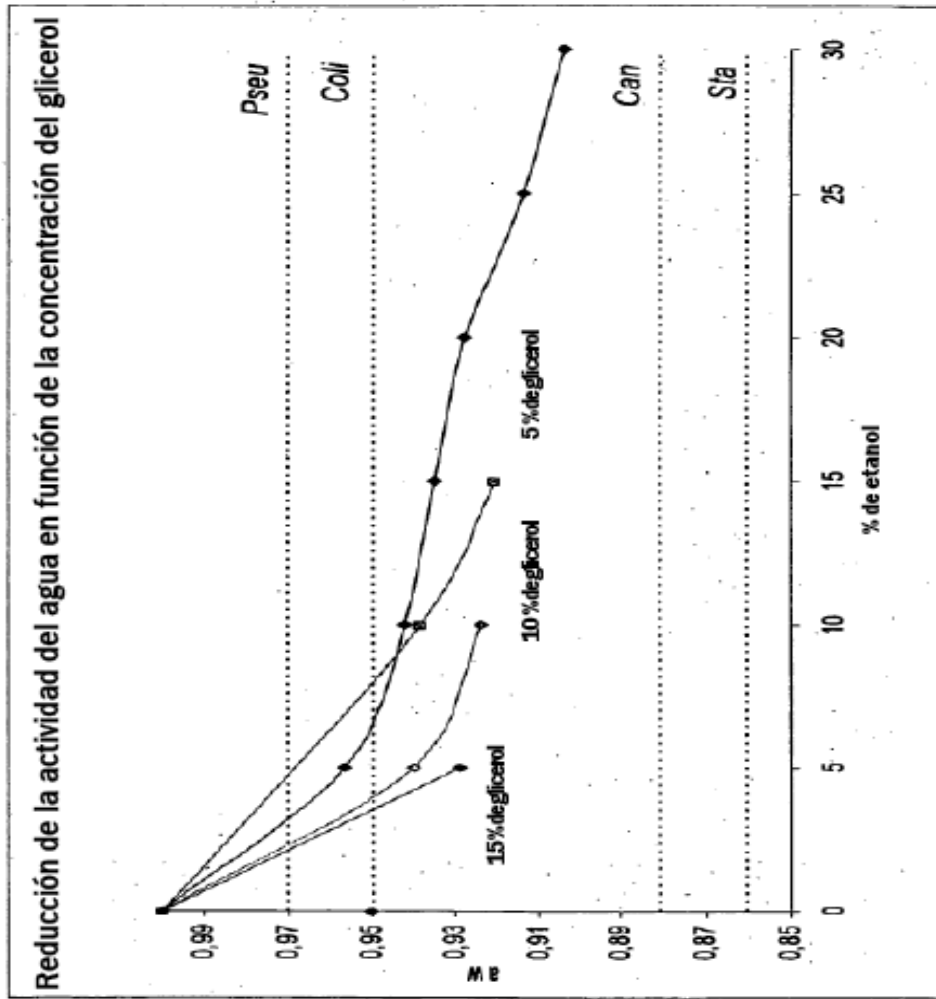


Figura 2

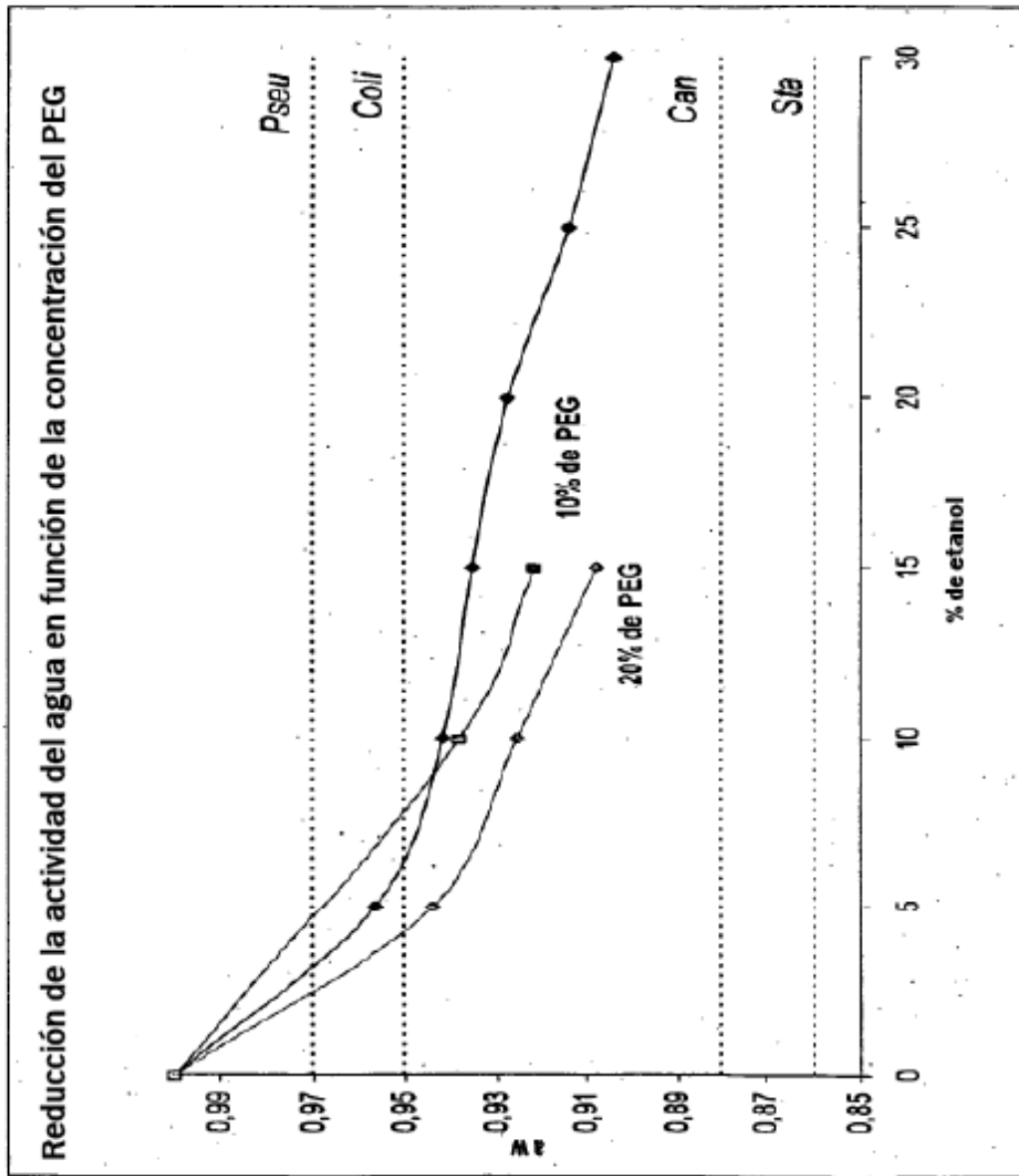


