

Actividad antibacteriana de la bencidamina HCl



Escribano-Patón,
César

Antibacterial activity of the benzidamine HCl

Escribano-Patón, César*

Ruiz-Martínez, Lidia*

Montaña-Puig, Francesc**

Ruiz-España, Neus***

* Máster en Ciencias Experimentales Biomédicas. Unidad de Microbiología. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona.

** Departamento Médico. Laboratorios Farma-Lepori. Barcelona

*** Profesora Asociada. Unidad de Microbiología. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona.

Resumen: En el presente trabajo se valora la eficacia antibacteriana del colutorio Tantum verde® y la de su, presuntamente, único principio activo, la bencidamina clorhidrato. Para ello, se ensayó la actividad *in vitro* de la bencidamina HCl y del Tantum verde mediante la obtención de las correspondientes CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) siguiendo la técnica de la dilución en medio sólido. Inicialmente, se estudiaron ocho cepas de uso común en el laboratorio y, posteriormente, el estudio fue ampliado a cepas de patógenos bucales aisladas de muestras clínicas. Los estudios realizados, demuestran una eficacia bactericida real frente a patógenos bucales pertenecientes a géneros tales como *Actinomyces*, *Bacillus*, *Actinobacillus*, *Veillonella* o *Streptococcus*. Además, el Tantum verde como colutorio posee, en general, una mayor actividad antibacteriana que la demostrada por su principal principio activo, la bencidamina HCl, por lo que cabe pensar que la presencia de etanol a baja concentración, en su composición contribuye de forma notable a la acción antibacteriana.

Palabras clave: Tantum verde®, Bencidamina HCl, CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), Patógenos bucales, Actividad antibacteriana.

Abstract: This work is devoted to the evaluation of the antibacterial activity of Tantum verde® mouth-rinsing solution and its supposedly only active principle, benzidamine HCl. For this reason, the activity *in vitro* of Tantum verde and benzidamine HCl was tested by measuring MIC (Minimal Inhibitory Concentration) by means of serial dilutions on solid medium. Eight bacterial species commonly used and a set of oral pathogenic microorganisms isolated from clinical samples in the laboratory were studied. Results showed an actual bactericidal effect on oral pathogens such as *Actinomyces*, *Bacillus*, *Actinobacillus*, *Veillonella* o *Streptococcus*. Moreover, Tantum verde as a mouth rinsing solution had a higher antibacterial activity than its active principle (benzidamine HCl). This suggests that the presence of low concentrations of ethanol present in the composition of Tantum verde contributes remarkably to the antibacterial action.

Key words: Tantum verde®, Benzidamine HCl, MIC (Minimal Inhibitory concentration), Oral pathogen, Antibacterial activity.

Correspondencia

Neus Ruiz España
Unidad de Microbiología. Facultad de Odontología. Campus de Bellvitge
C/ Feixa Llarga s/n
08907- Hospitalet de Llobregat
(Barcelona)
E-mail: nruiz@bell.uib.es

Fecha recepción	Fecha última revisión	Fecha aceptación
28-10-2002	24-02-2003	14-03-2003

BIBLID [1138-123X (2003)8:3; mayo-junio 245-348]

Escribano-Patón C, Ruiz-Martínez L, Montaña-Puig F, Ruiz-España N.
Actividad antibacteriana de la bencidamina HCl. RCOE 2003;8(3):287-292.

RCOE, 2003, Vol 8, N°3, 287-292

Introducción

Desde el punto de vista estrictamente microbiológico, la cavidad oral es uno de los hábitats más complejos que existen posiblemente sólo superado por el tubo digestivo de los animales superiores y el hombre. Los microorganismos pueden encontrarse en sus hábitats naturales en dos formas o estados: el estado planctónico (es decir en suspensión en medios líquidos) o en estado adherido sobre superficies sólidas. La cavidad oral ofrece multitud de microambientes en los que a las bacterias les es permitido sobrevivir en ambos estados. Los dientes son un excelente medio para que las poblaciones bacterianas se adhieran. La placa bacteriana es, en realidad, un conjunto de poblaciones bacterianas mixtas, es decir constituidas por multitud de especies incluidas normalmente en una matriz adherida consistentemente al diente. La placa bacteriana, desde el punto de vista microbiológico, debe entenderse como un sistema dinámico fuertemente influido por los factores ambientales, es decir por las condiciones físico-químicas y biológicas de la cavidad oral. Es, por tanto, posible intervenir en este estado dinámico. Una de las armas para influir en el estado de las poblaciones bacterianas orales lo constituyen las diversas estrategias para la higiene bucal. La utilización de colutorios es un buen sistema complementario de higiene dental, lo que conlleva múltiples aplicaciones en la práctica odontoestomatológica, entre ellas la profilaxis de secuelas de las infecciones de la cavidad oral. Existe una amplia relación de principios activos que se utilizan en los colutorios

