



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SUBSALICILATO  
DE BISMUTO Y SU COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO *IN VITRO*

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PR E S E N T A:**  
**ALEJANDRO LUIS VEGA JIMÉNEZ**

**TUTORA:**  
**DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES**  
Facultad de Odontología - UNAM

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA**  
Instituto de Investigaciones en Materiales - UNAM  
**DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**  
Facultad de Medicina - UNAM

Ciudad Universitaria, CD.MX. Septiembre. 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Argelia Almaguer Flores quien me brindó la oportunidad de continuar con mi formación académica y con quien construí este proyecto. Gracias por todas tus atenciones, tu paciencia, y consejos recibidos tanto en el plano laboral como personal. Gran parte de lo que soy ahora, te lo debo a ti y siempre te estaré agradecido por ello.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Sandra E. Rodil Posada y al Dr. Andrés E. Castell Rodríguez por toda su orientación y apoyo científico que recibí para el desarrollo de este trabajo. En especial a la Dra. Rodil quien tuvo una participación muy importante en este proyecto brindándome su conocimiento, su aprecio y la infraestructura de su laboratorio.

A los revisores de este trabajo: Dra. Ana María Fernández Presas, Dra. Laura Acosta Torres y especialmente al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez por su apoyo, observaciones y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Enrique Camps Carbajal con quien se desarrolló la síntesis de las nanopartículas de subsalicilato de bismuto en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), especialmente a la Mtra. Mariela Flores Castañeda quien estuvo siempre apoyándome de manera constante en el desarrollo de esta investigación.

Al Mtro. Edgardo Berea Montes y al Dr. Joaquín Aarón Hidalgo, por la ayuda en la obtención y manipulación del subsalicilato de bismuto.

A la Dra. Andrea De Vizcaya Ruizdel departamento de Toxicología CINESTAV-IPN con quien se llevó a cabo la última parte de este proyecto. Gracias Dra. De Vizcaya por recibirme y brindarme no solo toda la infraestructura de su laboratorio y su conocimiento, sino por escucharme y hacerme sentir parte de su equipo durante el tiempo que trabajé en su laboratorio. Todo mi afecto y mi gratitud.

A todo el equipo del laboratorio 26, del departamento de Toxicología CINESTAV-IPN especialmente a la Bióloga Marisela Uribe Ramírez, Mtra. Aidee Rodríguez Vázquez y al Dr. Gamaliel Aztatzi Aguilar por su ayuda técnica, académica y emocional, la cual fue vital y de suma importancia para mí.

Mi más sincero respeto y agradecimiento a la QFB. Sirenia González Pozos del LANE CINESTAV-IPN por la obtención de las micrografías de TEM. Gracias por todos sus consejos, su paciencia y transmisión de conocimiento en todo el procedimiento para obtener las micrografías. De la misma forma agradezco al Dr. Daniel Bahena Uribe del LANE y Dr. Jaime Santoro Salazar del Departamento de Física, con quienes también trabajé en la obtención de imágenes de TEM.

A mis colegas, compañeros y amigos de Laboratorio: Myriam Martínez Hernández Mtra. Cecilia Barrera Ortega, Mtra. Katya Jarquín Yáñez y Dr. Víctor García Pérez y del laboratorio de Genética Molecular: Dra. Laurie Ann Ximenez Fyve y Mtra. Patricia Rodríguez Hernández. Gracias por su compañía, amistad y consejos recibidos.

A la Laboratorista María de Jesús Salinas Nájera por su apoyo técnico y siempre tener la disposición de ayudarme.

Del IIM-UNAM: a la Dra. Phaedra Silva Bermúdez, Dr. Jonatán Pérez Álvarez y Mtra. Abril Fonseca García. Mi más sincero agradecimiento por toda la ayuda recibida para este proyecto.

A la Dra. Ana Rodríguez Hernández, quien nunca me ha abandonado y a quien le tengo un profundo cariño y respeto.

Del ICCADET-UNAM a la Dra. América Vázquez Olmos y Dra. Citlali Sánchez Aké quienes tuvieron toda la disposición para ayudarme a concluir este proyecto, especialmente a la Dra. Vázquez quien supo escucharme y me ayudo cuando más lo necesité.

Agradezco a la Facultad de Odontología de la UNAM: Al Mtro. Arturo Fernández Pedrero de quien he recibido su apoyo académico y laboral que me han permitido sacar adelante este proyecto, así como superarme en el plano profesional y personal. Especialmente a la Mtra. María Cristina Sifuentes Valenzuela por todo su apoyo y cariño desde que inicie mi formación profesional. Gracias por ser en todo momento un ejemplo de valores y principios éticos y humanos, por escucharme, por animarme a seguir adelante, por ser en algún momento mi tutora y ahora una persona a la cual le tengo un profundo agradecimiento, respeto y mucho afecto.

A mis colegas y compañeros académicos. Mtra. Paulina Ramírez Ortega, Esp. Nancy Velázquez Mireles y CD. Diego Cobos Ortega por todo su apoyo académico y tiempo compartido.

Y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde hace varios años me ha permitido formarme en el plano personal, profesional y académico. Gracias por darme la posibilidad de desarrollar y despertar un pensamiento crítico. El compromiso y la constancia de poder alcanzar todo lo que se nos proponga, el conocimiento, tener siempre curiosidad, imaginar, actuar, ser humildes, nunca olvidar nuestros orígenes y sobre todo ser agradecidos, nos harán mejores personas.

Agradezco el apoyo de CONACYT No. Beca 234904 y del proyecto PAPIIT No. IN220416.

“Por mi raza hablará el espíritu.”

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
1. BISMUTO .....	8
1.1 Compuestos de bismuto.....	8
1.2 Subsalicilato de bismuto y usos generales.....	12
2 NANOTECNOLOGÍA .....	14
2.1 Nanomateriales en el campo Médico-Odontológico .....	15
2.2 Ablación láser .....	17
2.3 Nanopartículas a base de bismuto y usos generales....	20
3 INFECCIONES ASOCIADAS A MICROORGANISMOS DE CAVIDAD BUCAL .....	22
3.1 Formación y composición de la placa dentobacteriana.....	23
3.2 Características de especies bacterianas de importancia Odontológica .....	24
4 INFECCIONES ASOCIADAS A MICROORGANISMOS EN DISPOSITIVOS BIOMÉDICO .....	30
4.1 Características de especies bacterianas de importancia Médica .....	31
5 ESTRATEGIAS PARA LA INHIBICIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE BACTERIAS .....	33
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	37
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	38
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
1. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SUBSALICILATO DE BISMUTO POR ABLACIÓN LASER (NPs-SSB).....	39
2. CARACTERIZACIÓN DE NPS-SSB .....	40
2.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).....	40
2.1.1 Principio y Procedimiento.....	40
2.2 Dispersión de Rayos X a Bajo Angulo (SAXS).....	43
2.2.1 Principio y Procedimiento.....	43
2.3 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	45
2.3.1 Principio y Procedimiento.....	45
2.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Velocímetro Laser-Doppler (LDV).....	47
2.4.1 Principio y Procedimiento.....	47
2.5 Difracción de Rayos X (XRD).....	49
2.5.1 Principio y Procedimiento.....	49

3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE NPS-SSB .....	51
3.1	Cultivos bacterianos .....	51
3.1.1	Bacterias aerobias .....	51
3.1.2	Bacterias anaerobias .....	51
3.2	Ensayo de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT)...	53
3.2.1	Principio y Procedimiento.....	53
4.	EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NPS-SSB.....	55
4.1	Cultivo Celular.....	55
4.2	Ensayos de actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	56
4.2.1	Principio y Procedimiento.....	56
4.3	Actividad mitocondrial a través del metabolismo de las sales de tetrazolio (MTS).....	58
4.3.1	Principio y Procedimiento.....	58
4.4	Internalización de NPs-SSB en fibroblastos gingivales humanos HGF-1 por TEM.....	59
4.4.1	Procedimiento.....	59
<b>VI.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>61</b>
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
1.	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPS-SSB.....	62
1.1	Espectroscopia Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).....	62
1.2	Dispersión de Rayos X de bajo ángulo (SAXS).....	66
1.3	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	68
1.4	Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Velocímetro Laser-Doppler (LDV).....	70
1.5	Difracción de Rayos X (XRD).....	72
2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE NPS-SSB.....	73
2.1	Ensayos de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT)...	73
3.	EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NPS-SSB.....	80
3.1	Ensayos de actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH).....	80
3.2	Actividad mitocondrial a través del metabolismo de las sales de tetrazolio (MTS).....	81
3.3	Internalización de NPs-SSB en fibroblastos gingivales humanos HGF-1 por TEM.....	82
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>118</b>
a.	Ensayo piloto para la determinación actividad antibacteriana de diferentes compuestos de Bismuto.	
b.	Artículos publicados.	

## RESUMEN

**Introducción.** El subsalicilato de bismuto (SSB) es un compuesto que se ha utilizado en el área médica para el tratamiento de trastornos gastrointestinales relacionados con la presencia de *Helicobacter pylori*. En el área odontológica, se ha reportado uso del SSB como elemento hemostático post-cirugía, desconociéndose hasta el momento otras aplicaciones. En la actualidad, se han realizado investigaciones para conocer sus propiedades a escala nanométrica del Bi y sus compuestos. En este sentido, la nanotecnología se ha convertido es una de las áreas más populares para la investigación actual. **Objetivo.** Sintetizar y caracterizar nanopartículas de subsalicilato de Bismuto (NPs-SSB) y evaluar su efecto antibacteriano y citotoxicidad *in vitro*. **Materiales y Métodos.** La síntesis de las NPs-SSB se realizó con la técnica de ablación laser de solidos inmersos en líquidos y la caracterización química y estructural de las NPs-SSB, incluyó análisis por medio de Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Dispersión de Rayos X bajo ángulo (SAXS), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Difracción de Rayos X (XRD). La actividad antibacteriana de los NPs-SSB se determinó mediante el ensayo de XTT utilizando bacterias representativas de cavidad bucal y de importancia médica (aerobias y anaerobias). Por otra parte, la citotoxicidad de estas nanopartículas se determinó usando cultivos de fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) mediante ensayos de LDH, MTS. Además se analizó la internalización de las NPs-SSB en los HGF-1 mediante TEM. **Resultados.** Con la técnica de ablación laser de solidos inmersos en líquidos se obtuvieron NPs de SSB de diferentes tamaños de partícula (58, 45, 31 y 22 nm) con diferentes concentraciones de 183, 150, 95 y 193 µg/mL, respectivamente. Los resultados de la caracterización mostraron que las NPs mantienen la composición química del SSB, presentan morfología semicircular y estructura cristalina. Con respecto a la actividad antibacteriana pudimos observar que las las NPs-SSB de con menor tamaño (22 nm) fueron las más efectivas, al inhibir el crecimiento bacteriano entre 80 y 90% en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Un efecto similar, fue observado en las bacterias anaerobias, ya que las NPs-SSB de 22 nm inhibieron también el crecimiento de especies como *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis*, *P. gingivalis*, *E. corrodens* y *P. micra* en un 80-90 % de inhibición. Por otro lado, las NPs-SSB tuvieron baja toxicidad celular en fibroblastos gingivales humanos al indicar poco daño en la membrana celular y la actividad mitocondrial, en el rango de concentraciones que presentaron buena actividad antibacteriana. **Conclusiones.** Las NPs-SSB mostraron muy buen efecto antibacteriano y poca citotoxicidad *in vitro*, por lo que tienen el potencial de ser incorporadas en materiales de uso dental y dispositivos médicos con el objetivo de evitar la colonización de bacterias y de esta manera combatir infecciones de importancia médico-odontológica.

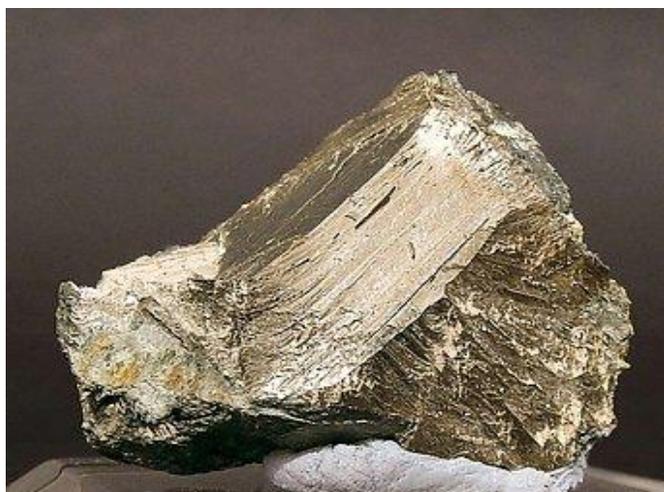
## ABSTRACT

**Introduction.** Bismuth subsalicylate (BSS) has been used in the medical field for the treatment of gastrointestinal disorders associated with *Helicobacter pylori*. In the dental field, BSS has been using as post-surgical hemostatic element, unknown other applications. In recent years, the research has been conducted to ascertain the nanoscale properties of Bi and Bi compounds. In this sense, nanotechnology has become as one of the most important current research area. **Objective.** To synthesize and characterize bismuth subsalicylate nanoparticles (BSS-NPs), and to evaluate its antibacterial effect and cytotoxicity *in vitro*. **Materials and methods.** The synthesis of NPs-SSB was performed using the laser ablation technique and the chemical and structural characterization of the BSS-NPs, included the analysis by Spectroscopy UV-Visible (UV-Vis), Transmission Electron Microscopy (TEM), Small-angle X-ray scattering (SAXS), dynamic light scattering (DLS) and X-ray Diffraction (XRD). The antibacterial effect of the BSS-NPs was performed by XTT assay against oral anaerobic and aerobic bacteria related with nosocomial infections. In addition, the cytotoxicity of the BSS-NPs were determined using human gingival fibroblasts (HGF-1) using the LDH, MTS assays, also the internalization of the BSS-NPs in cells was observed by TEM. **Results.** Nanoparticles with different particle sizes (58, 45, 31 y 22 nm) with different concentrations (183, 150, 95 and 193 µg/mL, respectively) were obtained. The characterization of the BSS-NPs indicated that the chemical composition of BSS was maintained, with semicircular morphology and crystalline structure. Regarding the antibacterial effect, we observed that the BSS-NPs with smaller size (22 nm) were the most effective in the inhibition of the bacterial growth from 80 to 90% against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. A similar effect was observed on the anaerobic bacteria; the BSS-NPs of 22 nm also inhibited the growth of species such as *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis*, *P. gingivalis*, *E. corrodens* and *P. micra* with an 80-90% of inhibition. Furthermore, the BSS-NPs had low cytotoxicity on human gingival fibroblasts indicating little damage in the cell membrane and mitochondrial activity when were tested at the same and even higher concentrations that had been showed good antibacterial activity. **Conclusions.** The results shown that BSS-NPs has a good antibacterial effect and low cytotoxicity *in vitro*, thus the BSS-NPs has the potential to be incorporated into dental materials and medical devices to use in order to prevent bacterial colonization and for eradicating dental and medical infections.

## I.INTRODUCCIÓN.

### 1. BISMUTO.

El Bismuto (Bi) es un metal blancuzco, frágil con un ligero tinte rosa debido al óxido de la superficie, fue descrito en 1753 como elemento químico por el científico francés Claude Geoffroy(Hampel and Hawley 1973). Su número atómico es 83, miembro del grupo del arsénico: V-A de la tabla periódica y un peso molecular de 208,9 daltons (Figura 1). Este elemento produce vapores verdosos y es poco conductor del calor y la electricidad (Harwig and Gerards 1978). El Bi metálico ( $\text{Bi}^0$ ) es el material más diamagnético que existe ya que cambia su configuración electrónica, desviando en ángulo recto los campos magnéticos cuando se acerca a un imán (Taylor 1950).



**Figura 1.**Bismuto metálico. Tomado de (fabreminerals.com 1977).

#### 1.1 Compuestos de Bismuto.

En compuestos, el Bi tiene valencias de +3 o +5, siendo más estables los compuestos de Bi trivalentes. Varias sales de Bi se derivan del nitrato de Bismuto, que es

hidrolizado a subnitrato de Bi. El subnitrato de Bi, reacciona en solución con sales básicas solubles para formar otros compuestos tales como: subcarbonato, subsalicilato, subgalato, o subcitrato de Bi (Ghatak and Bhattacharya 2012).

Los elementos del grupo V de la tabla periódica son compuestos semiconductores, por lo que Bi es un material técnicamente importante por su fotosensibilidad, fotoconductividad y poder termoeléctrico (Killedar, Lokhande et al. 1996). Debido a estas características, algunos compuestos como el Sulfuro de Bismuto ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ), que se encuentra en la naturaleza en su fase cristalina ortorrómbica conocida como Bismutinita (Vega-Gonzalez and Bokhimi 2007).

Las aplicaciones de las sales de Bi son diversas e incluyen usos en el área médica y otras áreas como la cosmetología y otras industrias. Por ejemplo, el oxiclورو de Bi ( $\text{BiOCl}$ ) es usado como un ingrediente nacarado en cosméticos. El fosfomolibdato de Bi ( $\text{BiPMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) se utiliza como catalizador en la producción de fibras de acrilonitrilo, que se emplea en la fabricación de fibras acrílicas, plásticos y pinturas. (Hampel and Hawley 1973).

En el área médica son usadas diversas sales de Bi como el subcarbonato de Bi ( $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$ ), el subcitrato de Bi coloidal ( $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BiO}_{14}$ ), subgalato de Bi ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{BiO}_6$ ) y subnitrato de Bi ( $\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$ ), que se emplean por sus propiedades astringentes, germicidas y antiácidas. Tanto el subgalato como subnitrato y la leche de Bi se encuentran incluidos oficialmente en la USP (United States Pharmacopoeia). También se ha descrito que una pequeña cantidad de ión bismutilo ( $\text{BiO}^+$ ) disuelto ejerce un suave efecto antiséptico (Hampel and Hawley 1973).

Se han utilizado también como agentes antimicrobianos compuestos como el Pepto-Bismol (Subsalicilato de Bi, SSB), DeNol (subcitrato de Bi coloidal, CBS), y los derivados del CBS, como la ranitidina citrato de Bi (RBC) para el tratamiento de trastornos gastrointestinales relacionados con la presencia de *Helicobacter pylori* que incluyen diarrea, gastritis y colitis (Figuroa-Quintanilla, Salazar-Lindo et al. 1993; Tillman, Drake et al. 1996; Ge, Chen et al. 2012; Pacifico, Osborn et al. 2012; Delchier, Malfertheiner et al. 2014). Otros estudios, han reportado el uso de sales de Bi como componentes de vendajes hemostáticos para heridas (Tramontina, Machado et al. 2002; Kim, Tramontina et al. 2012), antisépticos locales y agentes radiopacos biocompatibles (Serena, Parnell et al. 2007). La diversidad de compuestos de Bi en la medicina se extiende al tratamiento de la sífilis (Willcox 1948), tumores (Kopfmaier 1994)[30], y en terapias con radioisótopos (Macklis, Kaplan et al. 1989).

Diferentes reportes señalan que los compuestos de Bi son menos tóxicos en los organismos vivos en comparación con otros metales pesados como el plomo (Pb) y antimonio (Sb). Además, presentan baja solubilidad y buena biocompatibilidad (Kricheldorf 2009). Su baja solubilidad en la sangre, permite que se eliminen fácilmente en la orina, y no han mostrado efectos carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos en pruebas a largo plazo en animales (hasta 2 años) (Matano and Suzuki 1996). Su retención en el cuerpo humano es de 5 días, pero se sabe que en pacientes tratados con compuestos de Bi puede permanecer en el riñón durante años (Fowler and Sexton 2007).

Los reportes de captación de Bi en varios tipos celulares incluyen células renales (Stoltenberg and Danscher 2000), neuronas motoras (Pamphlett, Danscher et al. 2000;

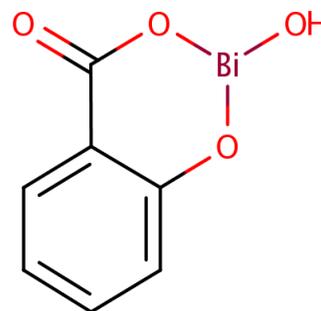
Pamphlett, Stoltenberg et al. 2000), células ganglionares (Stoltenberg, Schionning et al. 2001) y células Leyding (células productoras de testosterona) (Stoltenberg, Danscher et al. 2000). En estos casos el Bi fue localizado en los lisosomas, donde induce su ruptura. Estos orgánulos realizan un papel vital en el metabolismo de metales pesados (Stoltenberg, Larsen et al. 2002).

Por otra parte, se ha reportado que la administración de Bi cuando existe gingivitis puede desencadenar un proceso de estomatitis ulcerosa (Shafer, Hine et al. 1983; Lambert 1991). La cantidad y concentración consumida y captada de este elemento, es decisiva para una adecuada comprensión del riesgo a la salud que pueda ocasionar (Briand and Burford 1999).

Se han incorporado compuestos de Bi en materiales odontológicos y médicos; por ejemplo el trióxido de Bi ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) en cementos endodónticos (Seven, Ayyildiz et al. 1989; Camilleri 2008; Coutinho-Filho, De-Deus et al. 2008; Bueno, Zeferino et al. 2009) y el Trifenil-Bi ( $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Bi}$ ) en resinas dentales (Rawls, Marshall et al. 1992; Lang, Mattie et al. 2000) y cementos óseos (Deb, Abdulghani et al. 2002); para proporcionarles radiopacidad. De igual manera, tanto el  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  y el subcarbonato de Bi ( $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$ ) han sido utilizados para colocarse como rellenos radiopacos en catéteres (Jones, Garvin et al. 2004).