Figura 3

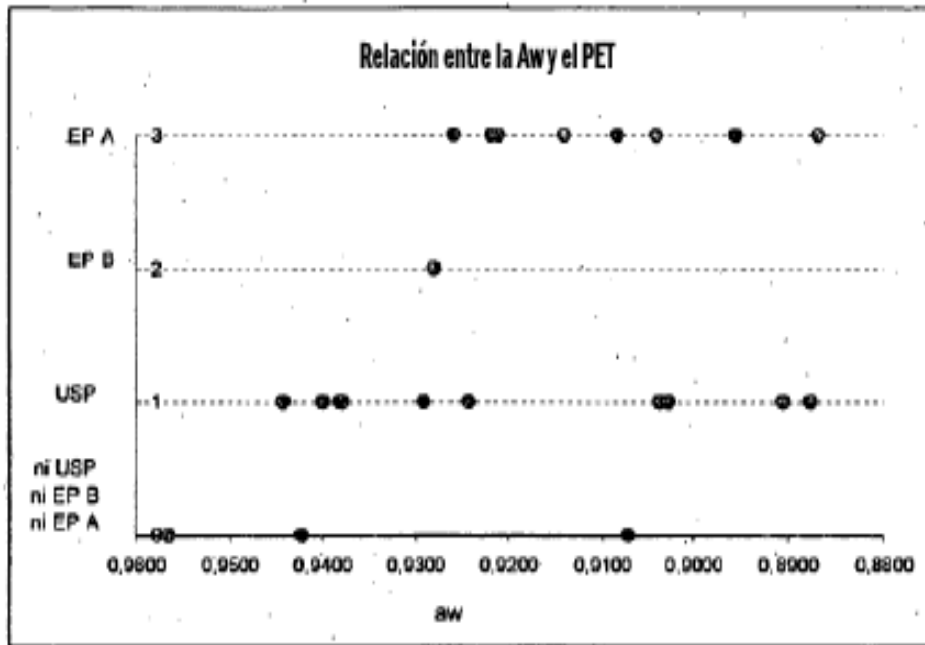


Figura 4