para incrementar su acción tanto antibacteriana como antiinflamatoria. Podría afirmarse que los colutorios presentan características funcionales cercanas a los dentífricos, pero se diferencian de éstos en que no presentan en su composición agentes abrasivos y, en ocasiones, incluyen algún alcohol como disolvente.

En función de su composición y de la presencia o no de determinados principios activos, los colutorios presentan diferentes acciones como son ayudar a la eliminación de restos de alimentos de la cavidad bucal, complementar las medidas mecánicas de control de la placa bacteriana, aportar un buen sabor de boca, ayudar a controlar durante un cierto tiempo la halitosis o eliminar temporalmente algunos microorganismos. La acción antibacteriana de los colutorios ha sido estudiada extensamente. Nuestro grupo publicó recientemente un estudio en el que se comparaba la acción antimicrobiana de una serie de colutorios comerciales^{1*}.

Tantum verde (Farma Lepori, Barcelona) es un colutorio con acción terapéutica debida a su principio activo: el clorhidrato de bencidamina. La especialidad se prepara en solución, formulada a base de un único principio activo, la bencidamina HCl, a una concentración del 15%. En su composición se incluye como excipiente, entre otros, el etanol a una concentración final del 10%.

Bencidamina HCl es una molécula con propiedades antiinflamatorias demostradas en procesos odontológicos^{2,3}, anestésicas⁴ y analgésicas⁵ gracias a su particular mecanismo de acción, consistente básicamente en una actividad inhibitoria de algunas

citocinas proinflamatorias, tales como factor- α e interleukina-1 β ⁶, estabilizando las membranas celulares y lisosómicas⁵ e inhibiendo las prostaglandinas, efecto demostrado experimentalmente mediante la inhibición de las prostaglandinas producidas por fibroblastos gingivales estimulados mediante citoquinas proinflamatorias⁷. También se ha descrito un cierto efecto antibacteriano, del cual se desconoce su mecanismo^{8**-10*}.

Debido a estas propiedades y demostrada su adsorción y permanencia¹¹ en mucosa bucal, la especialidad se recomienda para el tratamiento de aftas, periodontitis, faringitis, gingivitis y amigdalitis.

El objetivo fundamental de este estudio se ha centrado en valorar la eficacia bactericida de Tantum verde, con el fin de conocer su actividad antibacteriana y la de su, presuntamente, único principio activo: bencidamina HCl.

Material y método

Se ha estudiado la actividad antibacteriana *in vitro* de la bencidamina HCl y Tantum verde frente a un total de 18 cepas bacterianas siguiendo la técnica de dilución en medio sólido, mediante la aplicación del protocolo establecido por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS M7-A5)¹².

En la primera parte de este estudio se compararon sobre las mismas cepas, la especialidad Tantum verde y el principio activo bencidamina HCl, utilizando un total de 8 cepas bacterianas. Estas bacterias fueron seleccionadas entre especies de uso común

en el laboratorio de microbiología. Se conservaron congeladas a -80°C . A partir de los congelados se obtuvieron cultivos cuya identidad se comprobó siguiendo la metodología microbiológica convencional y se prepararon cultivos de una noche para proceder a los estudios posteriores.

Las especies microbianas estudiadas en esta primera fase del estudio incluyeron tres cocos Gram-positivos: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus pneumoniae* así como tres bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* y, finalmente un bacilo Gram-negativo aeróbico estricto, *Pseudomonas aeruginosa*. Estos microorganismos se seleccionaron debido a que son los que usualmente se utilizan para valorar la potencia antimicrobiana de desinfectantes y otros productos antibacterianos. Entre ellos se encuentran dos de las especies con mayor resistencia a los antibacterianos (*Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*).