## 1.2 Subsalicilato de Bismuto y usos generales.

El Subsalicilato de Bi (SSB) es un polvo blanco altamente insoluble en agua. La evidencia reciente indica que químicamente se compone de un núcleo de óxido de Bi trivalente unido a iones de salicilato, por lo tanto, los grupos funcionales son asociados al ácido salicílico al ácido (Berkowitz 1990) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de la estructura química del Subsalicilato de Bismuto. Tomado de (Drugs.com 2000).

El SSB pertenece a un grupo conocido como organometálicos, formados por compuestos aromáticos llamados benzenoides, que contienen uno o más anillos de benceno. Su fórmula química es  $C_7H_5BiO_4$ , y se obtiene por hidrólisis de salicilato de Bi. La estructura real es desconocida y la formulación es sólo aproximada. Cada molécula contiene 58% de salicilato y 42% de Bi en peso (Berkowitz 1990).

La historia de la utilización de SSB comienza a partir del año 1900. En esa época, dos de cada 10 niños morían antes de los cuatro años de edad aproximadamente, muchos de ellos de la enfermedad llamada "cólera infantil." Esta enfermedad se caracterizó por diarrea y malestar estomacal. Aunque una variedad de tratamientos fueron utilizados, ninguno tuvo éxito (Bierer 1990). Sobre la base de informes de Europa del uso de las sales de Bi para el tratamiento de diversas molestias del tracto gastrointestinal, un médico en Nueva York desarrolló una preparación líquida que contenía sales de SSB, zinc para su astringencia, salol (salicilato de fenilo) por su capacidad antiséptica, extractos de aceite de la planta de gaulteria para el sabor, y un colorante rojo para hacer color rosa el producto, con el fin de atraer a los niños. Esta preparación fue llamada "Fórmula Cólera Infantil" y, a

diferencia de los preparativos previos para el cólera infantil, este fue un éxito para el tratamiento de esta enfermedad. Cuando la demanda del producto excedió la capacidad del boticario local para prepararlo, el médico contrató a la recién formada Norwich Pharmacal Company (Norwich, N.Y.) para su fabricación; el producto fue hecho por primera vez en tinas de madera de 20 galones y vendido directamente a los médicos. Como el uso del producto aumentó, los médicos descubrieron que esa fórmula era eficaz contra una enfermedad llamada "queja del verano" que se caracterizó por una serie de síntomas que incluye gastroenteritis aguda, diarrea, calambres y vómitos. Aunque en 1918, Norwich Pharmacal comenzó a comercializar este producto a nivel nacional como Bismosal, posteriormente, el nombre fue cambiado a Pepto-Bismol®, cuando se descubrió que había otro producto comercializado bajo el nombre Bismosal (Bierer 1990).

En la actualidad el SSB se sigue vendiendo bajo el nombre de marca Pepto-Bismol, y sigue siendo utilizado para tratar malestares temporales del estómago y el tracto gastrointestinal, como diarrea, indigestión, ardor de estómago y náuseas. La específica sensibilidad de *Helicobacter pylori* al SSB ha promovido la investigación de su efecto antibacteriano contra otros microorganismos tales como *Clostridium difficile* (Mahony, Woods et al. 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (Alipour, Dorval et al. 2011), *Escherichia coli* (Brogan, Verghese et al. 2005; Shaikh, Giridhar et al. 2007), *Staphylococcus* sp. (Shaikh, Giridhar et al. 2007), *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp. y *Yersinia* sp. (Ericsson, Evans et al. 1977; Sox and Olson 1989).

Debido a las aplicaciones y usos dentro de la medicina del Bi y sus compuestos, actualmente se están realizando investigaciones para conocer sus propiedades a escala

nanométrica. En este sentido, la nanotecnología se ha convertido es una de las áreas más populares para la investigación actual.

## **2. NANOTECNOLOGÍA.**

La nanociencia es el estudio de materiales y fenómenos a escala nanométrica en diversas áreas del conocimiento, tales como la química, física y recientemente ha despertado interés en la biología a través del estudio de estructuras y procesos biológicos en la escala nanométrica, cuyo objetivo es obtener conocimiento de procesos biológicos para poder abordar problemas en Medicina, Biotecnología y Farmacia (Bhushan 2010).

El término "Nanotecnología" se emplea para describir la manipulación y producción de materiales con características estructurales dentro de la escala nanométrica (1-100 nm). Así mismo, abarca la aplicación de estos materiales en sistemas biológicos, físicos y químicos. Además integra las estructuras resultantes con dimensiones nanométricas en sistemas de mayor dimensión, y el desarrollo de nuevos dispositivos de impacto en el área médica para administrar medicamentos y mejorar la calidad de los materiales (Baneyx and Park 2013).

En el campo de la biotecnología se han desarrollado técnicas moleculares y genéticas para estudiar los procesos biológicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las técnicas de ligación y de restricción de DNA y la obtención de proteínas recombinantes.

El conocimiento adquirido de ambos campos, por una parte nanotecnología y la biotecnología, dá origen a una nueva área denominada Nanobiotecnología, la cuál está enfocada en el desarrollo de herramientas y dispositivos en la investigación en células troncales, biología del desarrollo, biosensores, métodos de administración de fármacos más eficientes y diagnósticos certeros y tempranos de enfermedades(Baneyx and Park 2013).

Las nanopartículas (NPs) son aquéllos nanomateriales que miden entre 1 y 100 nm en todas sus dimensiones. Las características de los materiales tradicionales dependen de cómo se comportan los electrones en su seno y de cómo están ordenados los átomos en la materia. Esto también ocurre en el caso de los nanomateriales, pero además es importante considerar las características particulares que surgen de las dimensiones del propio material y de la elevada proporción de átomos superficiales. Es por ello que éstos presentan propiedades físicas y químicas novedosas que pueden ser utilizadas en diferentes aplicaciones nanotecnológicas. Por ejemplo, los nanotubos de carbono presentan una mayor resistencia y dureza con respecto al carbono a nivel macroscópico (Auffan, Rose et al. 2009; Bhushan 2010).

## **2.1 Nanomateriales en el campo Médico-Odontológico.**

Existen dos características relevantes en los nanomateriales que han cobrado importancia en el área médico-odontológica. Por una parte, debido a su tamaño pueden llegar con mayor rapidez y efectividad a un blanco elegido luego de ser administrados y, por otra parte, la relación área/volumen es mayor que en un material macroscópico, lo

cual permite modificar su superficie con una mayor cantidad de moléculas activas y ofrece una mayor exposición del nanomaterial ante el blanco elegido.

Cuando estos nanomateriales se combinan con ciertas moléculas de interés biológico (antibióticos, factores de crecimiento, proteínas, etc) mediante enlaces covalentes, interacciones electrostáticas o de afinidad, se producen materiales con una capacidad de reconocimiento excepcional que pueden ser empleados en el desarrollo de nuevos biosensores, sistemas de diagnóstico y liberación de fármacos (Bhushan 2010; Baneyx and Park 2013). Estas características ubican a las NPs entre los nanomateriales con mayores aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico (Mah and O'Toole 2001), como marcadores (Gilbert, Maira-Litran et al. 2002) y biosensores (Xiao, Patolsky et al. 2003).

En el campo odontológico, el desarrollo de la nanotecnología ha permitido un gran aporte al desarrollar nuevos biomateriales odontológicos tales como cementos, resinas compuestas y sistemas de adhesión (Kanaparthi and Kanaparthi 2011), además de materiales dentales con propiedades antimicrobianas que impiden la colonización de microorganismos y el consecuente daño a las restauraciones y aditamentos protésicos (Li, Lee et al. 2006; Monteiro, Gorup et al. 2009). Hay otros productos odontológicos con nano-rellenos ( $\text{SiO}_2$ , aleaciones metálicas o porcelana vítrea) para obtener adhesivos reforzados (ej. Primer&Bond NT, Dentsply) y composites con menor desgaste y mayor fluidez (ej. FiltekSupreme, 3M-ESPE, GrandiO y Voco) (Kim, Moon et al. 2007). También, se utilizan en cementos de ionómero de vidrio para reducir la porosidad y aumentar las propiedades físicas del material (ej. Ketac™ Nano3M-ESPE) (Nomoto, Komoriyama et al. 2004). Por otro lado, se ha reportado la aplicación de nanofibras de hidroxiapatita

sintética y NPs de carbonato de hidroxiapatita, que semejan en tamaño y composición química a los cristales del esmalte dentario natural, para reparar defectos micrométricos sobre la superficie dentaria (Roveri, Battistella et al. 2009), las cuales se han incorporado a pastas dentales y enjuagues bucales (Lv, Zhang et al. 2007). Otra propuesta es el uso de NPs de materiales bioactivos o nanoporos, en la superficie de implantes dentales para mejorar su osteointegración (Tomsia, Launey et al. 2011).

## **2.2 Ablación laser.**

En la última década, la generación de nanopartículas por ablación láser en líquidos ha demostrado ser una técnica única y eficiente para generar una gran variedad de nanoestructuras. El proceso de ablación láser se conoce como uno de los métodos físicos más eficientes para la nanofabricación de materiales. Este método consiste en la ablación de un blanco (la mayoría sólido) por una intensa radiación láser, llevando esto a la expulsión de sus constituyentes y la formación de nanoclusters y nanoestructuras. Cuando un blanco es expuesto a un proceso de ablación al vacío o con atmosfera controlada, los nanoclusters pueden ser depositados en un sustrato, colocado a cierta distancia del blanco, llevando esto a la formación de películas delgadas nanoestructuradas. En contraste, la ablación láser de un material sólido en un medio líquido PLALM (por sus siglas en inglés (Pulse Laser Ablation in Liquid Media), lleva a la formación de soluciones coloidales de nanopartículas. En ambos casos, las propiedades de las nanoestructuras sintetizadas pueden ser eficientemente controladas por los parámetros de ablación láser y las propiedades del medio (Yang 2012).

La propiedad natural del proceso de ablación láser para expulsar el material en forma de nanoclusters, tiene al menos las siguientes tres ventajas sobre otros métodos convencionales químicos de síntesis de nanopartículas: a) síntesis sencilla y libre de contaminantes con poca o nula modificación química de nanoestructuras durante el proceso de ablación. b) El proceso de ablación láser puede desempeñar efectiva nanoestructuración para una gran variedad de materiales, no se necesita de un ambiente que implique condiciones extremas de temperatura y presión. c) El tamaño, forma y concentración de las NPs sintetizadas puede ser controlado al variar parámetros de sintonización del láser (Yang 2012).

Cuando la superficie del blanco sólido es expuesta a una intensa radiación láser pulsada altamente enfocada, ésta puede ser absorbida a través de varios mecanismos de transferencia de energía, llevando a un calentamiento térmico y no térmico, fusión, y finalmente ablación del material (blanco). Aquí, independientemente del mecanismo y la velocidad de la energía de radiación en la deposición, el material es mayormente “expulsado” en forma de átomos, iones (Yang 2012).

Sin embargo, los parámetros de las especies de ablación dependen fuertemente de las características de la radiación láser (energía, duración de los pulsos, longitud de onda). La intensidad del láser, es medida en  $W/cm^2$ , (entre  $10^8$  a  $10^{13} W/cm^2$ ) que determina la intensidad de la interacción radiación-materia. El proceso de ablación láser puede estar acompañado por la producción de microfragmentos o gotas, formadas en la superficie del material como un resultado de un multi-pulso por parte de la irradiación del mismo láser (Krajnovich, Vazquez et al. 1993). Este efecto, ha sido reportado en algunos reportes de

ablación láser con nanosegundos (Parker and Boudjouk 1990; Chaughule and Ramanujan 2010).

El proceso de ablación láser del material puede también estar acompañado por una producción de plasma caliente. Cuando se forma en la superficie del material, este plasma además de reducir la eficiencia en la transmisión de la energía láser a través de la superficie, causa una ablación secundaria a través del calentamiento térmico del materialó un fenómeno de cavitación (Chaughule and Ramanujan 2010; Yang 2012).

La ablación PLALM es una técnica que ha resultado ser efectiva para la preparación de nanopartículas de metales y óxidos metálicos, así como de diferentes nano-estructuras como nano-tubos, etc. en soluciones coloidales (Chen, Hong et al. 2004; Andrieux-Ledier, Tremblay et al. 2013). La síntesis de nanopartículas por PLALM no necesita de un equipo de alto vacío, se lleva a cabo a atmósfera ambiente, con una gran diversidad de líquidos. Una de las ventajas de éste método en comparación con métodos químicos es evitar la necesidad de usar agentes reductores para la síntesis de las nanopartículas, por lo tanto se puede lograr obtener nanopartículas con un nivel de pureza mayor. La pureza de los materiales nano-estructurados es valiosa para numerosas aplicaciones fundamentales y prácticas. Además de que las nanopartículas, por PLALM, pueden ser producidas en soluciones coloidales las cuales pueden ser favorables para la fabricación de nanocompósitos y/o la dispersión de dichas nanopartículas en matrices poliméricas, e incluso en aplicaciones biológicas (soluciones biocompatibles). Sin embargo su desventaja es que es una técnica que requiere de un alto costo (Lee, Seo et al. 2003; Aye, Choopun et al. 2010; Tsuji 2012; Yang 2012).

Existen diferentes reportes sobre la síntesis de nanopartículas por PLALM se enfocan principalmente en la producción de nanopartículas metálicas como son nanopartículas de Plata (Ag) y Cobre (Cu) (Chrisey and Hubler 1994; Lee, Liu et al. 1999; Yeh, Yang et al. 1999) usando ablación láser en varios solventes. En este sentido, Mafune y cols. han investigado el método de ablación láser en metales como Ag, oro (Au) y platino (Pt) y también con diferentes solventes como SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), y agua (Mafune, Kohno et al. 2000; Mafune, Kohno et al. 2001; Mafune, Kohno et al. 2002; Mafune, Kohno et al. 2003). En ellos se observaron 3 aspectos importantes: 1) el tamaño de la nanopartículas se incrementa con la molaridad del surfactante, 2) la potencia del pulso Láser, a medida que disminuye, igualmente disminuye el tamaño de las nanopartículas y 3) teniendo en cuenta que la potencia del Láser se incrementa linealmente con el área de spot láser, este incremento también se ve reflejado en el incremento de la formación de nanopartículas, ya que el número de sitios aumenta con el tamaño del spot.

### **2.3 Nanopartículas a base de Bismuto y usos generales.**

El Bi a nanoescala ha ganado un gran interés debido a sus potenciales aplicaciones en rayos-X, radioterapia, catalizadores, termoelectricidad, y óptica (Carotenuto, Hison et al. 2009; Wang and Buhro 2010; Lin, Tan et al. 2011; Hossain and Su 2012).

Varias técnicas se han empleado para fabricar nanopartículas de Bi (NPs-Bi), incluyendo plasma térmico (Wang, Cui et al. 2007), métodos electroquímicos (Reim, Littig et al. 2013), método de condensación con gas (Lee, Lee et al. 2007) y los métodos químicos en fase de solución coloidal. Este último es el método más popular, que a menudo implica la reducción de sales metálicas con diversos agentes reductores (Diaz,

Velasco-Arias et al. 2008). En este sentido, la química coloidal ofrece oportunidades para generar vías de síntesis sencillas para obtener nanopartículas de Bi con distribuciones de tamaño bien controlados y de alta cristalinidad, además de que este método de síntesis es la más común usado para obtener nanopartículas metálicas (Velasco-Arias, Zumeta-Dube et al. 2012).

Recientemente, las nanopartículas de Bi habían sido empleadas como agentes de contraste para un mejor entendimiento de los procesos biológicos a nivel biomolecular (Mahmoudi, Serpooshan et al. 2011), así como agentes antimicrobianos de amplio espectro logrando inhibir el crecimiento microbiano (Hernandez-Delgadillo, Velasco-Arias et al. 2012; Badireddy, Marinakos et al. 2013; Hernandez-Delgadillo, Velasco-Arias et al. 2013; Luo, Hossain et al. 2013). Luo y cols. mostraron que la combinación de NPs-Bi con los rayos X tiene acción bactericida contra bacterias resistentes a fármacos (multidrug-resistant (MDR) bacteria) ya que la radiación ionizante incluye rayos X y rayos gamma, que pueden penetrar fácilmente en la mayoría de los tejidos y matar a las bacterias mediante la inducción de daño irreparable al DNA (Luo, Hossain et al. 2013). Recientemente, se reportó de que las NPs-Bi inhiben el crecimiento de *H. pylori* alterando su ciclo de Krebs y metabolismo de aminoácidos y nucleótidos (Nazari, Dowlatabadi-Bazaz et al. 2014).

Los resultados de los estudios de las nanopartículas a base de Bi, han mostrado que presentan actividad bactericida, fungicida y antiviral. EISSB se utiliza para tratar las infecciones estomacales; lo cual podría indicar que las NPs-Bi no serían tóxicas hacia las células humanas. Hasta el momento existen estudios que reportan la citotoxicidad de diferentes nanopartículas de Bi con diferentes ensayos *in vitro* en diferentes tipos de

células (Luo, Wang et al. 2012; Song, Liu et al. 2014; Hernandez-Delgadillo, Badireddy et al. 2015; Staedler, Passemard et al. 2015), que aún no han logrado llegar a una conclusión general sobre el grado de toxicidad que presentan las nanopartículas a base de Bi, por lo que son necesarios estudios complementarios para conocer y garantizar su uso seguro en humanos.

### **3. INFECCIONES ASOCIADAS A MICROORGANISMOS DE CAVIDAD BUCAL.**

La cavidad bucal es un sistema en el cual se llevan a cabo procesos ininterrumpidos de crecimiento y eliminación de microorganismos y sus nutrientes. Ofrece diversos hábitats donde diferentes especies de microorganismos pueden prosperar. El principal requisito para que cualquier grupo de microbios crezca, es su capacidad de adherirse a las superficies de los dientes que se multiplican en ambientes protegidos, como las bolsas periodontales y las grietas de los dientes. La acumulación de microorganismos en la superficie de los dientes ha sido tradicionalmente llamado "placa" debido a su color amarillento (Chandki, Banthia et al. 2011).

Las bacterias son los componentes predominantes de la microflora bucal formando parte de la placa dentobacteriana, la cual se ha definido como una entidad estructural específica pero muy variable que consiste en microorganismos y sus productos embebidas en una matriz intercelular altamente organizada. La placa dentobacteriana representa una verdadera biopelícula (biofilm) que se define como una comunidad de microorganismos en la que las células se adhieren entre sí y a una superficie o sustrato, y se encuentran embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (Costerton, Cook et al.

1999). La naturaleza cooperativa de una comunidad microbiana ofrece ventajas a los organismos participantes como una gama más amplia de hábitat para el crecimiento, una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos y las defensas del huésped y una mayor patogenicidad (Marsh 2010; Chandki, Banthia et al. 2011).

Se estima que aproximadamente el 65% de todas las infecciones bacterianas en los seres humanos son causadas por bacterias que forman este tipo de estructuras (Costerton, Veeh et al. 2003). La placa dentobacteriana se ha implicado como el principal factor etiológico de la caries dental y la enfermedad periodontal. (Marsh 2004).

### **3.1 Formación y composición de la placa dentobacteriana.**

La formación y maduración de la placa dentobacteriana es un proceso altamente ordenado (Xie, Cook et al. 2000). Los primeros colonizadores de la placa dentobacteriana se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana (Saxton 1973; Theilade, Theilade et al. 1982; Scannapieco 1994; Jenkinson and Lamont 1997), las cuales interactúan con moléculas adheridas a la superficie dental derivadas de componentes salivales y del fluido crevicular (Gibbons, Hay et al. 1991; Kolenbrander, Andersen et al. 1999). Estos primeros colonizadores también poseen receptores específicos para diferentes especies bacterianas (llamados colonizadores puente o secundarios) que posteriormente se coagregarán, a la estructura inicialmente formada (Cook, Costerton et al. 1998).

Los segundos colonizadores, están formados principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Prevotella*

entre otros (Kolenbrander, Andersen et al. 1999). Sus mecanismos de adhesión les sirven de unión tanto con los primeros colonizadores como con las especies de microorganismos que se coagregarán de forma tardía a la placa bacteriana. Finalmente, el tercer grupo llamado colonizadores tardíos, son bacterias anaerobias Gram-negativas como especies de los géneros *Treponema* y *Porphyromonas* que se unen a la biopelícula dental (Kolenbrander, Andersen et al. 1999; Listgarten 1999).

En muchos casos, la compleja comunidad de microorganismos sobre el diente es relativamente benigna y los procesos protectores normales del huésped son suficientes para preservar la integridad de los tejidos (Socransky and Haffajee 2005). Sin embargo, se ha observado que estos agregados de bacterias bucales pueden ocasionar severas enfermedades localizadas como caries dental (Gonzalez-Cabezas ; Gibbons 1989), enfermedad periodontal (Preshaw, Seymour et al. 2004), peri-implantitis (Grossner-Schreiber, Teichmann et al. 2009; Casado, Otazu et al. 2011) así como el fracaso en tratamientos endodónticos (Chavez de Paz 2007; Guo and Wang 2009), y afectar otros órganos como corazón, meninges, hígado y pulmón (Wagner, Schon et al. 2006; Mueller, Saldamli et al. 2009; Parahitiyawa, Jin et al. 2009).

### **3.2 Características de especies bacterianas de importancia odontológica.**

A continuación se mencionan algunas características de bacterias representativas de la placa dentobacteriana y que fueron utilizadas en este estudio.

*Actinomyces israelii*. Son bacilos Gram-positivos, anaerobios facultativos que requieren CO<sub>2</sub> para un óptimo crecimiento. Son pleomorfos, de un diámetro variable de

0.5 a 1µm y un largo de 1.5 a 5 µm. Las colonias son de color blanco o gris crema que se observan fuertemente adheridas al medio de agar. Los principales sitios de colonización de los *Actinomyces* son la cavidad bucal en el hombre y el aparato genital femenino. Algunos *Actinomyces* han sido asociados con gingivitis y son capaces de establecerse en tejidos traumatizados y ocasionar infección supurativa. *A. israelii* es el mayor patógeno causal de actinomicosis humana, conjuntivitis y endometritis, condición relacionada al uso de dispositivo intrauterino. En la cavidad bucal predominan en la superficie dental y la interacción entre ellas y su sustrato ayuda a estabilizar la biopelícula. Dichas especies también son consideradas periodonto-benéficas debido a que suelen encontrarse en proporciones elevadas bajo condiciones de salud periodontal (Slots and Taubman 1992; Kolenbrander 2000; Winn, Allen et al. 2005).

*Agreggatibacter actinomycetemcomitans*. Son bacterias pleomórficas, Gram-negativas, capnofílicas (5 % CO<sub>2</sub>). Poseen un tamaño entre 0.4 a 0.5 µm de ancho, por 1.0 a 1.5 µm de largo. Son de los microorganismos a los que se les atribuye la mayor capacidad de ser periodonto-patógenos, y se asocian a la enfermedad periodontal agresiva localizada y en menor proporción a la variante crónica (Mandell, Tripodi et al. 1986; Socransky and Haffajee 2005). Las colonias de *A. actinomycetemcomitans* se caracterizan por una firme adherencia a la superficie del medio. Las especies pueden ser divididas en distintos serotipos, de acuerdo a su inmunodifusión y sus propiedades inmunofluorescentes indirectas. (Kiley and Holt 1980; Zambon, DeLuca et al. 1983).

*Capnocytophaga gingivalis*. Pertenece al género Flavobacteriaceae. Es un grupo de bacilos gramnegativos finos, fusiformes, se pueden observar pleomorfos cuando

se tiñen cultivos almacenados por varios días. Constituyen especies capnófilas, de crecimiento fastidioso, anaerobias facultativas, para su crecimiento se requiere de una atmósfera enriquecida con 5 a 10 % de CO<sub>2</sub> y medios como agar sangre (tripticosa de soya) o agar chocolate. Las colonias se desarrollan en forma lenta, en 2 a 4 días de incubación, son planas, opacas, de bordes difusos, granulosa, y con 2 a 3 mm de diámetro. Tienen color amarillento, (dependiendo del medio utilizado) el que se evidencia al tomar las colonias del agar. Se considera patógeno oportunista y produce fundamentalmente afecciones relacionadas con la cavidad oral, como periodontitis juvenil y periodontitis crónica del adulto (Slots and Taubman 1992; (Murray, Rosenthal et al. 2009).

*Eikenella corrodens*. Son bacilos Gram-negativos, anaerobios, con un diámetro de 0.3 a 0.4 por 1.5 a 4 µm de longitud. Sus colonias parecen “corroer” o picar la superficie del agar, produciendo crecimiento en depresión rugosa, con bordes circulares o irregulares, de color gris translúcido y no hemolítico y de 0.5 mm de diámetro. Es descrito como un organismo de crecimiento lento. Se encuentra como habitante normal de la cavidad oral, del aparato respiratorio superior y de la superficie de la mucosa de los sistemas intestinal y genital. *E. corrodens* presenta una coagregación con especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter* *Streptococcus* en la placa dental. Se considera un patógeno oportunista ureasa positivo resistente a la clindamicina (Balows 1992).

*Fusobacterium nucleatum*. Son bacilos en forma de huso, Gram-negativos, anaerobios. Pueden medir de 0.4 a 0.7 µm de ancho y de 3 a 10 µm de largo. Las colonias de *F. nucleatum* pueden observarse transparentes, suaves, redondas con un borde entero

azúl y pueden tener apariencia de muela o núcleo. Son especies predominantes en las cavidades de humanos y otros animales, así como de la flora mixta en infecciones de tejidos blandos causados por contaminación de la flora oral. Su patogenicidad se asocia a la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos y la producción de factores solubles inhibidores de la quimiotáxis de los polimorfonucleares y la elaboración de metabolitos que se comportan como compuestos tóxicos tisulares (Balows 1992; Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

*Parvimonas micra*. Son cocos Gram-positivos, anaerobios. Las células esféricas, son pequeñas y pueden medir de 0.3 a 0.7 µm de diámetro. Se encuentran no móviles y no forman esporas. Sus colonias usualmente son pequeñas de 1 a 2 mm o menos de diámetro, circular, entera, convexa, suave, gris translúcida a blanca y no hemolítica. *P. micra* no fermenta carbohidratos y produce fosfatasa alcalina. Su habitat principal es la placa subgingival de bolsas periodontales humanas, aunque también se encuentra en intestino, tracto urogenital y participa en numerosas infecciones humanas que incluyen cerebro, pulmón y mandíbula (Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

*Porphyromonas gingivalis*. Son bacilos Gram-negativos, anaerobios. Las células pueden ser pleomórficas, alargadas o cocos, de 0.5 x 1 a 2 µm. Sus colonias son típicamente pigmentadas negras, especialmente sobre medio agar que contiene sangre lisada. Esta pigmentación se debe a la presencia de hemina y protoporfirina; utilizan substratos nitrogenados como fuente de energía. El principal sitio de colonización de *P. gingivalis* es el surco subgingival de la cavidad oral y es considerado un microorganismo patógeno importante en el desarrollo de las enfermedades periodontales. Se han

observado en esta bacteria, elementos estructurales que favorecen su virulencia como los lipopolisacáricos y otros elementos como son las fimbrias, la hemaglutinina, residuos protéicos, glucídicos que actúan en los procesos de adhesión a las células epiteliales de los tejidos del hospedero y en la coagregación bacteriana. Las gingipainas es un grupo de proteasas que se encuentran en la superficie de esta bacteria que son capaces de degradar fragmentos de colágena y de alterar los sistemas normales del huésped en forma que contribuyen al desarrollo y virulencia de *P. gingivalis*(Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

*Prevotella intermedia*. Son bacilos pleomórficos, Gram-negativos, anaerobios. Con un tamaño de 0.4 a 0.7  $\mu\text{m}$  de ancho y 0.6 a 1  $\mu\text{m}$  de largo. Sus colonias en agar sangre son suaves y convexas, de 0.5 a 2.0 mm de diámetro. Fermenta glucosa (con un pH final de 4.0 a 5.4), dextrosa, maltosa, sacarosa y fructosa. Se encuentran habitualmente en el surco gingival y en la bolsa periodontal de la cavidad bucal. Se asocia a la enfermedad periodontal severa, a gingivitis ulcerativa necrotizante y a abscesos endodónticos. Las especies que conforman el género *Prevotella*, son capaces de producir pigmentos, moderadamente fermentativos, sensibles a la bilis y resistentes a la vancomicina. Entre sus factores de virulencia se encuentran las proteasas, que degradan inmunoglobulinas. Sus fimbrias participan en la agregación y coagregación bacterianas. Los metabolitos tóxicos pueden llevar a la muerte por contacto de células del hospedador, y se ha detectado una variedad de enzimas que pueden servir como factores de virulencia en diferentes cepas bacterianas anaeróbicas (Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

*Streptococcus mutans*. Bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas que se encuentran normalmente formando parte de la placa dental o biofilm dental. Se asocian al inicio y desarrollo de la caries dental. Puede prosperar en temperatura que oscila entre 18 a 40 grados centígrados. Es un grupo acidófilo porque vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentarias) e intracelulares (metabolismo energético). La transferencia de los genotipos es responsable de la transmisión de *S. mutans* de las madres a sus hijos aunque, hay una variación genotípica de una población a otra (Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

*Streptococcus sanguinis*. La palabra *sanguinis* significa sangre. Son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos. Las células pueden ser ovals y en ocasiones en forma de barra, de 0.8 a 1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Sus colonias en agar sangre son gris-blancuzco o verdes. Las colonias crecidas en un medio con sacarosa producen un polímero fuertemente resiliente que caracteriza su gran adherencia al agar. Representan el mayor componente de la placa dental supragingival y es considerado un colonizador primario por su capacidad de unirse directamente a las superficies orales. Está asociada a la etiología de la caries dental, la enfermedad periodontal y endocarditis bacteriana subaguda. Sin embargo, también juega un papel protector en enfermedad periodontal por inhibir la colonización de patógenos periodontales Gram negativos (Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

#### 4. INFECCIONES ASOCIADAS A MICROORGANISMOS EN DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS.

La bacteremia asociada a dispositivos biomédicos se relaciona con una elevada morbimortalidad, fundamentalmente en pacientes críticos. Este problema es causado por la formación de grandes agregados de bacterias sobre la superficie tanto del material como de tejidos (biopelícula), desencadenando infecciones, tales como las producidas por *Pseudomonas aeruginosa* en pulmones, principalmente en enfermos con fibrosis quística o placas microbianas en válvulas cardíacas (Costerton, Stewart et al. 1999).

La infección causada por la biopelícula se manifiesta por síntomas que clínicamente ocurren durante el tratamiento con antibióticos. Después de la adherencia inicial, la patogenia de la infección aparentemente involucra la interacción específica con diversos componentes tisulares y séricos del huésped, como el tejido conectivo, el colágeno, el laminina y las proteínas séricas, como la fibronectina y la vitronectina permitiendo la colonización tisular y el establecimiento de infecciones de heridas, la colonización puede permitir que la bacteria invada las superficies mucosas alterando el flujo del calcio en las células epiteliales; liberando toxinas, proteasas y otros productos. Esta infección es raramente resuelta por el sistema inmune del huésped.

Bajo condiciones ambientales adecuadas, se pueden desarrollar biofilms de bacterias diversas, tales como *Haemophilus influenzae* (Murphy and Kirkham 2002; Starner, Zhang et al. 2006), *Klebsiella* (Lavender, Jagnow et al. 2004; Stahlhut, Struve et al. 2012), *Escherichia coli* (Pratt and Kolter 1998; Ryu and Beuchat 2005; Wang, Lunsdorf et al. 2010), entre otras, sobre la superficie de biomateriales. Las infecciones nosocomiales más recurrentes asociadas a implantes son causadas por *Staphylococcus epidermidis*,

*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. y con menor frecuencia por *P. aereginosa* (Costerton, Stewart et al. 1999). En catéteres intravasculares, los agentes causales habituales son *S. epidermidis*, *S. aureus*, bacilos Gram-negativos y *Candida* sp.

#### **4.1 Características de especies bacterianas de importancia Médica.**

A continuación se describen cuatro especies aerobias, patógenos asociados a infecciones en dispositivos médicos, piel y tejidos blandos, utilizadas en este estudio.

*Staphylococcus aureus*. Es un coco Gram-positivo, anaerobio facultativo, de dimensiones de entre 0.5 y 1.5  $\mu\text{m}$ , productora de coagulasa, catalasa, se agrupan en racimos, formando colonias amarillas y no presenta movilidad. Esta especie forma parte de la microbiota normal del ser humano en piel, tracto gastrointestinal y respiratorio. Tiene colonización selectiva de cuero cabelludo, fosas nasales, perineo, axilas y vagina (Brenner, Krieg et al. 2005; Brooks 2007).

Se ha demostrado que causa infecciones nosocomiales crónicas como neumonía, endocarditis, abscesos y osteomielitis. La formación de biopelículas de *S. aureus* en los implantes ortopédicos incluyen articulaciones protésicas, fijadores externos, placas, tornillos y clavos. Sin embargo, otros dispositivos médicos permanentes que son propensos a la infección por esta especie incluyen catéteres intravenosos, unidades de presión arterial invasiva, válvulas de aspiradores, marcapasos y dispositivos ortopédicos (Ehrlich, Hu et al. 2004; Archer, Mazaitis et al. 2011).

*Staphylococcus epidermidis*. Son cocos Gram-positivos arreglados en grupos en forma de racimos de uvas, anaerobios facultativos, colonias cohesivas aproximadamente

de 1-2 mm de diámetro después de su incubación de dimensiones coagulasa-negativo, termonucleasa-negativo aunque a veces varia y se presenta frecuentemente en la piel de humanos y en menor frecuencia en membranas mucosas. Al ser parte de la microbiota normal de la piel, es un contaminante frecuente en muestras de laboratorio.

Forma biopelículas que crecen en los dispositivos de plástico que se colocan dentro del cuerpo. Esto ocurre más comúnmente en los catéteres intravenosos y prótesis médicas. La infección también puede ocurrir en pacientes sometidos a diálisis o a cualquier persona con un dispositivo plástico implantado que puede haber sido contaminado. Otra enfermedad que causa es la endocarditis en pacientes con válvulas cardiacas(Boone, Castenholz et al. 2001).

*Escherichia coli*. Es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, dimensiones de 1.1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y de largo 2 a 6  $\mu\text{m}$ . Ha sido considerada como una bacteria extremadamente bien adaptada, ya que es capaz de sobrevivir en medios poco nutritivos. Puede ser móvil por la presencia de flagelos (Brenner, Krieg et al. 2005). La fermentación de productos de D-glucosa y otros carbohidratos incluyen ácidos y gases visibles. Se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos como la bacteria más abundante y en animales. En ocasiones se pueden llegar a encontrar colonias en menor abundancia en tracto genital y vías aéreas superiores(Brooks 2007). Hay poblaciones de *E. coli* habitantes del tracto intestinal, por lo que puede causar además de infecciones intestinales, infecciones extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía(Balows 1992; Slots and Taubman 1992; Winn, Allen et al. 2005).

*Pseudomonas aeruginosa*. Son bacilos Gram-negativos, aerobios con motilidad rápida por contracción. Su tamaño varía de 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5 a 3  $\mu\text{m}$  de largo. En cultivos *in vitro* se reconocen por sus colonias color perla. Es una bacteria capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana. Son patógenos oportunistas en humanos y también en plantas; existen colonias que se encuentran en suelo, agua contaminada y frecuentemente está presente en pequeñas cantidades en la microbiota normal intestinal y en piel de humanos donde es el mayor microorganismo patógeno (Brooks 2007).

Se ha reportado la presencia de *P. aeruginosa* en infecciones nosocomiales como, neumonías, meningitis y abscesos cerebrales, infecciones urinarias e infecciones cutáneas como abscesos subcutáneos, vesículas y petequias, infecciones oftálmicas como las conjuntivitis y queratitis, infecciones otorrinolaringológicas como otitis externa, otitis media y mastoiditis. Adicionalmente, también ha sido encontrada en infecciones de catéteres urinarios, venosos y lentes de contacto (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004; Brenner, Krieg et al. 2005).

## **5. ESTRATEGIAS PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.**

Dentro de las estrategias para la terapia de infecciones médico-odontológicas existen varios pasos a seguir: 1) eliminar la infección, 2) prevenir su reaparición, 3) preservar función y, 4) reducir el riesgo de una infección general o sepsis (Trampuz and Zimmerli 2005).

Otra de las estrategias que existen se incluyen el tratamiento con antibióticos; si se trata de implantes u otra prótesis infectada, o si el tratamiento con ese solo agente antimicrobiano es inadecuado, se debe usar un tratamiento combinado de antibióticos. En el caso que los procedimientos anteriores no produzcan los resultados deseados, en el caso de prótesis, se debe remover y reemplazar, lo cual implica en muchas ocasiones, una nueva intervención quirúrgica del paciente (Darouiche 2004).

Lamentablemente, a pesar de comenzar a combatir la biopelícula antes de su formación, con tratamiento previo de antibióticos, ésta puede desarrollarse con éxito y provocar una infección en el paciente. Los tres mecanismos fundamentales de la resistencia a los antimicrobianos son: la degradación enzimática de los fármacos antibacterianos, la alteración de las proteínas bacterianas que son objetivos antimicrobianos, y los cambios en la permeabilidad de la membrana a los antibióticos (Dever and Dermody 1991).

En casos de infecciones asociadas con biomateriales, los mecanismos por los cuales se hacen resistentes aún no son completamente claros, pero se han considerado: la inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas, los cambios fenotípicos que adquiere la población bacteriana dentro de la biopelícula además de la matriz de exopolisacáridos y previene el acceso de agentes antimicrobianos o restringen la difusión de éstos al interior de la biopelícula. Solos o en combinación estos factores son usados para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades (Soares, Figueiredo et al. 2012; Balcazar, Subirats et al. 2015).

Lo anterior ha llevado a combatir los focos infecciosos en concentraciones de antibióticos elevadas, lo cual no siempre resulta exitoso. Ciertamente, otro factor que ha contribuido a que se presente la resistencia bacteriana es el uso desmedido o incorrecto de los antibióticos en el tratamiento contra una infección (Soares, Figueiredo et al. 2012).

Por esta razón, son necesarios nuevos enfoques para el desarrollo de nuevas terapias con agentes antimicrobianos más eficientes, manteniéndose así al corriente con la evolución constante de la resistencia microbiana ante los antibióticos. Una nueva estrategia implicaría alguna terapia que permitiera retrasar o inhibir la colonización de las primeras bacterias sobre la superficie, de esta manera se podría evitar el desarrollo del biopelícula.

Los materiales nanométricos han surgido como alternativa para ser nuevos agentes antimicrobianos, y en los últimos años, las nanopartículas se han introducido en el campo odontológico dentro de la estructura de los materiales dentales (Aydin Sevinc and Hanley 2010; Heravi, Ramezani et al. 2013) y soluciones de desinfección (Sadeghi 2010) especialmente nanopartículas a base de metal y quitosano (Allaker and Memarzadeh 2014). Hay reportes en donde se señala el uso de nanopartículas de plata (Ag) como agentes antimicrobianos con resultados prometedores para en el área dental. Sin embargo, han surgido preocupaciones con respecto a la biocompatibilidad y el uso de compuestos de Ag en odontología; debido a la acumulación a largo plazo de la plata en la piel, órganos internos y la toxicidad crónica (Peng, Botelho et al. 2012; Boudreau, Imam et al. 2016). La evidencia sustancial sugiere que los efectos inducidos por la plata están mediados a través de los iones de plata que se liberan de la superficie de la partícula

(Hadrup and Lam 2014). Por consiguiente, existe la necesidad de generar nuevos agentes que busquen combatir los microorganismos patógenos, por ejemplo: nanomateriales con propiedades antibacteriales(Rai, Deshmukh et al. 2012).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El constante uso de algunos agentes antimicrobianos, ha contribuido a la disminución en la prevalencia de infecciones médico-odontológicas. Sin embargo, se ha reportado que, los antibióticos y bactericidas químicos a menudo perturban el equilibrio de la microflora de la cavidad oral y el tracto digestivo. Más aún, las bacterias patógenas han desarrollado resistencia a varios antibióticos, causando que el tratamiento de las enfermedades infecciosas sea complicado, ya que no responden a las terapias con antibióticos comunes. Por lo tanto existe la necesidad de buscar nuevos agentes antimicrobianos, que no generen resistencia y tengan un uso clínico seguro.

En los últimos años, las nanopartículas han sido incorporadas en el área médico-odontológica como alternativa de nuevos agentes antimicrobianos especialmente las nanopartículas de plata (AgNPs). Sin embargo, hallazgos reportados han despertado la preocupación sobre los posibles efectos tóxicos en humanos iniciando el interés de investigar más sobre la toxicidad en la nanotecnología y de esta manera buscar nuevos nanomateriales con propiedades antibacteriales y no tóxicos para el ser humano.

Por lo anterior, en este estudio se plantea la elaboración y caracterización físico-química de nanopartículas de SSB que busca investigar su potencial efecto antibacteriano en bacterias representativas de cavidad bucal y de importancia médica así como observar los efectos citotóxicos *in-vitro* en células de la mucosa oral.

Los resultados de esta investigación, podrían servir para brindar una posible alternativa en el tratamiento y prevención de enfermedades bucales así como combatir infecciones nosocomiales y de esta manera contribuir al conocimiento, desarrollo y

manipulación de materiales nanoestructurados para ser incorporados en el área médico – odontológica.

### **III. HIPÓTESIS.**

Las nanopartículas de subsalicilato de bismuto tienen efecto antibacteriano y no inducen citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos.

### **IV. OBJETIVOS.**

#### **General.**

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) y evaluar su efecto antibacteriano y citotoxicidad *in vitro*.