En la segunda parte del trabajo experimental, y con el fin de ensayar la actividad antibacteriana sobre microorganismos orales que incluyeran patógenos bucales, se procedió al aislamiento e identificación de bacterias directamente a partir de muestras clínicas obtenidas de la cavidad bucal. Para ello se contó con la colaboración del personal facultativo de la clínica odontológica de la Universidad de Barcelona. Se recolectaron un total de 100 muestras directas mediante diversos métodos de muestreo según la patología de que se tratara. Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio para proceder al aislamiento

primario de microorganismos sobre diferentes medios de cultivo específicos que incluyeron: agar sangre y agar chocolate incluyéndose duplicados de los mismos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas así como diferentes medios selectivos o de elección. Los microorganismos seleccionados se identificaron, mediante la observación de colonias, tinción Gram y la consiguiente observación microscópica de las bacterias y, finalmente, la realización de las pruebas bioquímicas convencionales. Eventualmente, cuando fue necesario se utilizó el sistema miniaturizado API20A. De las cepas aisladas se seleccionó posteriormente un grupo que se utilizaron en la segunda parte de este estudio.

Una vez identificadas, las diferentes cepas se conservaron en medio adicionado de glicerol al 10% en condiciones de ultracongelación a -80°C . Las especies bacterianas estudiadas en esta segunda fase del estudio fueron: *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacillus spp*, *Veillonella parvula*, *Veillonella spp* y *Streptococcus mitis*.

La concentración inhibitoria mínima (CMI) se determinó mediante la técnica de dilución seriada en medio sólido, utilizando placas de Mueller Hinton para el estudio de enterobacterias y estafilococos, agar Mueller Hinton enriquecido con sangre de carnero 5% (v/v) para estreptococos y placas de Columbia agar enriquecidas con sangre de carnero al 5% (v/v), para las bacterias anaerobias.

Las bacterias anaerobias se incubaron en jarras de Gaspac en las que se alcanzaron las condiciones anaerobias mediante el uso del sistema Anaerogen (OXOID).

Los inóculos se prepararon por el método directo a partir de cultivos de 18-24 horas en agar sangre, realizando suspensiones de 2 o 3 colonias de idéntica morfología en solución salina hasta alcanzar una turbidez equivalente al número 0,5 de la escala Mac Farland ($>10^8$ ufc/mL). La concentración final en el agar fue de 10^4 unidades formadoras de colonia (ufc). Las placas se inocularon con 10 μl de cada una de las suspensiones bacterianas. Se incorporaron en cada serie dos placas de control sin sustancia problema como control de crecimiento y detección de contaminaciones accidentales así como las cepas control de referencia.

Se preparó una solución patrón de Tantum verde de 1500 μg /mL (en términos de concentración de bencidamina) y otra a una concentración de 6000 μg /mL bencidamina HCl, (cuatro veces mas concentrada que en el preparado comercial), utilizando como solvente agua destilada estéril. A partir de estas soluciones patrón se prepararon una serie de diluciones sucesivas de modo que la concentración de agente antibacteriano en las placas descendiera gradualmente.

Estas diluciones se mezclaron con el medio fundido a 45° preparado previamente. Tras mezclarlo cuidadosamente con el agar y con la sangre, cuando fue necesario, se vertieron en placas de Petri.

Las pruebas sobre las citadas placas de Mueller Hinton mezcladas con los diferentes volúmenes de las soluciones iniciales de Tantum verde o bencidamina HCl, se inocularon cultivándose a 37°C durante 72 horas en el caso de los patógenos anaerobios o sólo durante 24 horas para el resto de microorganismos.

Se llevaron a cabo dos grupos de experimentos con la intención de poder compararlos posteriormente. Tanto las cepas de uso común como los patógenos orales, se ponen a prueba contra los dos preparados: Tantum verde y la bencidamina HCl disuelta. Todas las valoraciones se realizaron por triplicado y los valores presentados aquí corresponden a los valores medios encontrados. Debe señalarse que la desviación de valores es de un orden completamente despreciable.

Transcurrido el período de incubación se procedió a la lectura de las placas determinando el valor de la CMI que se define como la concentración más baja de sustancia que inhibe el crecimiento bacteriano visible; se desechó como crecimiento la presencia de 2-3 colonias o de un ligero velo.

Resultados

La tabla 1 muestra los valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) para cada una de las cepas estudiadas en la fase inicial del presente trabajo, mientras que la tabla 2 muestra los valores de CMI obtenidos frente a patógenos orales de aislamiento primario.