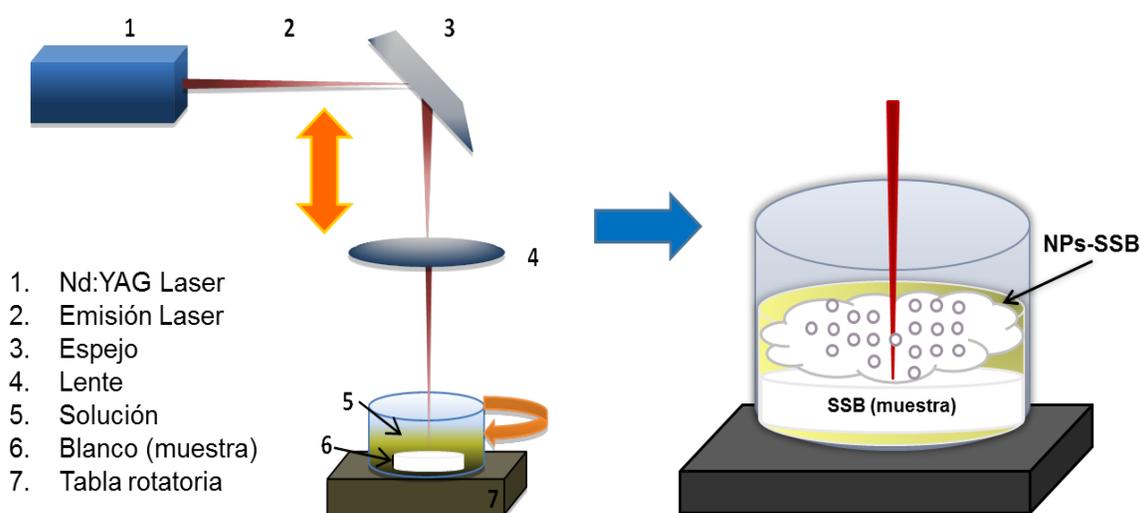
#### **Específicos.**

1. Sintetizar las NPs-SSB mediante la técnica de ablación laser en líquidos.
2. Caracterizar las NPs-SSB mediante Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Dispersión de Rayos X bajo ángulo (SAXS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Difracción de Rayos X (XRD).
3. Determinar la actividad antibacteriana de las NPs-SSB utilizando especies bacterianas representativas de la cavidad bucal e importancia médica.
4. Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las NPs-SSB utilizando fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) con ensayos LDH, MTS, así como observar la internalización de las NPs por TEM.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SUBSALICILATO DE BISMUTO POR ABLACIÓN LASER (NPs-SSB).

Para la síntesis de las nanopartículas de SSB, se utilizó un Láser Nd:YAG con una frecuencia de repetición de 20 Hz, una salida de energía máxima de 135 mJ, pulsos de 28 ns y una longitud de onda de 1064 nm (**figura 3**). El polvo de SSB( $C_7H_5BiO_4$ ) con 99,99% de pureza (FQ especialidades S.A. de C.V.) se compactó y se colocó en el interior del contenedor, sumergido en agua destilada. En los experimentos el láser fue dirigido hacia el polvo mediante un espejo y una lente de enfoque. Los parámetros de síntesis, como la distancia focal del lente con respecto al polvo y el tiempo de ablación se manipularon para modificar dos características importantes de las nanopartículas: el tamaño y la concentración.



**Figura 3.** Esquema del montaje experimental para la síntesis de NPs-SSB usando la técnica de ablación láser de sólidos inmersos en líquidos.

Para la obtención de diferentes tamaños de nanopartículas la densidad de energía del láser depositado sobre el polvo debe ir cambiando; tal variación de energía se consigue ajustando la distancia de enfoque con respecto al polvo. Para la concentración se debe variar del tiempo de ablación.

Las condiciones para cada muestra se señalan en la **tabla 1**, en donde también se incluye el nombre de cada muestra que se determinó en función de los resultados del tamaño de nanopartícula analizados por Dispersión de Rayos X a Bajo Angulo (SAXS). Estos resultados se describirán a detalle dentro de la caracterización de las NPs.

**Tabla 1.** Condiciones de síntesis de cada muestra de NPs-SSB.

Condiciones	Nombre de las muestras			
	SSB-60	SSB-45	SSB-30	SSB-20
Agua destilada (mL)	28	28	28	28
Tiempo de ablación (min)	4	4	3	8
Altura (cm)	21	22	23	24
Frecuencia (Hz)	20	20	20	20
Energía (mJ)	130	130	130	130

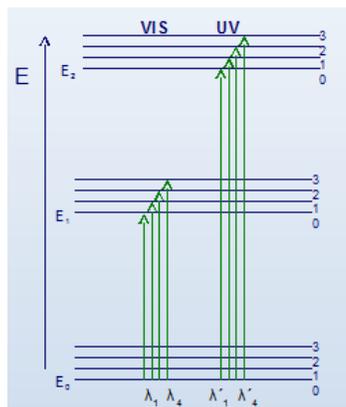
## 2. CARACTERIZACIÓN DE NPS-SSB.

### 2.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).

#### 2.1.1 Principio y Procedimiento.

*Principio.* El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, dentro del espectro UV-visible (UV cercano, de 200-

400 nm) y el visible (400-780 nm). Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), con esta técnica se puede determinar cuantitativamente una gran cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental,  $E_1$ , a un estado de mayor energía (estado excitado),  $E_2$ . Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula esto es, su espectro de absorción, constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental. (Figura 4)



**Figura 4.**Diagrama de niveles de energía en una molécula. La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado fundamental ( $E_1$ ) a otro excitado ( $E_2$ ) Tomado de [www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRÍA](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRÍA).

La ley de Lambert-Beer expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda) y concentración de un cromóforo en solución:

La absorbancia es directamente proporcional a su concentración (a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas), también depende de la distancia que recorre la luz por la solución, a igual concentración cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de  $\epsilon$ , una constante de proporcionalidad (denominada coeficiente de extinción) que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de  $\epsilon$  dependen de las de c y l. La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en metros (M), con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$  (Owen 2000; Ray, Lettiere et al. 2015).

$$A = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Para obtener una curva de calibración se preparan soluciones de diferentes concentraciones de un mismo compuesto, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a  $\lambda_{max}$ . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de abscisas (eje de x) y los de concentración en el eje de ordenadas (eje de y). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas, la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables. La representación de Lambert-Beer,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta (Owen 2000).

*Procedimiento.* Esta técnica se utilizó para determinar la concentración y obtener información química de las nanopartículas. Para la concentración, cinco muestras se prepararon usando el Láser Nd:YAG con una energía máxima de 130 mJ, a una distancia fija del lente de enfoque al polvo de 22 cm, mientras que el tiempo de ablación se aumentó de 2 a 7 min. La masa-peso de cada muestra se obtuvo después de evaporar el agua a 80°C durante 5 h. Cada muestra se colocó en el espectrofotómetro LAMBDA 650 UV/Vis/NIR (PerkinElmer®). La absorción UV-Vis de una de las bandas con un intervalo de longitud de onda de 280-295 nm, se correlaciona con la correspondiente masa-peso de las muestras preparadas en diferentes momentos ablación, siguiendo la ley de Lambert Beer.

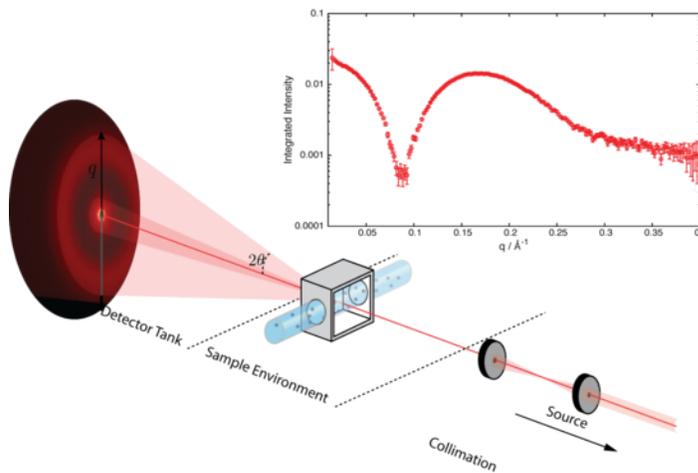
## **2.2 Dispersión de Rayos X a Bajo Ángulo (SAXS).**

### **2.2.1 Principio y Procedimiento.**

*Principio.* La dispersión de rayos X a bajos ángulos, o SAXS (Small Angle X-ray Scattering) es una técnica basada en analizar la dispersión de rayos X producida por un material al paso del haz, a ángulos menores a 5°. Con este perfil de intensidad es posible estudiar las características morfológicas y de empaquetamiento de partículas y estructuras en escala nanoscópica como forma, tamaño, orientación, distancia media entre partículas (Svergun, Feigin et al. 1987; Sen, Spalla et al. 2007).

Cuando un haz de fotones de rayos X atraviesa un medio, el haz interactúa casi exclusivamente con los electrones allí presentes. La figura 5 ilustra un esquema de la técnica. Cuando un haz de rayos X es una onda electromagnética que posee campos

eléctricos y magnéticos perpendiculares en la dirección de propagación del haz, al paso por los electrones, el campo eléctrico de estas ondas ejercerá una fuerza sobre ellos que los hará acelerar(Svergun, Feigin et al. 1987).



**Figura 5.** Esquema de la dispersión de rayos X a bajo ángulo. Tomado de X-rayUser(Copenhagen 2001).

El proceso de dispersión puede ser descrito como una resonancia de los electrones con frecuencia igual a la de los rayos X que están pasando por de ellos. Estos electrones remitirán ondas secundarias con la misma longitud de onda de la radiación incidente en todas las direcciones. Estas últimas irán a interferir unas con otras con las emitidas por otros electrones. El resultado final es una superposición de ondas dispersadas por diferentes electrones(Svergun, Feigin et al. 1987).

*Procedimiento.* Esta técnica permitió obtener un tamaño de partícula más representativo. Se usó un difractómetro de rayos X Ultima IV, Rigaku en el modo de transmisión SAXS. Cada una de las muestras se colocaron en capilares y en el

difractometro, se irradiaron con los rayos X. Los espectros obtenidos con el equipo fueron ajustados de acuerdo a la información del material a estudiar, tal como la densidad del material (SSB), la densidad del medio líquido en que se encontraban embebidas durante la medición (en este caso agua destilada). El procedimiento de ajuste se llevó a cabo utilizando el programa nanosolver.

## **2.3 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).**

### **2.3.1 Principio y Procedimiento.**

*Principio.* El microscopio electrónico de transmisión (TEM) utiliza un haz de electrones que es acelerado y enfocado sobre una muestra, de manera tal que al impactar con la misma genera señales directamente relacionadas su estructura y morfología. La interacción entre el haz incidente y los átomos de la muestra produce, entre otros, electrones dispersados, los cuales son captados por un detector para construir una imagen en dos dimensiones. El proceso de formación de una imagen de TEM involucra electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la que hizo incidir un haz de electrones coherentes. De acuerdo a la interacción que se produzca entre el haz de electrones y la muestra al atravesar ésta los electrones se pueden clasificar en electrones no desviados, electrones desviados elásticamente y electrones inelásticos. Los electrones no desviados y desviados elásticamente son los responsables de la formación de la imagen en TEM, mientras que una fracción de electrones inelásticos, los cuales ceden energía a la muestra al incidir sobre ella, provocan el ruido de fondo presente en las imágenes de TEM. Por otra parte, mediante esta microscopía se puede obtener información acerca del

patrón de difracción de electrones de la muestra. Esto se debe a que se producen interferencias en el frente de las ondas transmitidas por la muestra, las cuales son refractadas por una lente en el plano focal posterior originando una imagen de difracción.

El microscopio electrónico utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones generados por un filamento de tungsteno, el cual es acelerado por la aplicación de un voltaje de 100 kV o más y que es dirigido a través de la muestra mediante diferentes lentes electromagnéticas. Los electrones atraviesan la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente objetivo, para luego amplificarse en un lente y construir una imagen del objeto. Las muestras a observar por esta técnica deben poseer espesores menores a 200 nm. El TEM presenta dos ventajas con respecto a otras microscopías: primero, posee un factor de magnificación de 50 a 106, y segundo, posee la capacidad de proporcionar una imagen e información acerca del patrón de difracción de la muestra en una misma medida (Cao and Wang 2011).

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se construyen mediante el contraste de fase de la onda de los electrones (Spence 2003). Este es producido por la interferencia de las fases de las ondas de los electrones incidentes cuando son transmitidos a través de la estructura cristalográfica de la muestra. Lamentablemente no se puede medir la fase de onda pero sí la modulación resultante de esta interferencia causada por los electrones, ya que lleva información acerca de la muestra y puede generar un contraste en la imagen. La resolución del microscopio alcanza valores de 0.2 nm. Los datos que proporciona el HRTEM son complementarios a los datos de difracción de electrones, brindando información cristalográfica de una muestra a escala

atómica. Mediante esta técnica se puede obtener información cualitativa acerca del ordenamiento y la estructura atómica de la muestra, lo que resulta muy útil para el estudio de nanoestructuras(Kumar, Hormes et al. 2005; Cao and Wang 2011).

*Procedimiento.* Esta técnica permitió analizar forma, tamaño y cristalografía de las NPs-SSB. El equipo empleado para la caracterización de las NPs-SSB fue el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 de JEOL (Tokio, Japon) operado a un voltaje de 80 kV. Se colocaron 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico y 500  $\mu$ L de la muestra de NPs, homogenizada la muestra, una gota de la muestra fue colocada en una rejilla de cobre (200 mesh) recubierta con una película de grafito, y se dejó secar durante un día, posteriormente fueron colocadas en el TEM para la obtención de las imágenes.

Por otro lado, el TEM también se utilizó para realizar el análisis del ingreso de 60 $\mu$ g/mL de las NPs a las células HGF-1 posterior a 24 h de tratamiento, la preparación de las células con las NPs se explicará en la sección de evaluación de citotoxicidad *in vitro*.

## **2.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS).**

### **2.4.1 Principio y Procedimiento**

*Principio.* Mediante esta técnica se determinó el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en dispersión y la distribución de tamaños. Las nanopartículas en dispersión presentan un desplazamiento aleatorio conocido como movimiento browniano. Cuando un haz de luz incide sobre las nanopartículas, este es dispersado y su intensidad fluctúa dependiendo del movimiento browniano de las partículas. En consecuencia, se

produce una medición global de las partículas perpendiculares a la fuente de luz. De esta manera se obtiene un radio hidrodinámico o diámetro calculado mediante varios algoritmos matemáticos derivados de la ecuación Stokes-Einstein.

El láser monocromático de helio-neón utiliza una fuente de luz a una longitud de onda de 633 nm. El haz de luz incide sobre la muestra y las partículas dispersan la luz en todas las direcciones; sin embargo, solo se recoge la que tiene un ángulo de 90. La información de intensidad nos da un sesgo hacia las partículas de gran tamaño debido a que la dispersión de la luz es miles veces mayor a la de las partículas de menor tamaño. Este sesgo es considerado al ingresar el índice de refracción del material y el valor de la absorbancia. A partir de esta información, el programa ajusta la distribución del tamaño por volumen o por número. Es necesario tener en cuenta parámetros como la temperatura y la viscosidad del disolvente ya que esto puede modificar las interacciones de la partícula con el medio en el que se encuentra (Berne and Pecora 2000; McNeil 2011).

Velocímetro Laser-Doppler (LDV).

*Principio.* Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern. La importancia del potencial zeta es: que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión. Para evaluar el potencial zeta o electrocinético de un sistema disperso, utilizamos se utiliza la técnica de LDV que permite ver la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria del fluido

que se presenta unida a la partícula dispersada. Para esto se evalúa la velocidad con la que las partículas migran hacia el electrodo de carga opuesta, que se conoce como movilidad de partículas, la cual puede ser convertida a potencial z al conocer la viscosidad del dispersante y aplicar la teoría de Smoluchowski. Los valores positivos y negativos indican que la dispersión es estable y que por lo tanto la agregación es poco probable. Sin embargo, un valor absoluto bajo nos indica la tendencia de la dispersión a agregarse(Hunter 2013).

*Procedimiento.* El instrumento utilizado para las técnicas de DLS y LDV fue el Zetasizer Nano-ZS 3000Hsa de Malvern (Reino Unido), este instrumento utiliza un software de tecnología de dispersión versión 6.32 de Malvern para la lectura de muestras y análisis. Se consideró el índice de refracción del SSB (1.85) para la medición de las muestras. Se homogenizo y se colocaron 1 mL en una cubeta desechable de volumen bajo para las mediciones del tamaño e igualmente 1 mL en una celda transparente para la medición del potencial z. Se realizaron 5 mediciones con 10 corridas para las mediciones del tamaño, mientras que para el potencial z se realizaron 5 mediciones con 10 corridas cada una.

## **2.5 Difracción de Rayos X (XRD).**

### **2.5.1 Principio y Procedimiento.**

*Principio.* Es una técnica analítica primaria, no destructiva, utilizada para identificar las fases de un material cristalino y propiedades estructurales como tamaño de grano, dimensiones de la celda unitaria, distancias interplanares, entre otras. La difracción de rayos X se basa en la interferencia constructiva de rayos X monocromáticos y una muestra

cristalina, los rayos x son generados por un tubo de rayos catódicos, filtrados para producir radiación monocromática y luz colimada para concentrarse de esta forma se dirige el haz de rayos X hacia la muestra (Warren 1990).

La interacción del haz de rayos X y un cristal, provoca que el haz se divida en varias direcciones, dando lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse aplicando la ley de Bragg ( $n\lambda = 2d \sin \theta$ ). Esta ley relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética en el ángulo de difracción y la red de la muestra cristalina. Los rayos X difractados son detectados, procesados y sus intensidades son medidas, de esta forma indica la ubicación de los átomos en el cristal (Warren 1990). Para analizar un polvo cristalino, se puede escanear la muestra a través de un rango de ángulos  $2\theta$  (0 a  $360^\circ$ ) de esta manera el haz monocromático incide sobre la muestra. Cuando un determinado plano es capaz de desviar los rayos de manera que cumplan la ley de Bragg se produce una mancha o un pico en el patrón de difracción, todos los picos y su intensidad fueron analizados para conocer la estructura cristalina, lo que permitió identificar el patrón de difracción de SSB.

*Procedimiento.* Se utilizó un difractómetro Rigaku Ultima IV (Cuk $2$  1.5406 Å) con una medición de 5 a  $35^\circ$  y un tamaño de paso de  $1^\circ$  por minuto para el análisis tanto del polvo de SSB como de las NPs- SSB. Se colocaron en dos portamuestras de vidrio dejándose secar a  $60^\circ\text{C}$  durante 24 h. Los portamuestras se introdujeron en el equipo. Los patrones de difracción fueron obtenidos y se analizaron tomando como referencia las cartas cristalográficas para encontrar a que fase correspondían del SSB y comparar tanto el polvo como las NPs.

### **3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE NPs-SSB.**

#### **3.1 Cultivos bacterianos.**

##### **3.1.1 Bacterias aerobias.**

Las cuatro especies aerobias utilizadas se adquirieron como cultivos liofilizados de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) (Tabla 2). Las bacterias fueron crecidas en agar enriquecido TSA (Trypticase Soya Agar BBL®) suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, (vitamina K, Sigma-Aldrich)), 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich) a 34°C en una incubadora felisa durante 24 a 48 h. Cada una de las cepas fue propagada y transferida hasta obtener cultivos puros y una vez que se obtuvieron, cada cepa bacteriana se recogió y se suspendieron en tubos individuales con medio de cultivo TSB enriquecido (Trypticase Soya Broth, BBL®) con 0.3 µg/mL de menadiona (Sigma-Aldrich) y 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich).

##### **3.1.2 Bacterias anaerobias.**

Las bacterianas anaerobias utilizadas se adquirieron como cultivos liofilizados de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) (Tabla 2). Las bacterias fueron crecidas en agar enriquecido HK (agar base para *Mycoplasma*, Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, (vitamina K, Sigma-Aldrich)), 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich) y 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México) a 34°C en una cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products Inc., Michigan USA) en

condiciones atmosféricas de 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, durante 7 días. Cada una de las cepas fue propagada y transferida hasta obtener cultivos puros siguiéndose el mismo protocolo que en bacterias aerobias. La densidad óptica (D.O.) de cada tubo fue ajustada a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm para obtener 1x10<sup>9</sup> células/mL. Se transfirieron 20 µL de cada tubo ajustado a D.O. = 1 a microplacas de 96 pozos.

**Tabla 2.** Especies bacterianas utilizadas en pruebas de actividad antibacterial de NPs-SSB.

Espece (Gram)	ATCC*	Infecciones
<i>Actinomyces israelii</i> (+)	12102	Bucales
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b (-)	43718	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (-)	33624	
<i>Eikenella corrodens</i> (-)	23834	
<i>Fusobacteriumnucleatum</i> (-)	25586	
<i>Parvimonas micra</i> (+)	33270	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (-)	33277	
<i>Prevotella intermedia</i> (-)	25611	
<i>Streptococcus mutans</i> (+)	10556	
<i>Streptococcus sanguinis</i> (+)	25175	
Espece (Gram)	ATCC*	Infecciones
<i>Escherichia coli</i> (-)	33780	Médico/ Hospitalarias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	43636	
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	25923	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	14990	

\*American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)

### 3.2 Ensayo de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT).

#### 3.2.1 Principio y Procedimiento.

*Principio.* Es un método colorimétrico para determinar viabilidad celular y en los últimos años se ha utilizado para medir la viabilidad bacteriana. El reactivo de XTT contiene una sal de tetrazolio (2,3-bis [2-Metoxi-4-nitro-5-sulfofenil] 2H-tetrazolio-5-carboxianilida, sal interna) y PMS, un reactivo de acoplamiento de electrones (N-metildibenzopyrazine sulfato de metilo), que se combina con XTT para formar una solución estable. La reducción del compuesto de XTT se produce en la superficie celular facilitada por el sistema de transporte de electrones (ETS) que se lleva a cabo gracias a la conversión realizada por NADPH o NADH producidas por las enzimas oxidoreductasas. El PMS media la reducción de XTT al tomar los electrones en la superficie celular, formando un compuesto intermedio que reduce la sal de tetrazolio a formazan (Sigma-Aldrich 2010). En las bacterias, la respiración puede proporcionar una medida adecuada de la actividad metabólica de células y dar información sobre los efectos de diferentes condiciones sobre la viabilidad celular. Las bacterias con un ETS activo reducen estos colorantes redox a formazan (Roslev and King 1993).

*Procedimiento en bacterias aerobias.* Se colocaron dosis únicas de cada muestra de NPs: SBB-60, SSB-45, SSB-30 y SBB-20, (32.9, 27, 17, 34.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) en cada pozo con bacteria, usando agitación orbital a 160 rpm durante 24 h. Los grupos control fueron el medio de cultivo TSB enriquecido como control negativo y como control positivo, ciprofloxacina (180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Para medir el efecto antibacteriano de las NPs-SSB, se utilizó el kit comercial de Sigma-Aldrich (*In Vitro Toxicology Assay Kit XTT based*). Una vez transcurridas las 24 h de

tratamiento con NPs-SSB, se añadió 20µL del reactivo. La incubación se realizó en la oscuridad durante 2 h a 37°C y después del periodo de incubación se midió la absorbancia a 450 nm con referencia de 690 nm en un espectrofotómetro para microplacas FilterMax F5 (Molecular Devices, USA). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado cada uno.

La efectividad antibacteriana de las NPs-SSB fue expresada como porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Efectividad Antibacteriana} = \left( \frac{A1 - A2}{A1} \right) \times 100$$

Dónde:

A1= Absorbancia a 450 nm de pozos con bacteria en medio de cultivo (control negativo).

A2= Absorbancia a 450 nm en presencia de bacteria e inhibidor de crecimiento; Antibiótico (control positivo) o NPs-SSB.

*Procedimiento en bacterias anaerobias.* Se colocaron 5 diferentes concentraciones de la muestra de SBB-20a (21.7, 15.4, 7.7, 3.8 y 1.9 µg/mL) en cada pozo con agitación orbital a 160 rpm durante 24 h para observar los cambios en el crecimiento bacteriano. Los grupos control fueron el medio de cultivo TSB enriquecido como control negativo y como control positivo, ciprofloxacina (180 µg/mL).

Para medir el efecto antibacteriano de las NPs-SSB, se utilizó el mismo kit comercial de Sigma-Aldrich (In Vitro Toxicology Assay Kit XTT based). Una vez transcurridas las 24 h de tratamiento las NPs-SSB, se añadió 20 µL del reactivo. La incubación se realizó en la oscuridad durante 2 h a 37°C dentro de la cámara de anaerobiosis y después del

periodo de incubación se midió la absorbancia a 450 nm con referencia de 690 nm en un espectrofotómetro para microplacas FilterMax F5 (Molecular Devices, USA). De igual manera se hicieron tres experimentos independientes por triplicado cada uno. Para reportar el efecto antibacteriano se usó la ecuación anterior.

#### **4. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NPS-SSB.**

##### **4.1 Cultivo Celular.**

Se utilizó la línea celular de fibroblastos gingivales humanos HGF-1 (por sus siglas en inglés, Human Gingival Fibroblast)(ATCC® CRL2014™). Este tipo de células son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos dentro del área odontológica. Para su cultivo, se respetaron las especificaciones de la ATCC. Las células fueron cultivadas en cajas de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup> con medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron a 37°C en la incubadora bajo una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue cambiado rutinariamente cada 5 días para el mantenimiento de las células.

Alcanzada una confluencia de aproximadamente 80% se procedió al subcultivo, que es el traspaso de las células a nuevos frascos de cultivo hasta que se obtuvieron la cantidad de células necesarias para los ensayos (134,400 células aprox.). Para determinar el número de células vivas, una alícuota de la suspensión celular se tiñó al añadir una solución de azul de tripano al 0.4% en proporción 1:1. Se colocaron 10 µL en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer) y se observaron con el microscopio óptico. Para

los experimentos se sembró una densidad de  $2 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  en cada pozo de 3 de placas de 96 pozos e incubándose por 12 h.

## **4.2 Ensayos de actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH).**

### **4.2.1 Principio y Procedimiento.**

*Principio.* Para la determinación de la viabilidad celular, se utilizó el ensayo colorimétrico basado en la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH), la cual es una enzima citoplasmática que es liberada cuando la membrana celular se encuentra comprometida, es decir que no cumple sus funciones de delimitar la célula ya que presenta poros o está dañada por lo que las células están dañadas o lisadas. Esta técnica permite medir la actividad de la enzima LDH en medio de cultivo libre de células. La medición se realiza gracias a una reacción enzimática redox (óxido-reducción), que empieza con la presencia de LDH que permite la conversión de lactato a piruvato en una reducción paralela de NADH/H<sup>+</sup> mediante el catalizador (diaforasa) transfiere el 2H a la sal de tetrazolio (cloruro de yodo-nitrotrifeniltetrazolio o INT), de color amarillo, reduciéndola a formazan, de color rojo con una absorbancia de 450 nm.

El incremento en la actividad enzimática de la LDH en el sobrenadante del medio de cultivo indica daño celular y es proporcional a la cantidad de formazan formado durante el periodo de incubación (Roche 2011).

El porcentaje de liberación de LDH, fue expresado como el porcentaje de citotoxicidad de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \left( \frac{A1 - A2}{A3 - A2} \right) \times 100$$

Dónde:

A1= Absorbancia a 450 nm de células con NPs-SSB

A2= Absorbancia a 450 nm en presencia de células y medio de cultivo (control negativo)

A3= Absorbancia a 450 nm en presencia de células y solución de Triton X-100 (control positivo)

*Procedimiento.* Para medir la actividad de la enzima LDH se utilizó el kit comercial Cytotoxicity Detection Kit (Roche). Sembradas la densidad celular ( $2 \times 10^4$ ) en cada pozo se colocaron diferentes cantidades de NPs-SSB (3.5, 7.5, 15, 30 y 60  $\mu\text{g/mL}$ ). Transcurridas 24 h de tratamiento con las NPs-SSB, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo libre de células de cada pozo y se colocaron en otra placa de 96 pozos y se les añadió 50  $\mu\text{L}$  del reactivo, formado por 250  $\mu\text{L}$  de catalizador y 11.25  $\mu\text{L}$  de la sal de tetrazolio. La incubación se realizó en la oscuridad durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  y después del periodo de incubación se midió la absorbancia a 490 nm con referencia de 650 nm en un espectrofotómetro para microplacas Infinite 200 Pro de TECAN (San José California, Estados Unidos).

Para evaluar las interferencias de las NPs con los reactivos se utilizaron controles de medio de cultivo con y sin NPs-SSB, como control positivo de muerte celular se utilizó 0.1% de Triton X-100. Los controles y las muestras fueron tratados de la misma manera y por triplicado haciendo tres experimentos independientes. Los resultados se

expresaron como porcentaje de citotoxicidad comparado con el control negativo como cero % de citotoxicidad.

### **4.3 Actividad mitocondrial a través del metabolismo de las sales de tetrazolio (MTS).**

#### **4.3.1 Principio y Procedimiento.**

*Principio.* Es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El reactivo de MTS contiene una sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (fenil 3-carboximetil) -2- (4-sulfofenil) 2H-tetrazolio, sal interna) y un reactivo de acoplamiento de electrones (fenazinaetosulfato; PES) que permite que se puede combinar con MTS para formar una solución estable. El compuesto de la sal de tetrazolio MTS es producida por células en formazan que es soluble en medio de cultivo. La conversión de es realizada por NADPH o NADH producidas por las enzimas deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas, por lo que es un indicador de integridad de las mitocondrias y su actividad funcional después de la exposición a un compuesto (Promega 2012).

El porcentaje de actividad mitocondrial fue expresado como porcentaje de viabilidad celular de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ Celular\ (\%) = \frac{(A1)(A2)}{A3}$$

Dónde:

A1= Absorbancia a 490 nm de células con NPs-SSB

A2= Absorbancia a 450 nm en presencia de células y medio de cultivo (control negativo)

A3= Absorbancia a 450 nm en presencia de células y CCCP (control positivo)

*Procedimiento.* Para evaluar la actividad mitocondrial se utilizó el kit comercial de MTS (CellTiter 96®, Promega) el cual fue preparado en una proporción de 2:10. Después de haber sembrado una densidad de  $2 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  en cada pozo de 3 cajas de 96 pozos, el reactivo fue añadido a las células posterior al tratamiento de 24 h con las NPs-SSB (3.5, 7.5, 15, 30 y 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células con el reactivo fueron incubadas por 3 h a  $37^\circ\text{C}$  y después de ese tiempo la absorbancia fue determinada a 490 nm con referencia de 650 nm en un espectrofotómetro para microplacas Infinite 200 Pro de TECAN (San José California, Estados Unidos).

Para evaluar las interferencias de las NPs con los reactivos se utilizaron controles de medio de cultivo con y sin NPs-SSB, como control positivo de muerte celular se utilizó 600  $\mu\text{L}$  de Carnonilcianide m-clorofenilhidrazona (CCCP). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular comparado con el control negativo como el 100 % de viabilidad.

#### **4.4 Internalización de NPs-SSB en fibroblastos gingivales humanos HGF-1 por TEM.**

##### **4.4.1 Procedimiento.**

Para el análisis del ingreso de las NPs a las células HGF-1 se siguió el siguiente protocolo. Las células HGF-1 se sembraron en una caja de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  con una densidad  $2 \times 10^4$ , incubadas por 24 h. Después, se añadieron las SSB-NPs dentro de la caja de cultivo y se incubaron durante 24 h.

Las células fueron lavadas tres veces con PBS para retirar el medio y las NPs que no ingresaron a las células. Para la fijación se utilizó glutaraldehído al 2.5% en PBS que permite la preservación de la muestra biológica evitando procesos autolíticos. La incubación con glutaraldehído fue por una hora y posteriormente se recolectaron las células en tubos individuales de 1.6 mL, centrifugándose a 5 rpm durante 3 min para obtener un paquete celular.

Obtenida la muestra, se realizaron tres lavados con PBS y después se añadió tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) el cual reacciona principalmente con moléculas lipídicas formando un precipitado opaco como medio de contraste, esta incubación se realizó por 1 hora a temperatura ambiente en una campana extractora, posteriormente fue eliminado y lavado 3 veces con PBS y se conservan en refrigeración a 4°C por lo menos por 12 h.

Posteriormente, se realizó la deshidratación de la muestra utilizando etanol en series, con lavados de etanol en diferentes porcentajes, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%; cada uno por 10 min. La última incubación fue con etanol puro (100%) por 15 min x 3 veces. Para la infiltración con resina, se preparó la muestra utilizando una mezcla de acetona con resina Spurr. Primero, se colocó la muestra en esta mezcla con una relación 1:1 durante dos horas. Transcurrido el tiempo se eliminó la mezcla de la muestra y para la inclusión, se añadió resina pura que se dejó polimerizar durante toda la noche a 60°C.

Una vez que las muestras fueron procesadas, se realizaron cortes de 70 y 80 nm de grosor usando un ultramicrotomo, Leica U6. Posteriormente, se colocaron los cortes en

portamuestras y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser examinadas en el TEM.

## **VI. ANALISIS ESTADÍSTICO.**

Todas las mediciones que se realizaron para la caracterización de las nanopartículas, fueron expresadas como la media (ME)  $\pm$  la desviación estándar (DE).

Los resultados de actividad antibacteriana se presentan como la media (ME)  $\pm$  desviación estándar, en porcentajes de efectividad antibacteriana (% inhibición).

Los resultados de ensayos de citotoxicidad se presentan como la media (ME)  $\pm$  desviación estándar (DE), en porcentajes de citotoxicidad.

Los análisis para determinar las diferencias entre las mediciones realizadas se llevaron a cabo usando la prueba de ANOVA y como prueba de rango múltiple post hoc el análisis de Bonferroni para determinar diferencias significativas.

## VII. RESULTADOS.

Las muestras sintetizadas de NPs-SSB (tabla 3) se utilizaron para los ensayos biológicos *in vitro*. Las muestras SSB-60, SSB-45, SSB-30 y SSB-20 se utilizaron para evaluar la actividad antibacteriana en especies aerobias (importancia médica). La muestra SSB-20a se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana en especies anaerobias (importancia bucal) y la muestra SSB-20b para evaluar la citotoxicidad en fibroblastos gingivales.

**Tabla 3.** Muestras sintetizadas de NPs-SSB y usadas en ensayos biológicos *in vitro*.

Nombre de las muestras obtenidas						
Características	SSB-60	SSB-45	SSB-30	SSB-20	SSB-20a	SSB-20b
Tamaño de partícula (nm)	58	45	31	22	22	22
Concentración (µg/mL)	183	150	95	193	121	376

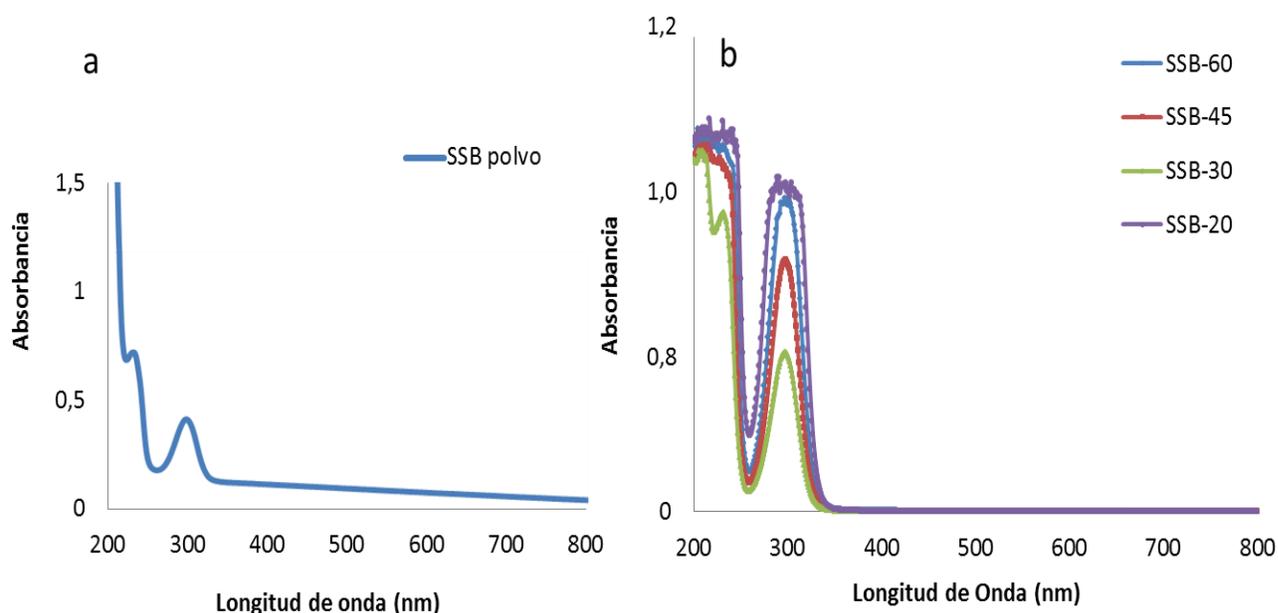
### 1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPS-SSB.

#### 1.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).

La espectroscopía UV-Vis se utilizó para obtener información de la composición química y la concentración de cada una de las muestras de NPs-SSB (**Tabla 3**). Se hizo un análisis químico junto con una curva de calibración obteniéndose los siguientes resultados.

La **figura 6a** muestra el espectro obtenido del polvo de SSB disperso en agua y la **figura 6b**, muestra el espectro de absorción de las NPs-SSB (SSB-60, SSB-45, SSB-30, SSB-

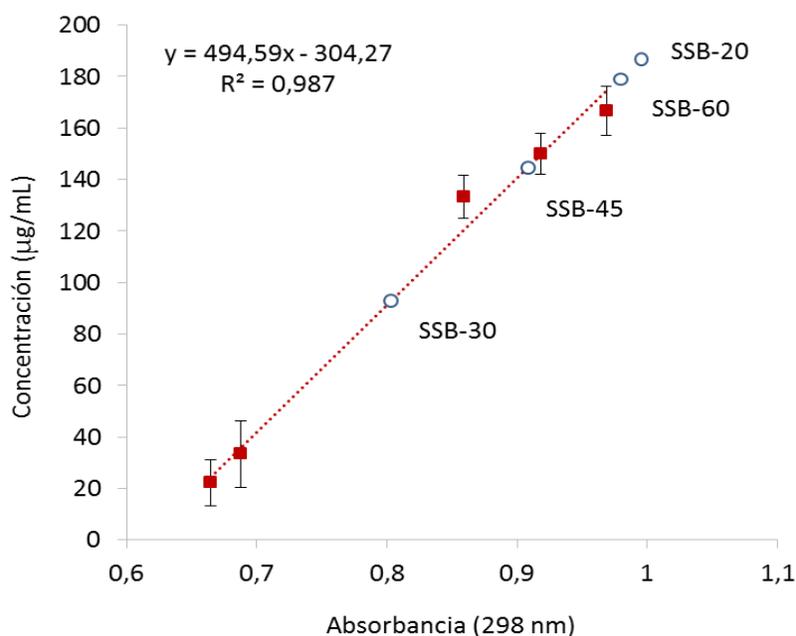
20). El espectro indica la presencia de dos bandas de absorción electrónica 234-237 y 296-303 nm en función del medio, siendo esta última la más estable y característica. Ambas bandas corresponden a los grupos funcionales asociados al ácido salicílico presentes dentro de la estructura química del SSB (Ernst 1963; Dibbern 1978).



**Figura 6.** (a) Espectro UV-Vis del polvo disperso en agua destilada. (b) Espectro UV-Vis de las NPs-SSB dispersas en agua destilada como producto de la ablación laser. Ambos espectros indican la presencia de dos bandas que corresponden a la presencia de grupos salicilatos de la estructura del SSB.

Con respecto a la curva de calibración (**figura 7**), las cinco muestras utilizadas para determinar la concentración se muestran como cuadrados rojos. Se puede observar una buena correlación lineal ( $R^2 = 0.987$ ), la ecuación de la recta permite la estimación de correlacionar la intensidad de la absorción con la concentración del SSB. La intensidad de absorción de las muestras SSB-20, SSB-30, SSB-45, y SSB-60 que se muestra en la **figura 6b**,

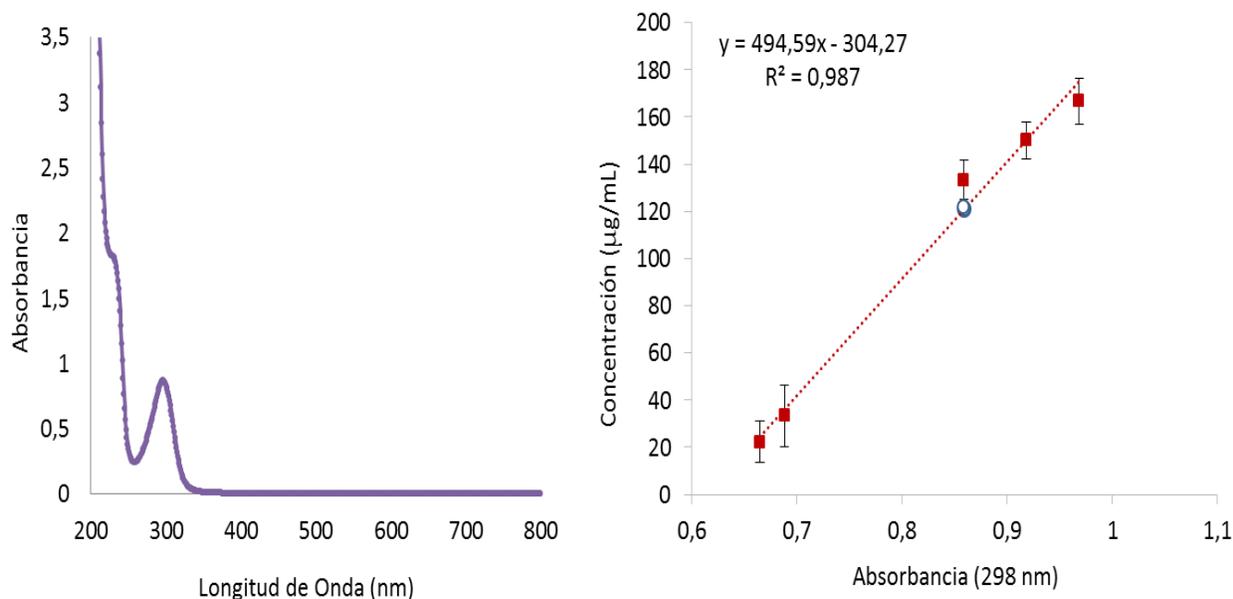
se indican también en la **figura 7** como círculos azules. Por lo tanto se pudo obtener las concentraciones de cada una de las muestras: SBB-20: 193 µg/mL, SSB-30: 95 µg/mL, SSB-45: 150 µg/mL y SSB-60: 183 µg/mL.



**Figura 7.** Curva de calibración obtenida de los valores de absorción de la banda 280-295 nm en relación a la concentración en µg/mL de muestras de NPs-SSB con diferentes tiempos de ablación laser (círculos rojos). Las muestras usadas en ensayos biológicos *in vitro* se indican como círculos azules.