Las CMI de todas las bacterias evaluadas oscilaron entre 46,8 $\mu\text{g/mL}$ y 600 $\mu\text{g/mL}$, concentraciones inferiores a las que presenta la bencidamina HCl en la especialidad Tantum verde, a excepción del valor máximo de 3000 $\mu\text{g/mL}$ para *Pseudomonas*. El dato más interesante es que las CMI de los anaerobios procedentes de cavidad bucal son inferiores a la concentración del principio activo que tiene la especialidad.

Tabla 1: Resultados en términos de los valores de CMI Tantum verde y bencidamina HCl para los distintos microorganismos ensayados (en $\mu\text{g/mL}$)

MICROORGANISMO	Tantum verde	Bencidamina HCl
<i>Enterococcus faecalis</i>	375	750
<i>Escherichia coli</i>	500	600
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	375	375
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	750	3000
<i>Serratia marcescens</i>	500	600
<i>Staphylococcus aureus</i>	375	375
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	62,5	187,5

Tabla 2. Resultados en términos de los valores de CMI Tantum verde y bencidamina HCl para los distintos microorganismos de origen oral ensayados (en $\mu\text{g/mL}$)

MICROORGANISMO	Tantum verde	Bencidamina HCl
<i>Actinomyces viscosus</i> .	187,5	46,8
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	375	46,8
<i>Bacillus spp.</i>	375	93,7
<i>Veillonella parvula</i>	46,9	93,7
<i>Veillonella spp.</i>	375	93,7
<i>Streptococcus mitis</i>	46,9	187,5

Discusión

La colonización bacteriana de la cavidad oral se correlaciona claramente con la aparición de la mayoría, sino la totalidad de las enfermedades dentales, principalmente de caries y de enfermedades periodontales. La formación de las comunidades bacterianas estables en la cavidad oral, denominadas placas dentales es la consecuencia obvia de la colonización. En general se citan dos tipos de placa

dental: la placa subgingival y la placa supragingival; la primera relacionada con la enfermedad periodontal y la segunda con la caries. La utilización de agentes antibacterianos en la higiene bucal diaria puede reducir de modo importante la colonización bacteriana y, por consiguiente, la incidencia de estas enfermedades.

En este trabajo se ha determinado cuantitativamente la eficacia antibacteriana de un colutorio cuyas indicaciones no incluyen específicamente la reducción de las poblacio-

nes bacterianas buco-dentales. Esta cuantificación se ha realizado por el método de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de la especialidad farmacéutica y de su principio activo.

A partir de los resultados obtenidos se ha podido constatar una real eficacia bactericida del clorhidrato de benzidamina frente a microorganismos aislados de la cavidad oral entre los que se incluyen anaerobios patógenos bucales, pertenecientes a géneros como *Actinomyces*, *Bacillus*, *Actinobacillus*, *Veillonella* o *Streptococcus*. Algunos de estos microorganismos son bien conocidos como responsables de algunas de las enfermedades que afectan a la cavidad oral. Diversos autores^{8**-10*} han demostrado la eficacia bactericida de la benzidamina en bacterias como *P. aeruginosa* y *S. aureus* y han comprobado un efecto sinérgico en combinaciones con antibióticos como la ampicilina, la tetraciclina o el cloramfenicol. Parece ser, por tanto, que la benzidamina es un potente biocida frente a una gran

variedad de microorganismos incluso en concentraciones menores a las que son utilizadas en el tratamiento antiinflamatorio.

En principio, los resultados muestran una mayor resistencia de las bacterias Gramnegativas a la benzidamina lo cual es coherente con el hecho de que en general estas bacterias presentan una menor susceptibilidad, debido al efecto protector de su membrana externa que limita el acceso de las moléculas desde el exterior a las estructuras celulares diana. La mayor susceptibilidad detectada fue la de *Streptococcus mutans* que, como se sabe es el cariógeno primario. En principio un resultado como este debería llevarnos a la conclusión de que la benzidamina protege frente a la caries dental, si bien, como ha sido repetidamente sugerido por diversos autores¹³, parece que *S. mutans* debe considerarse un habitante normal de la cavidad oral y que son los factores ambientales, tales como la dieta o la predisposición genética, los que determinarían finalmente que el cariógeno

no primario iniciara las lesiones que habrían de conducir a la aparición de caries

Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primera parte de este estudio, cabe pensar que la especialidad Tantum verde no sólo posee una actividad antibacteriana específica frente a bacterias patógenas de la cavidad oral sino que, incluso ésta, es superior a la demostrada por la benzidamina HCl. Posiblemente la presencia de una pequeña proporción de etanol en el producto contribuye de modo notable a la acción antibacteriana tal y como se ha descrito también por otros autores¹⁷.