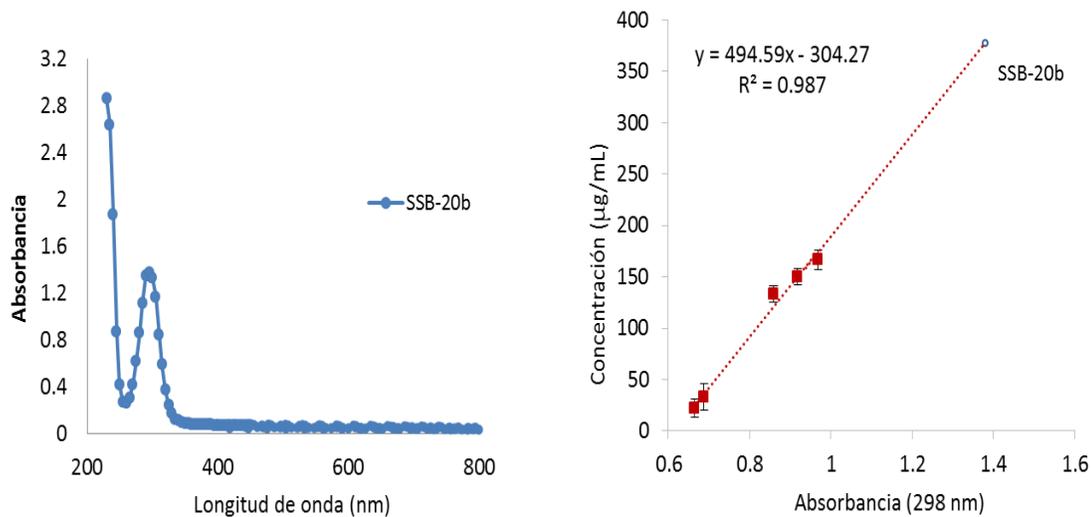
Una vez que se analizaron las primeras muestras (SSB-20, SSB-30, SSB-45, y SSB-60) y se obtuvieron los resultados en las bacterias aerobias (explicados más adelante), se decidió continuar trabajando para el resto de los ensayos biológicos *in vitro* con las NPs sintetizadas bajo las mismas condiciones que la muestra SSB-20, es decir respetando la distancia del spot para obtener el mismo tamaño de NPs de 22 nm, excepto que el tiempo

de ablación se redujo a 6 min (SSB-20a). La caracterización por espectroscopía UV-Vis de esta nueva síntesis se muestra en la **figura 8**. Se obtuvo una absorbancia de 0.85897 a 298 nm de por lo que se determinó que la concentración fue de 121  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 8.**(a) Espectro UV-Vis de NPs-SSB dispersas en agua destilada (muestra SSB-20a) (b) Curva de calibración en donde se localiza la concentración de la muestra SSB-20a (121  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Finalmente, para los ensayos de citotoxicidad con fibroblastos gingivales humanos se utilizó la muestra SSB-20b, en la cual se modificó el tiempo de ablación láser a 12 min. El espectro UV-Vis mostró una absorbancia de 1.37202 a 298 nm por lo que la concentración de la muestra fue de 376  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**figura 9**).

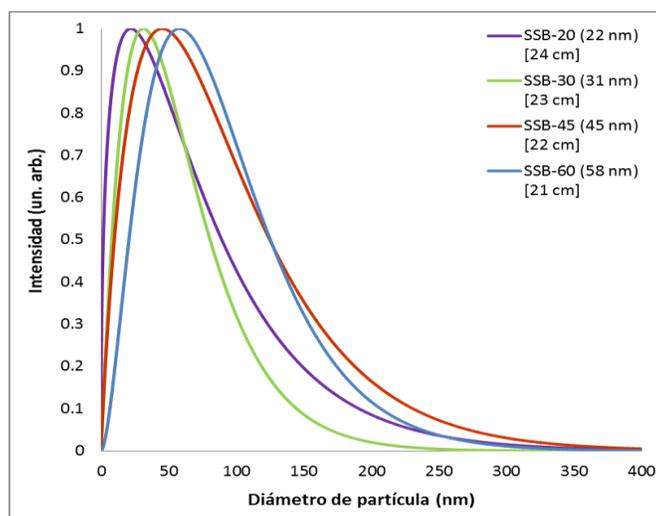


**Figura 9.**(a) Espectro UV-Vis de NPs-SSB dispersas en agua destilada (muestra SSB-20b) (b) Curva de calibración en donde se localiza la concentración de la muestra SSB-20b (376 µg/mL (punto azul)).

## 1.2 Dispersión de Rayos X de bajo ángulo (SAXS).

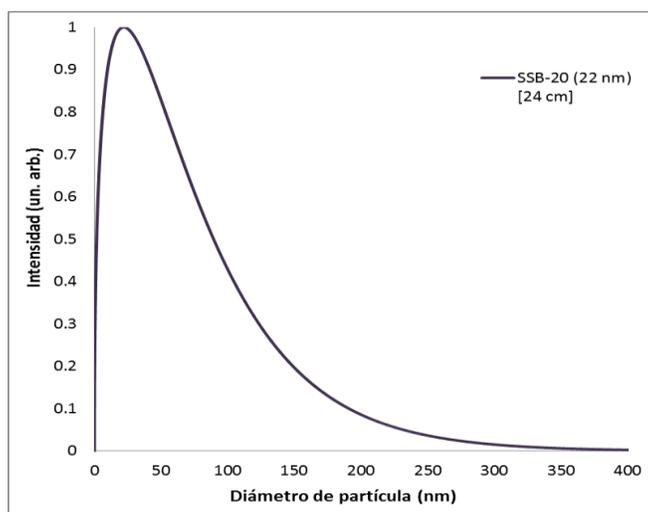
De las mediciones realizadas por SAXS se obtuvo información importante acerca de la forma y los tamaños de las nanopartículas presentes en cada muestra. Los resultados obtenidos directamente del equipo fueron tratados en el programananosolver.

La **figura 10** muestra la variación del tamaño más probable de las NPs-SSB (obtenido con el ajuste de los datos de SAXS) de las primeras 4 muestras sintetizadas por ablación laser. Esta figura muestra la tendencia de que, al aumentar la distancia del lente, disminuye el tamaño. También es posible observar que la distribución de tamaño de algunas muestras es más estrecha que en otras (curvas donde la distancia en la altura media del pico es menor), y que a su vez siguen una tendencia con respecto a la distancia del lente de enfoque.



**Figura 10.** Distribución de tamaño de las muestras de NPs-SSB en agua destilada obtenida por SAXS. La nomenclatura de cada muestra se estipuló en base a los resultados del tamaño encontrado (nm), seguido de la distancia del lente de enfoque de cada experimento [cm].

En la **figura 11** se muestra la distribución de tamaño de la muestra de nanopartículas SSB-20a en la cual se observa la misma distribución de tamaños que la muestra SSB-20.

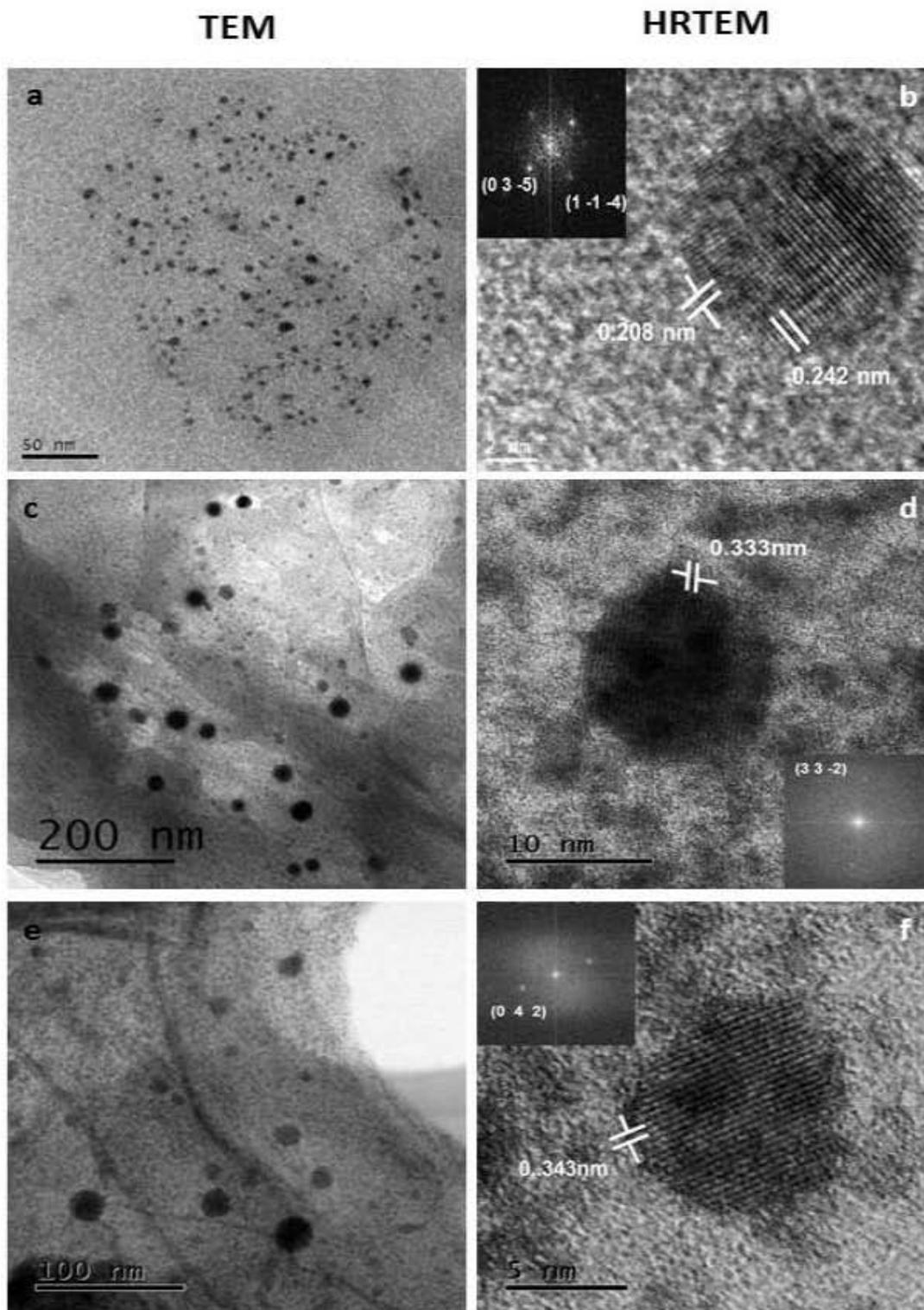


**Figura 11.** Distribución de tamaño de la muestra SSB-20a en agua destilada obtenida por SAXS. La nomenclatura de la muestra se estipuló en base a los resultados del tamaño encontrado (nm), seguido de la distancia del lente de enfoque de cada experimento [cm].

### 1.3 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

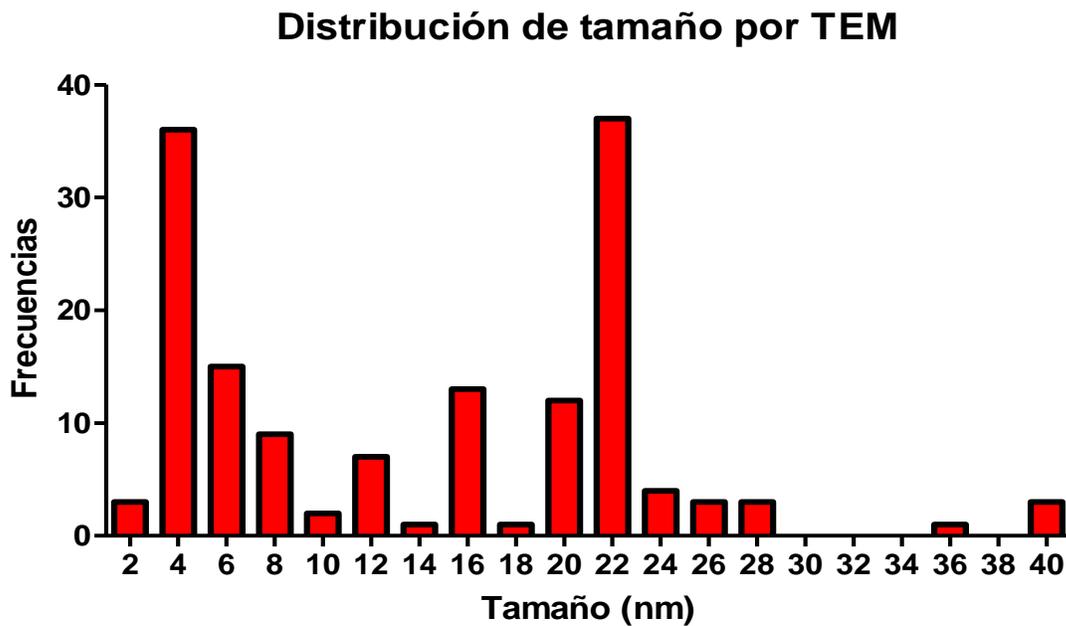
En la **figura 12a** podemos observar que las NPs-SSB (SSB-20), son de morfología semicircular en una amplia gama de tamaños de partícula. La imagen de TEM de alta resolución que se muestra en la **figura 12b** indica que las nanopartículas presentan estructura cristalina lo que permitió medir el espacio interplanar de las nanopartículas. Las distancias interplanares fueron 0.208, 0.242 nm correspondiente a la (0-3-5) y (1-1-4) planos de la estructura del SSB respectivamente, como se informa en las cartas cristalográficas (7001563 y 7001555).

Las **figuras 12 b y c** corresponden a micrografías de la muestra SSB-20b en donde se pueden observar que las nanopartículas tienen forma semicircular y hay una amplia variedad de tamaños. También se obtuvieron imágenes por TEM de alta resolución (**figura 12e y f**) en donde se muestra que bajo las mismas condiciones de síntesis, las nanopartículas siguen presentando estructura cristalina permitiendo medir las distancias interplanares que fueron 0.343 y 0.333 nm que corresponden a los planos (2-1-4) y (3-3-2). De esta manera se valida que las nanopartículas obtenidas por ablación láser son de SSB.



**Figura 12.** Imágenes de NPs-SSB obtenidas por TEM JEOL 1400 (Tokio, Japón) de las muestras SSB-20(a) y SSB-20b(c,e), donde se observa una amplia distribución de tamaños y morfología semicircular. En las imágenes de alta resolución de NPs-SSB (b,d,f) donde se observa estructura cristalina que corresponde al SSB.

En la **figura 13** se presenta el histograma de la medición de tamaño de 150 partículas obtenidas de las micrografías de TEM de la muestra SSB-20b. Se puede observar una distribución de tamaño diversa, destacándose partículas de 4 y 22 nm como los tamaños más presente en la muestra.



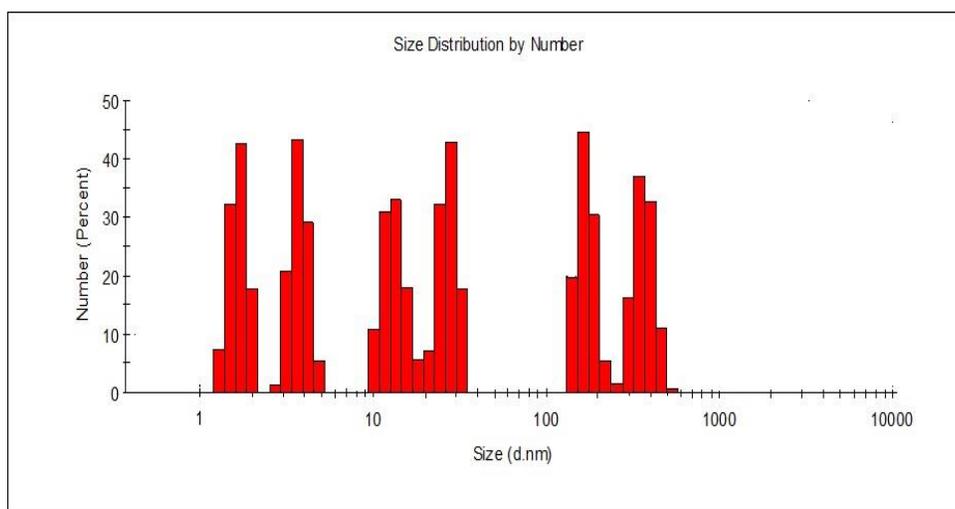
**Figura 13.** Distribución de tamaño de NPs por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

#### 1.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Velocímetro Laser-Doppler (LDV)

Esta técnica se utilizó para obtener información sobre el tamaño hidrodinámico y del comportamiento de las nanopartículas en el medio dispersante (agua destilada).

La **figura 14** y la **tabla 4** indican las mediciones realizadas por LDS. Se puede observar la distribución de diferentes diámetros hidrodinámicos entre 1.2 y 394 que conforman a la

muestra de NPs-SSB (SSB-20b). Se observa además que las NPs-SSB en agua destilada forman diferentes poblaciones de nanopartículas, indicando que la muestra es heterogénea dado que el índice de polidispersión (PDI) fue de 1.0 es decir, presenta un alto grado de polidispersión.

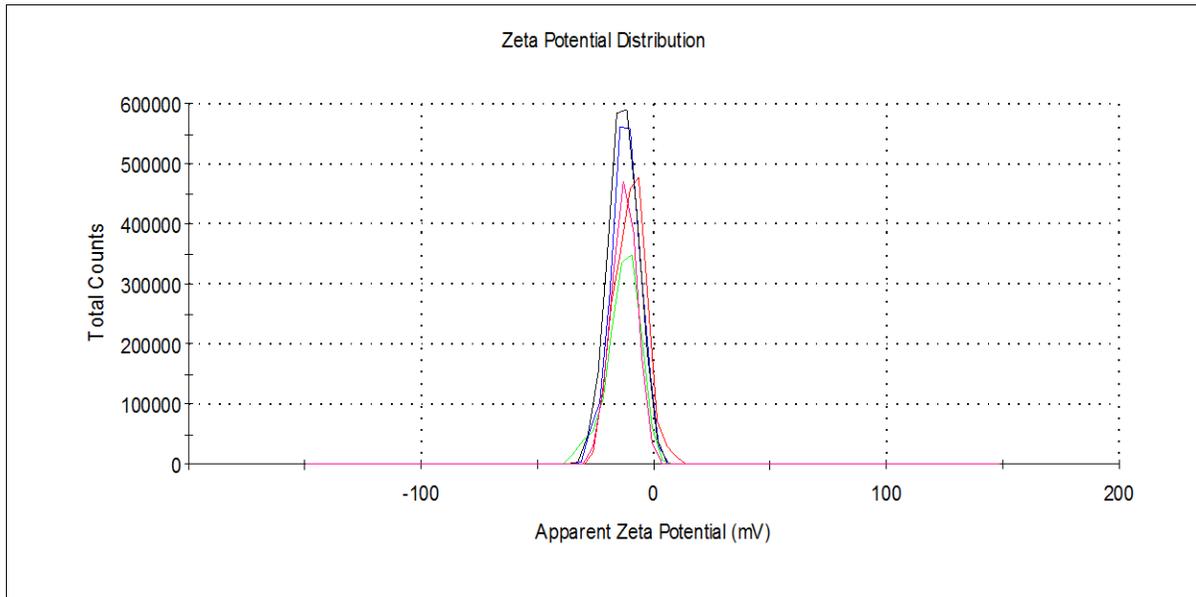


**Figura 14.** Distribución de tamaño de la muestra de nanopartículas SSB-20b en agua destilada, donde se muestran diferentes poblaciones entre 1.7 y 531 nm.

**Tabla 4.** Tamaño hidrodinámico y porcentajes de cada población de NPs-SSB por DLS.

Tamaño hidrodinámico (nm)					
Record 1: (nm),(%)	Record 2 (nm),(%)	Record 3 (nm),(%)	Record 4 (nm),(%)	Record 5 (nm),(%)	Record 6 (nm),(%)
1.7, 42.8	3.6, 43.2	10, 10.9	21, 7.3	141.8, 19.6	255, 1.5
1.4, 32.2	3.1, 20.9	11.7, 31	24.3, 32.3	164.2, 44.6	295, 16.3
1.2, 7.2	2.9, 1.3	13.5, 33.3	28.2, 42.7	190, 30.4	342, 37.4
2.2, 17.8	4.1, 29.1	15.6, 18.1	32.6, 17.7	220, 5.4	396, 32.9
	4.8, 5.4	18, 5.8			458.7, 11.1
		21, 1			531, 0.8
Índice de Polidispersión (PDI)			1.0		

Con respecto al potencial Z, el análisis realizado a través del velocímetro Laser-Doppler (LDV) mostró un valor de -12.8mV, indicando que la muestra es poco estable, con tendencia a aglomerarse y sedimentarse (**figura 15**).

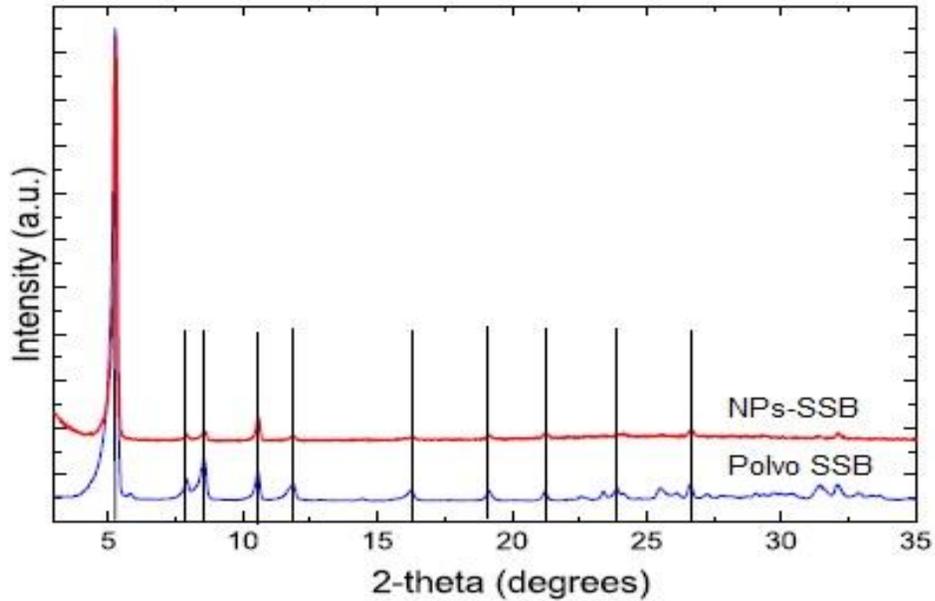


**Figura 15.** Valores de potencial Z de la muestra de NPs-SSB (SSB-20b), el punto más alto de cada pico indica el valor del potencial que en promedio fue de -12.8 mV.

### 1.5 Difracción de Rayos X (XRD).

Por otra parte, la difracción de rayos X (XRD) permitió analizar los patrones de las muestras desecadas de las NPs-SSB para corroborarlas con la estructura SSB. En la **figura 16** se presenta el patrón de una de las muestras de NPs en comparación con el patrón de XRD del polvo. En el patrón de difracción del polvo se puede observar, que la intensidad del pico principal y de todos los demás picos fue más definida comparándola con la intensidad del patrón de difracción de la muestra de NPs.

La mayoría de los picos de ambas muestras coincidieron con lo reportado para el subsalicilato bismuto (tarjetas de PDF 7001563 y 7001555).



**Figura 16.** Patrón de Difracción de Rayos X (XRD) del polvo de SSB (azul) comparándose con el patrón de difracción de las NPs-SSB (rojo), muestra que los patrones similares.

## 2. EVALUACIÓN DE EFECTO ANTIBACTERIANO DE NPS-SSB

### 2.1 Ensayos de actividad metabólica bacteriana por sales de tetrazolio (XTT)

Para la evaluación del efecto antibacteriano de las NPs-SSB contra las diferentes cepas bacterianas aerobias, se utilizaron las muestras SBB-60, SSB-45, SSB-30 y SBB-20. La **figura 17a-d** muestra el porcentaje de efectividad antibacteriana de cada una de las muestras de NPs-SSB en cada bacteria. De manera general, se observó un buen efecto antibacteriano por parte de las NPs-SSB en las 4 bacterias aerobias. En el caso de *E. coli* y

*S. epidermidis* se observó un efecto antibacteriano que parece estar influenciado por los tamaños y/o concentraciones NPs, mientras que en el caso de *P. aeruginosa* y *S. aureus* presentaron un alto efecto antibacteriano que al parecer es independientemente del tamaño y de la concentración de NPs.

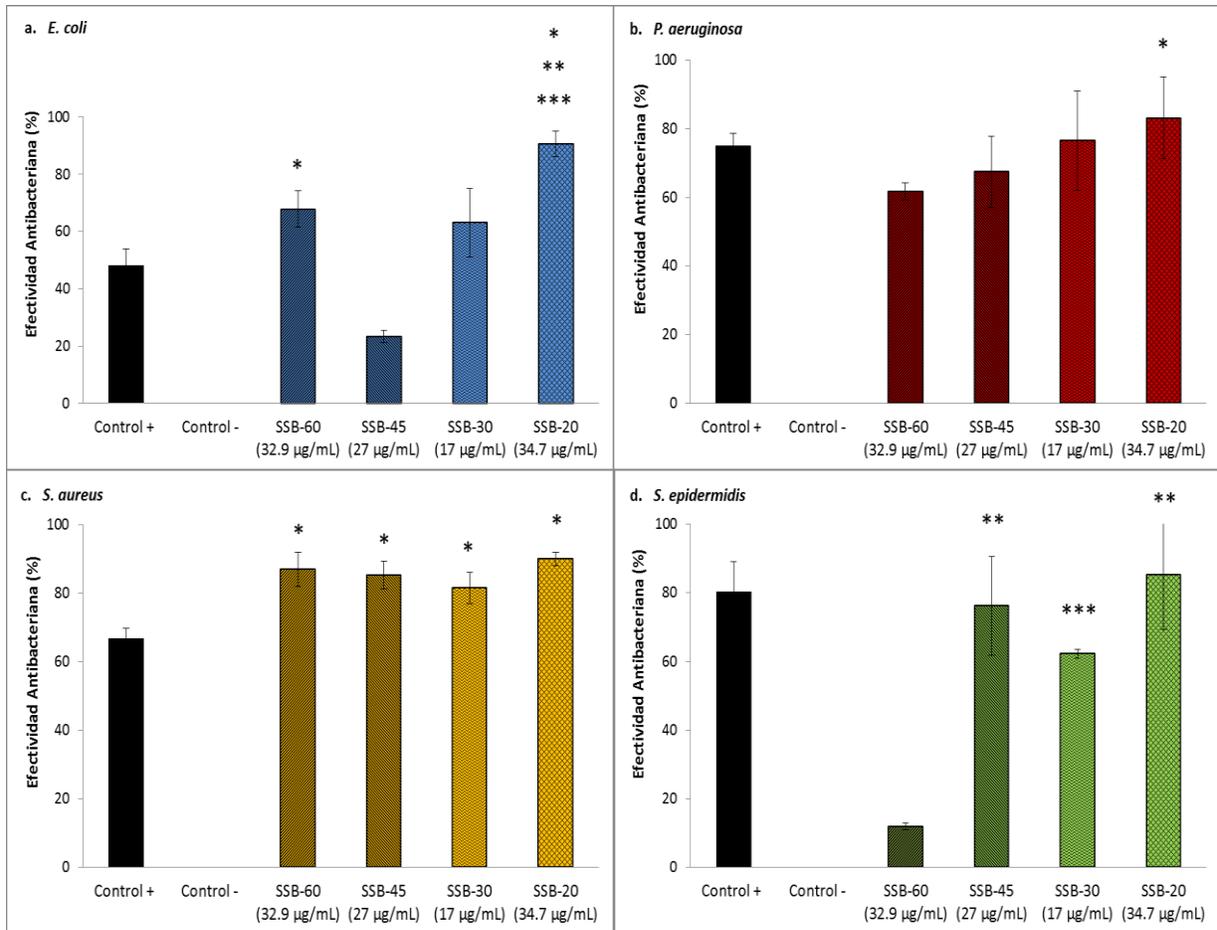
La **figura 17a** muestra el porcentaje de efectividad de las NPs-SSB en la inhibición del crecimiento de *E. coli*. Las muestras SSB-60, SSB-30, y SSB-20 presentaron altos porcentajes de efecto antibacteriano (68, 63, y 90%, respectivamente). Se observaron diferencias significativas entre la muestra SSB-20, (22 nm y 34.7 µg/mL) con respecto a las muestras SSB-30 y 60 ( $p < 0.05$ ), y SSB-45 ( $p < 0.001$ ). Adicionalmente, las muestras SSB-20 y SSB-60 (58 nm y 32.9 µg/mL) tuvieron diferencias significativas con respecto al control positivo ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ ), respectivamente.

Los resultados obtenidos cuando se analizó la inhibición de *P. aeruginosa* se muestran en la **figura 17b**. Esta bacteria fue sensible a todas las muestras de SSB-NP. Se observó que el efecto antibacteriano está directamente relacionado a la disminución del tamaño de partícula. La muestra SSB-20 tuvo el mejor efecto con un porcentaje de inhibición del 83%. No se encontraron diferencias significativas de la muestra SSB-20 con respecto al control positivo pero sí con respecto a la muestra SSB-60 ( $p < 0.05$ ).

En el caso de *S. aureus* todas las muestras de SSB-NPs tuvieron un mejor efecto antibacteriano con respecto al control positivo (**figura 17c**). La muestra SSB-20 tuvo un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *S. aureus* de 90% con respecto al control (68%). El resto de las muestras SSB-60, 45, y 30 tuvieron un efecto de aprox. 80%. Se

encontraron diferencias significativas de todas las muestras(SSB 20, 30, 40, y 60) en comparación con el control positivo ( $p < 0.05$ ).

Por último, cuando se analizó *S. epidermidis*(**figura 17d**), se encontró que todas las muestras de SSB-NPs presentaron un buen efecto antibacteriano, excepto la muestra SSB-60, la cual tuvo un efecto inhibitorio de 11.9%, mientras que las muestras SSB45, 30, y 20 mostraron un efecto inhibitorio del 76.2, 62.3 y 85.3%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las NPs con respecto al control, sin embargo, las muestras SSB-20 y 45 tuvieron diferencias significativas con respecto a la muestra SSB-60 ( $p < 0.01$ ). De igual manera la muestra SSB-30 tuvo diferencias significativas con la muestra SSB-60 ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17 (a-d).** Efectividad antibacteriana (% inhibición) de las NPs-SSB en *E. coli* (a), *P. aeruginosa* (b), *S. aureus* (c) y *S. epidermidis* (d). Promedio  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes por triplicado. Los \* indican las diferencias significativas \*( $p < 0.05$ ) \*\*( $p < 0.01$ ) \*\*\*( $p < 0.001$ ). ANOVA 1 via. post hoc Bonferroni.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se decidió continuar con los experimentos de actividad antibacteriana en especies anaerobias con la muestra SSB-20a. Esta muestra fue sintetizada bajo las mismas condiciones que la muestra SSB-20 pero con un tiempo de ablación de 6 min, con lo cual se obtuvieron nanopartículas de 22 nm y una concentración de 121 µg/mL.

El efecto antibacteriano de la muestra SSB-20a contra bacterias anaerobias bucales se muestra en la **figura 18 (a-f)**. En general, se puede observar que las NPs-SSB tuvieron un efecto inhibitorio significativo en todas las especies usadas, en comparación con el antibiótico utilizado como control positivo.

En el caso de *A. israelii* (**figura 18a**) todas las concentraciones tuvieron un efecto inhibitorio significativo en comparación con el control positivo. Las NPs-SSB en su concentración más alta (21.7 µg/mL), alcanzaron un porcentaje de inhibición del 77%, mientras que con 15 µg/mL de NPs-SSB el efecto fue de 65%. Ambas concentraciones mostraron diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, las concentraciones de 7.7 a 1.9 µg/mL tuvieron un efecto del 46 a 28% sobre el crecimiento de esta bacteria. El efecto de las NPs-SSB frente a *A. actinomycetemcomitans* (**Figura 18b**) mostró que sólo las concentraciones más altas probadas tuvieron un efecto inhibitorio significativo de 86% y 90% a concentraciones de 15.4 y 21.7 µg/mL, respectivamente y comparándolas con el control ( $p < 0,01$ ).

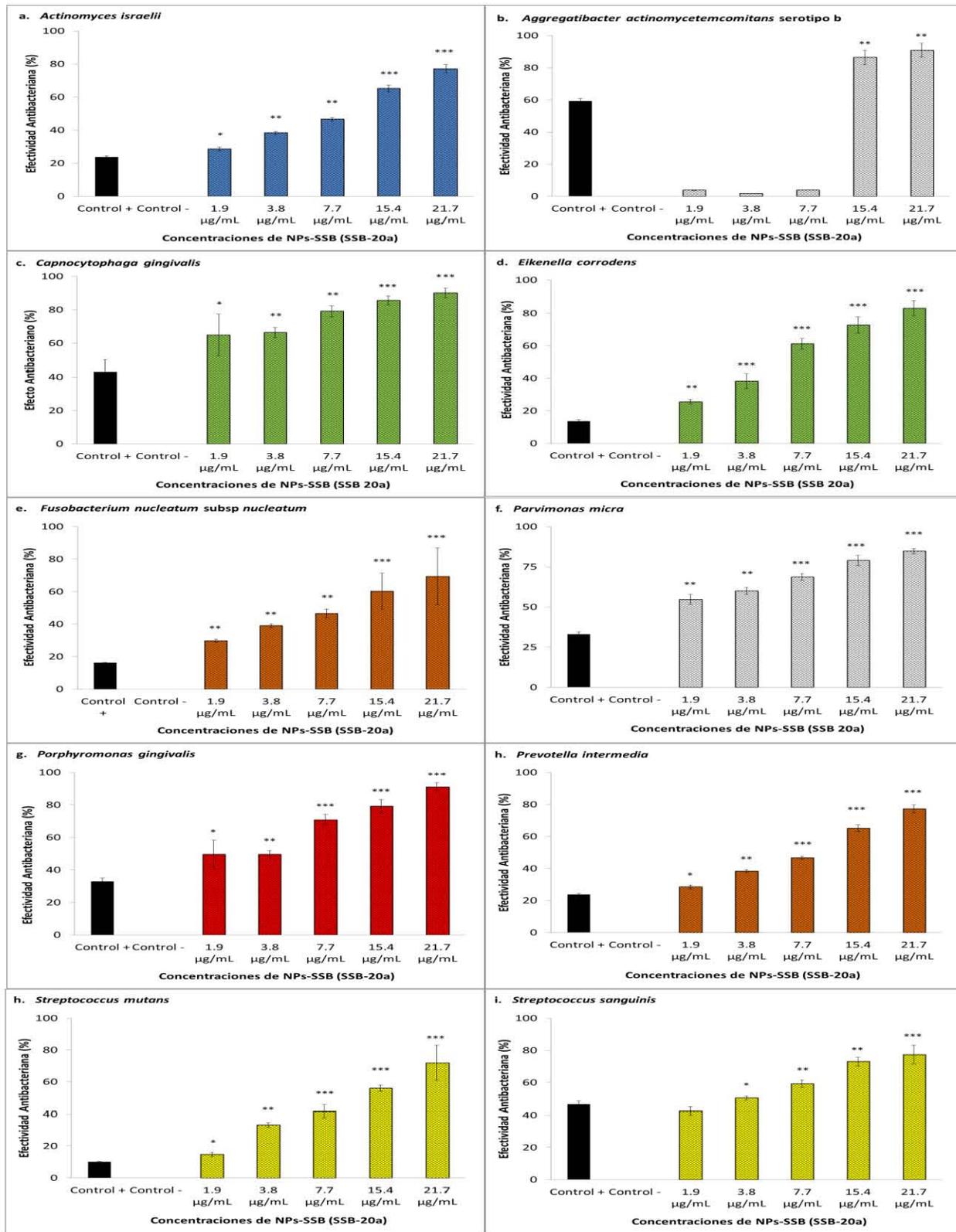
La **figura 18c** muestra el efecto de las NPS-SSB contra *C. gingivalis* que fue significativo en todas las concentraciones (1.9 a 21.7 µg/mL) comparando con el control positivo; el mayor efecto antibacteriano se encontró usando 21.7 µg/mL con un 90% de inhibición respecto al control con un 43% ( $p < 0,001$ ). El resto de las concentraciones (15.4 a 1.9 µg/mL) mostraron porcentajes de inhibición de 85 a 65%. El efecto de las NPs-SSB en *E. corrodens* (**figura 18d**), indicó que el efecto inhibitorio fue significativo en todas las concentraciones siendo la concentración más alta de 21.7 µg/mL con un efecto del 83%

con respecto al control ( $p < 0.001$ ). Mientras que el resto de las concentraciones de NPS-SSB, mostraron un porcentaje entre el 72 y 25% de inhibición.

En la **figura 18e**, *F. nucleatum* alcanzó solamente un 69% de inhibición a la máxima concentración de 21.7  $\mu\text{g/mL}$ , que fue significativo comparado con el control ( $p < 0.001$ ). Por otro lado el resultado obtenido en las concentraciones de 15.4 a 1.9  $\mu\text{g/mL}$  fue significativo con porcentajes de 60 a 29% de inhibición, en comparación con el control ( $p < 0.01$ ). En *P. micra* (**figura 18f**) se observó un efecto antibacteriano significativo a la concentración de 21.7  $\mu\text{g/mL}$  con un 84.7% de inhibición con respecto al control ( $p < 0.001$ ), mientras que el resto de las concentraciones de NPs-SSB tuvieron un efecto del 78 al 54%.

Cuando se evaluó el efecto de las NPs-SSB en *P. gingivalis* (**figura 18g**) todas las concentraciones usadas tuvieron un efecto significativo en el crecimiento de esta bacteria, en donde se observó que la concentración de 21.7  $\mu\text{g/mL}$  inhibe significativamente el crecimiento de esta bacteria en un 91%, comparándola con el control ( $p < 0,001$ ). De igual manera, en *P. intermedia* (**figura 18h**), todas las concentraciones mostraron una inhibición significativa alcanzando un 77% de efecto a la concentración de 21.7  $\mu\text{g/mL}$  con respecto al control ( $p < 0,001$ ).

En la **figura 18i y j** se pudo observar el efecto antibacteriano contra *S. mutans* y *S. sanguinis*, en donde el más alto efecto sobre estas bacterias fue a la máxima concentración utilizada (21.7  $\mu\text{g/mL}$ ) con un 72% y un 77% respectivamente, en comparación con el control ( $p < 0.001$  y  $p < 0.01$ ).

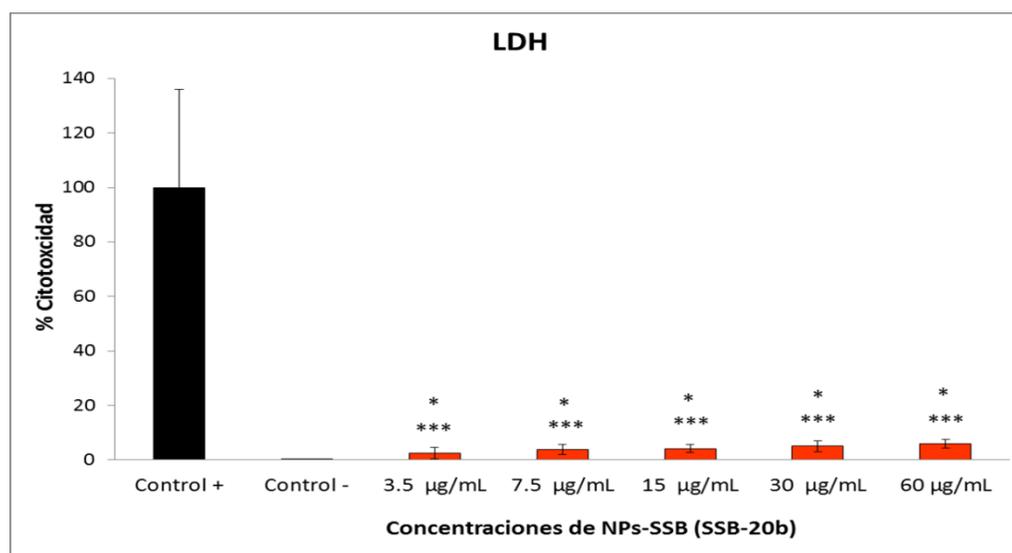


**Figura 18 a -i.** Efectividad antibacteriana (% inhibición) de las NPs-SSB en *A. israelii* (a), *A. actinomycetemcomitans* serotipo b (b), *C. gingivalis* (c), *E. corrodens* (d), *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* (e), *P. micra* (f), *P. gingivalis* (g), *P. intermedia* (h), *S. mutans* (i) y *S. sanguinis* (j). Media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes por triplicado. Los\* indican las diferencias significativas. Análisis ANOVA 1 vía post hoc Bonferroni \* ( $p < 0.05$ ) \*\* ( $p < 0.01$ ) \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

### 3. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NPS-SSB.

#### 3.1 Ensayos de actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH).

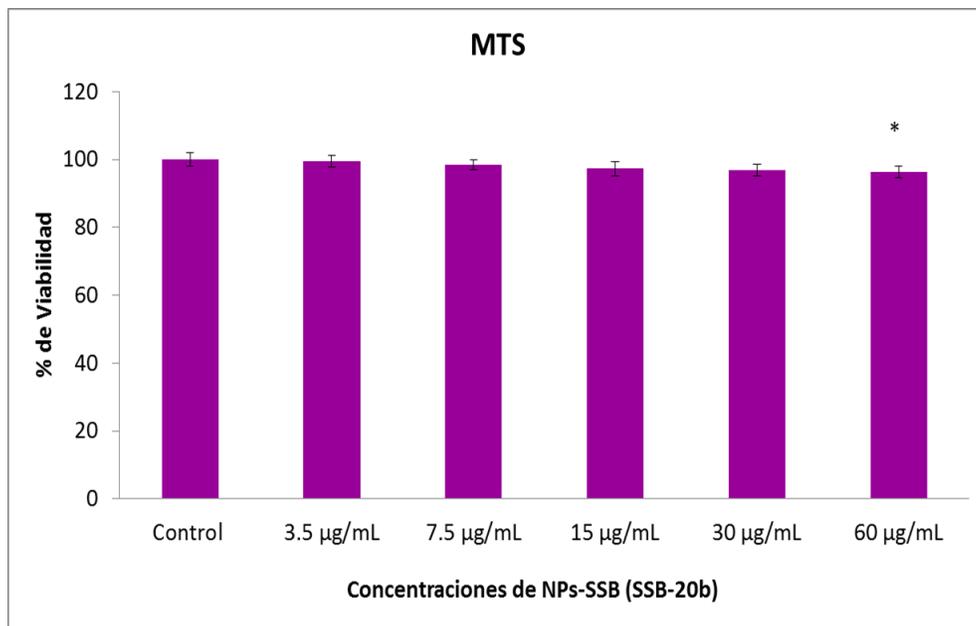
Este ensayo se realizó para evaluar la integridad de membrana. En la **figura 19** se muestra los resultados de la evaluación de la integridad de la membrana celular mediante la cuantificación de LDH después de la exposición durante 24 h de diferentes concentraciones de NPs-SSB que van de 3.5 a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los fibroblastos gingivales. Los resultados indican que las NPs-SSB inducen a un comportamiento dosis-respuesta, a mayor concentración mayor será el efecto tóxico en células. El porcentaje de citotoxicidad registrado fue entre 2 y 6% con las concentraciones usadas, encontrando diferencias significativas con el control negativo ( $p < 0.05$ ). En ese sentido el mayor efecto tóxico de las NPs-SSB a las 24 h fue del 6% a la máxima concentración probada de 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 19.** Efecto citotóxico de las NPs-SSB en HGF-1 evaluando integridad de membrana por liberación de LDH. Media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes por triplicado. Análisis ANOVA 1 vía. post hoc Bonferroni \* ( $p < 0.05$ ) vs. control con cero concentración de NPs-SSB, \*\*\* ( $p < 0.001$ ) vs. control positivo (triton).