Dado que las indicaciones de uso del principio activo estudiado y de su correspondiente formulación farmacéutica no incluyen específicamente la eliminación de la flora bucal, cabe considerar que, en cualquier caso, en la práctica odontológica la acción antibacteriana de los productos ensayados no es despreciable y debería tenerse en cuenta a la hora de la prescripción como una ventaja adicional.

Agradecimiento

Agradecemos explícitamente la dirección de este trabajo al Profesor Miquel Viñas. Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto PM 98-0189.

Bibliografía recomendada

Para profundizar en la lectura de este tema, el/los autor/es considera/an interesantes los artículos que aparecen señalados del siguiente modo: *de interés **de especial interés.

1**. Gautier G, Noguier M, Costa N, Canela J, Viñas M. **Mouthrinses: a comparative microbiological studies.** Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol 2000;42:23-9.

Trabajo en el que se valora la eficacia de seis colutorios antisépticos de uso generalizado en Espa-

ña contra diversas bacterias de origen bucal y no bucal mediante la utilización de diversas técnicas. Se determinan valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) así como cinéticas de muerte bacteriana a fin de evaluar dicha eficiencia.

2. Landry RG, Turnbull RS, Howley T. **Effective-**

ness of benzydamine HCl in the treatment of periodontal post-surgical patients. Research and Clinical Forums 1992;10(8):105-17.

3. Adame Sosa R, Gómez Pedroso, A. **Valoración de benzidamina en el tratamiento de la inflamación secundaria después de la extracción**

- de terceros molares. *Práctica Odontológica* 1990;11(7):29-34.
4. Simard-Savoie S, Forest D. **Topical Anaesthetic Activity of Benzydamine.** *Current Therapeutic Research* 1978;23(6):734-45.
 5. Quane PA, Graham GG, Ziegler JB. **Pharmacology of Benzydamine.** *Inflammopharmacology* 1998;6(2):95-107.
 6. Sironi M, Massimiliano L, Transidico P, Pinza M, Sozzani S, Mantovani A, Vecchi A. **Differential effect of benzydamine on pro-versus anti-inflammatory cytokine production: lack of inhibition of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist.** *Int J Clin Lab Res* 2000;30:17-9.
 7. Modéer T, Yucel-Lindberg T. **Benzydamine reduces prostaglandin production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 β or tumor necrosis factor α .** *Acta Odontol Scand* 1999;57:40-5.
 - 8**. Fanaki NH, El-Nakeeb MA. **Antimicrobial Activity of Benzidamine, a Non-Steroid Anti-inflammatory Agent.** *Journal of Chemotherapy* 1992;4(6):347-52.
- Trabajo que describe la actividad antimicrobiana del agente benzidamina frente a 38 cepas de origen bacteriano, fungico y levaduras. Dicho análisis ha sido llevado a cabo mediante la utilización de diversas técnicas como la determinación de los valores de Mínima Concentración Inhibitoria (MIC), Mínima Concentración Letal, porcentajes de supervivencia y curvas de crecimiento.
9. Molinari GL, Andreoni S, Fortina G. **Attività battericida e fungicida *in vitro* di benzidamina cloridrato.** *Atti XXI Congresso Nazionale AMCLI, Associazione Microbiologi Clinici Italiani*, 4-7 ottobre 1992. *Microbiología Médica* 1992;8(2):180-3.
 - 10*. Fanaki NH, El-Nakeeb MA. **Antibacterial Activity of Benzydamine and Antibiotic-Benzydamine Combinations against Multi-fold Resistant Clinical Isolates.** *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1996;46(1):320-3.
- Descripción de la actividad bactericida del agente antiinflamatorio benzidamina contra diversos aislamientos clínicos multiresistentes, mediante la técnica del recuento viable de células. Asimismo se evalúa la acción sinérgica de dicho agente utilizado junto con antibióticos como ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina.
11. Baldock GA, Brodie RR, Chasseaud LF, Taylor T, Walmsley LM. **Pharmacokinetics of benzydamine after intravenous, oral, and topical doses to human subjects.** *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1991;12:481-92.
 12. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically.** National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000. 5th ed. Approved estándar M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne. Pa.
 13. Van Palenstein Helderma WH, Matee MI, van der Hoeven JS, Mikx FH. **Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutant streptococcal species.** *J Dent Res*