### 3.2 Actividad mitocondrial a través del metabolismo de las sales de tetrazolio (MTS).

En la **figura 20** se muestran los resultados del ensayo de MTS con el que se evaluó la actividad metabólica de la mitocondria para determinar las células vivas después de la exposición a las NPs-SSB. En este sentido, la actividad mitocondrial de las HGF-1 después de 24 h de exposición continua a las NPs-SSB registró un porcentaje de viabilidad del 99 al 96% en todas las concentraciones usadas (3.5 a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sólo la máxima concentración mostró diferencias significativas con respecto al control negativo que representa el 100% de viabilidad celular ( $p < 0.05$ ).



**Figura 20.** Efecto citotóxico de las NPs-SSB en HGF-1 evaluando actividad mitocondrial por MTS. Media  $\pm$ DE. 3 experimentos independientes por triplicado. Análisis ANOVA 1 vía. post hoc Bonferroni \* ( $p < 0.05$ ) vs. control (cero concentración de NPs-SSB).

### 3.3 Internalización de NPs-SSB en fibroblastos gingivales humanos HGF-1 por TEM.

El análisis de TEM se realizó después de exponer a las células HGF-1 a las NPs-SSB para obtener información estructural detallada de la localización intracelular de las NPs. Se analizaron las micrografías de las células control para conocer la morfología típica de las células HGF-1 (**figura 21a,b,c**) e imágenes representativas de las células HGF-1 expuestas a las NPs-SSB, donde se muestra la presencia de las NPs en la periferia e interior de las células (**figura 21d,e,f**).

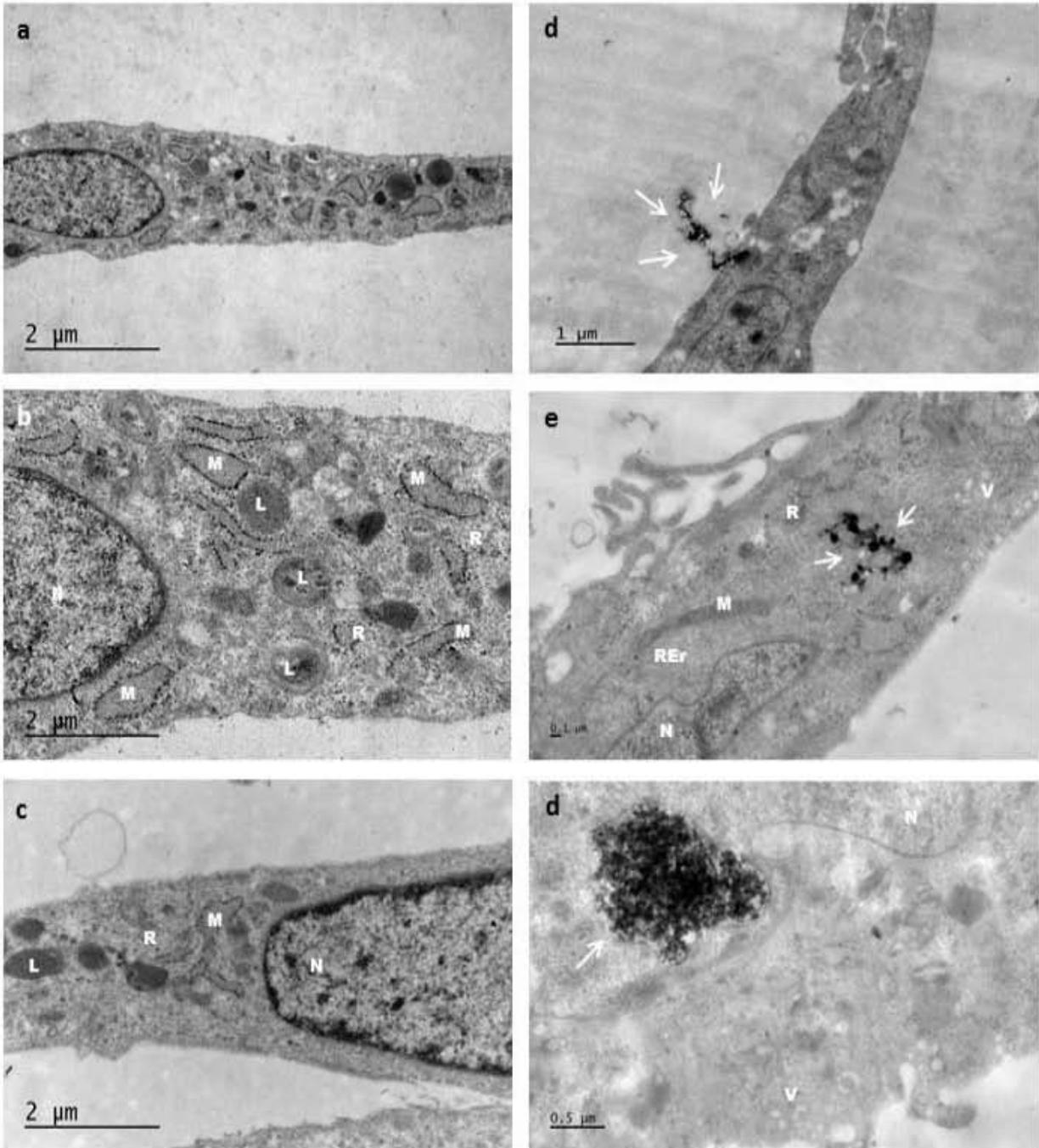
En el grupo control, (**figura 21a,b,c**), que fueron células sin contacto con las NPs-SSB, se puede observar que las células tienen una forma alargada uniforme, el núcleo se presenta de forma ovalada, los ribosomas se presentan como puntos más densos que el resto de los organelos, hay formaciones de rosetas de lisosomas. Las mitocondrias se presentan alargadas y hay presencia de pocas vesículas.

Respecto a las células en contacto con las NPs-SSB (**figura 20d,e,f**), se observó que la orientación de algunas células fue modificada moderadamente ya que presentaban forma redondeada, la membrana presentaba algunas vesículas y la presencia de éstas aumentaron comparado con el grupo control. Se observaron a las NPs interactuando íntimamente con la membrana celular probablemente durante el proceso de endocitosis. La localización intracelular de las NPs a las 24 h fue en el citoplasma, junto con compartimientos celulares como ribosomas y otras vesículas. Se observaron mitocondrias normales en presencia de las NPs en el interior de las células.

## HGF-1

Control

NPs-SSB



**Figura 21.** Imágenes de cultivos de fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) obtenidas utilizando un microscopio electrónico JEM 1400 (JEOL) 80 keV (Tokio, Japón). (a,b,c) Controles de células HGF-1 sin contacto con NPs-SSB y (d,e,f) expuestas a NPs-SSB-20b (flechas) durante 24 horas. (N) Núcleo, (M) Mitocondria, (R) Ribosoma, (L) Lisosomas, (REr) Retículo endoplásmico rugoso, (V) Vesículas.

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo, fue empleada la técnica de ablación láser de sólidos inmersos en líquidos (PLSML) para obtener nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) en agua destilada. Los resultados de la caracterización de estas NPs, indicaron que fue posible producir coloides cuya composición era igual al material utilizado, en este caso SSB. Respecto a los ensayos biológicos que se realizaron, estas nanopartículas mostraron un buen efecto antibacteriano en contra de diversas especies bacterianas tanto aerobias como anaerobias, incluyendo especies Gram positivas y negativas. Asimismo, estas nanopartículas no causaron muerte celular en fibroblastos gingivales humanos, cuando se probaron dentro del rango de las concentraciones utilizadas para los ensayos de actividad antimicrobiana.

Una de las ventajas de la técnica de PLSML, es que permite la obtención de NPs libres de contaminantes o reactivos peligrosos (Barcikowski 2009; Yang 2012) por lo que en este trabajo se pudieron obtener NPs de alta pureza, ya que no fue necesario el empleo de otras sustancias para su producción y el láser no alteró la composición química del SSB. Hay que señalar que no existen reportes previos de síntesis de NPs-SSB con esta técnica ni con otros métodos, sin embargo existen trabajos donde se reporta el uso de la técnica de PLSML para la obtención de NPs hechas a base de Bismuto (Lin 2010; Gondal 2012; Flores-Castañeda 2015), plata, cobalto, oro, titanio, silicio y platino (Mafune, Kohno et al. 2000; Mafune, Kohno et al. 2001; Mafune, Kohno et al. 2003; Hahn 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, dentro de las ventajas de esta técnica está el hecho de que permite una síntesis sencilla y libre de contaminantes, no se necesita de un ambiente que implique condiciones extremas de temperatura y presión, y el tamaño, forma y concentración de las NPs sintetizadas puede ser controlado al variar parámetros de sintonización del láser(Yang 2012). Otras técnicas como la evaporación térmica en alto vacío como depósito físico en fase vapor (PVD), depósito químico en fase vapor (CVD) y preparación de clusters gaseosos, tienen la desventaja de requerir condiciones de temperatura específicas y el uso de cámaras de alto vacío(Rao, Müller et al. 2004; Schmid 2004). Del mismo modo, el método coloidal por reducción química, implica el uso de sustancias químicas, que si bien se sabe es un método químico más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas, también se sabe que requiere del empleo de algunas sustancias que podrían causar daños tóxicos en el ser humano(Schmid 2004). Una de las características de la técnica de PLSML,es que posible la obtención de coloides con diferentes tamaños y concentracionescambiando dos parámetros, la densidad de energía (fluencia) depositada en el objetivo y el tiempo de la ablación (Yang 2012; Zeng 2012).Con nuestros resultados, fue posible confirmar que al variar estos dos parámetros se obtuvieron diferentes tamaños de nanopartícula, así como diferentes concentraciones. Estos resultados coinciden con lo reportado por Flores-Castañeda y col, en donde se obtuvieron nanopartículas de bismuto de 15 a 56 nm variando la distancia del lente de enfoque de 1.7 a 0.75 mm(Flores-Castaneda, Camps et al. 2015).

La caracterización fisicoquímica de las NPs fue un proceso importante en este estudio, ya que las características de éstas determinan su comportamiento biológico en modelos experimentales (Carlson, Hussain et al. 2008; Lewinski, Colvin et al. 2008).

Con respecto al tamaño de las nanopartículas, en este estudio se emplearon varias técnicas de caracterización para asegurar la precisión de las mediciones. Por un lado, la técnica SAXS permitió validar los parámetros de la síntesis con ablación laser, para la obtención de diferentes tamaños de partícula al poder identificar y establecer los tamaños más probables de encontrar en cada una de las muestras. Otros estudios soportan el hecho de que la técnica SAXS es útil para la caracterización de materiales nanométricos (Polte, Ahner et al. 2010; Flores-Castañeda 2015). Otras técnicas utilizadas para determinar el tamaño de las NPs incluyeron DLS y TEM. La técnica de TEM permitió visualizar el tamaño primario y la morfología, mientras que la técnica de DLS permitió conocer el tamaño hidrodinámico y la distribución en agua destilada de las NPs-SSB. Ambas técnicas permiten complementar la información sobre el tamaño de partícula y son ampliamente usadas en la caracterización de nanopartículas tal y como se reporta en otros estudios (Kim, Lee et al. 2012; Bandhyopadhy and Bose 2013; Heni, Vonna et al. 2015).

El uso de varias técnicas para identificar el rango de tamaños es necesario, ya que técnicas como el SAXS y el DLS utilizan fórmulas que calculan un valor aproximado, el cual puede ser confirmado al técnicas como TEM que nos permitan tener certeza de las mediciones como se ha reportado en otros estudios (Chu 2000; Bandhyopadhy and Bose 2013).

La concentración de las NPs-SSB se obtuvo con la espectroscopia UV-Vis, a través de una curva de calibración. No existen referencias sobre espectros moleculares que permitan la correcta identificación del SSB, sin embargo, nuestros hallazgos demostraron que las bandas de absorción en el rango UV-Visible del polvo de SSB dispersado en agua destilada y los coloides obtenidos después del proceso de ablación (NPs-SSB) fueron similares, lo que indica una estructura molecular similar. Por otro lado, el análisis cristalográfico de las NPs-SSB coincidió con el patrón de difracción de la estructura cristalina del SSB. Las técnicas UV-Vis y Difracción de Rayos X permitieron obtener más información de las NPs como es reportado en otros estudios (Chen, Zhao et al. 2007; Haiss, Thanh et al. 2007; Herrmann 2010; Bandhyopadhyaya and Bose 2013).

Una vez realizada la caracterización físico-química de las nanopartículas de subsalicilato de bismuto, se realizó la evaluación de su comportamiento biológico. Esto incluyó el análisis de su efecto antibacteriano utilizando diversas especies tanto aeróbicas como anaeróbicas, así como análisis de la citotoxicidad de las NPs en fibroblastos gingivales humanos y el ingreso de las nanopartículas a estas células.

El efecto antibacteriano de las NPs-SSB se midió utilizando el ensayo de XTT, un método colorimétrico, rápido y eficaz para conocer la susceptibilidad antimicrobiana (De Logu, Pellerano et al. 2003; Tunney, Ramage et al. 2004; Cerca, Martins et al. 2005). Es importante mencionar que la mayoría de los estudios sobre el efecto antibacteriano de las nanopartículas, se basan en los métodos estandarizados, tales como los métodos de microdilución en caldo aprobados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,

antes llamado, NationalCommitteeforClinical and LaboratoryStandards, NCCLS) (Standards 2005) y la British SocietyforAntimicrobialChemotherapy(BSAC)(Howe and Andrews 2012). Sin embargo, hay informes que comparan el ensayo de XTT con los métodos estándar, se ha determinado que la concentración mínima inhibitoria (minimum inhibitory concentration, MIC) de un antibiótico es equivalente al 90% de inhibición del crecimiento bacteriano obtenido con el ensayo de XTT (Tunney, Ramage et al. 2004).

Los resultados del efecto antibacteriano de las NPs-SSB en contra de las bacterias aerobias utilizadas en este estudio (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*), mostraron un efecto antimicrobiano similar o mejor que el control utilizado (ciprofloxacina), con un porcentaje de inhibición de crecimiento entre 80 y 90% aproximadamente. Cabe mencionar que no existe información publicada respecto a propiedades antimicrobianas de las NPs-SSB, sin embargo, algunos estudios han informado del efecto antibacteriano de NPs a base de Bi en contra de *P. aeruginosa*(Badireddy, Marinakos et al. 2013; Luo, Hossain et al. 2013) y *H. pylori*(Nazari, Dowlatabadi-Bazaz et al. 2014) pero no de otras especies.

En el caso de *P. aeruginosa*, las NPs-SSB demostraron tener un efecto antibacteriano del 83% utilizando un tamaño de partícula de alrededor de 22 nm y concentración de 34.7 µg/mL. A diferencia de nuestro estudio, Badireddy y cols. reportaron que NPs de BisBAL (Bismutodimercaptopropanollipofílico) fueron efectivas con un tamaño de partícula de 18 nm y MIC de 12.5 µM que equivalen a 6063.375 µg /mL, es decir, se requirió de un menor tamaño de partícula, pero mayor concentración del compuesto (Badireddy, Marinakos et al. 2013). Por otro lado, Luo y cols. señalan que la combinación de NPs-Bi con los rayos X,

con tamaño de partícula de alrededor de 30 nm y concentración de 200 µg/mL tienen acción bactericida del 94% contra *P. aeruginosa*. En nuestro estudio se encontró que, con un menor tamaño de partícula y menor concentración, el efecto inhibitorio fue de un 83%. Este menor efecto podría ser debido a que el efecto bactericida de sales de SSB es limitado debido a su baja solubilidad (Slikkerveer and de Wolff 1989), y se ha informado de que se requiere de al menos de 1 a 50 mM de SSB para inhibir el crecimiento de especies como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter* sp. (Manhart 1990). En nuestro estudio, la concentración más alta y utilizada en *P. aeruginosa* fue de 34.7 µg/mL (SSB-20) equivalente a 0.093 mM, lo que demuestra el potencial uso de las NPs de SSB. Otro factor que podría estar influyendo en nuestros resultados es que las NPs de SSB están libres de otro agente o sustancia, a diferencia de las NPs de Bi combinadas con rayos X y dimercaptopropanol, por lo que el efecto de las NPs-SSB es propiamente del material; lo que nos hace pensar que, si se aumentara la concentración, se lograría un porcentaje de inhibición más alto en esta especie.

Con respecto a *S. aureus*, este microorganismo mostró un efecto inhibitorio de entre el 80 al 90% utilizando NPs-SSB con diferente tamaño de partícula y concentración. Se ha reportado la presencia de un efecto inhibitorio en esta especie, utilizando nanopartículas de Ag de 40 nm de tamaño y una concentración de 80 µg/mL (Fayaz, Balaji et al. 2010), nosotros encontramos que utilizando NPs de 45 nm y 27 µg/mL se podía obtener la inhibición de este microorganismo en un 80%. En este sentido se ha informado que el efecto antibacteriano depende del tamaño de nanopartícula, entre menor es el tamaño, mejor será el efecto. Un estudio realizado con nanopartículas de paladio (Pd) y obtuvieron

85% de efectividad en contra de *S. aureus* usando partículas de 2.5 nm, 60% usando 2 nm, y 45% utilizando 3.1 nm (Adams, Walker et al. 2014). En nuestro estudio se obtuvo el 90% de inhibición en contra de *S. aureus* utilizando NPs-SSB de 22 nm con una concentración de 34.7 µg/mL.

En el caso de *S. epidermidis*, se observó que las nanopartículas con el tamaño mayor de partícula (SSB-60) y una concentración de 32.9 µg /mL fueron las menos eficaces, con sólo un 12% de inhibición, mientras que las NPs-SSB-20 con una concentración de 34.7 µg/mL fueron capaces de inhibir hasta el 85% del crecimiento. Recientemente, se reportó el efecto antibacteriano de nanopartículas de Ag-triptófano de 17 nm una concentración de 20 µg/mL contra *S. epidermidis* con un 90% de inhibición (Tomita, de Matos et al. 2014) y por otro lado, en otro reporte se determinaron MICs de 1.95 µg/mL utilizando nanopartículas de Ag irradiadas con fluorescencia y con un tamaño de 1.5 nm (Bera, Mandal et al. 2014). Por último, en otro estudio se obtuvo una MIC de 112 µg/mL y una concentración mínima bactericida (CBM) de 224 µg/mL utilizando nanopartículas de CaO con un tamaño de partícula de 16 nm (Roy, Gauri et al. 2013).

Cuando se evaluó el efecto de las NPs-SSB en *E. coli*, se obtuvo una inhibición del 90% con la muestra SSB-20, mientras que con la muestra SSB-45 sólo una inhibición del 23%. Existen estudios que han reportado un buen efecto antibacteriano frente a *E. coli* usando nanopartículas de Ag. Un estudio reportó un 80% de inhibición usando una concentración de 75 µg/mL y un tamaño de partícula de 10 nm (Morones, Elechiguerra et al. 2005), y otro estudio reportó MICs de 30 µg/mL utilizando nanopartículas de plata de 40 nm (Fayaz, Balaji et al. 2010). También se ha publicado sobre el efecto antibacteriano

de nanopartículas de diferentes óxidos, Jiang y cols. compararon el efecto de NPs de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (235 nm) y de  $\text{SiO}_2$  (46 nm) a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , obteniendo un 47 y 60% de inhibición, respectivamente (Jiang, Mashayekhi et al. 2009). En otros estudios en donde se utilizaron nanopartículas de NiO (25 nm), ZnO (40 nm) y CuO (79 nm) a una concentración 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se demostró la inhibición de *E. coli* del 88, 71, y 77%, respectivamente (Wang, Lee et al. 2010). Por otro lado, un estudio que utilizó nanopartículas de Pd, reportó una inhibición del 100% de *E. coli* a una concentración de 1.06 mg/L y un tamaño de partícula de 2 nm; sin embargo, cuando probaron nanopartículas más grandes de 2.5 y 3.1 nm, la inhibición del crecimiento fue del 70% (Adams, Walker et al. 2014). Estos resultados refuerzan la noción de la importancia del tamaño de partícula en la inhibición del crecimiento bacteriano.

El mecanismo de acción de las NPs-SSB en *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* aun es desconocido dado que no existen reportes al respecto. Sin embargo, podría estar asociado a lo que se ha reportado sobre el mecanismo de acción del SSB sobre *H. pylori*, que incluye inhibición de ATP y ruptura de glicocálix en la pared celular por depósitos observados en pared celular y espacio periplásmico (Lambert and Midolo 1997; Stratton, Warner et al. 1999; Ge, Chen et al. 2012).

De manera general, los resultados del efecto antibacteriano en especies de importancia bucal mostraron que las NPs-SSB a una concentración de 21.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tuvieron un alto efecto inhibitorio alcanzando porcentajes de entre 70 y 90% en la mayoría de las especies anaerobias, superando incluso el efecto del antibiótico usado (Cefatoxima) como control positivo. En el caso de especies bucales, no existen reportes

publicados sobre el efecto antibacteriano de NPs de SSB, sin embargo sí hay algunos estudios sobre el efecto antibacteriano y antifúngico de NPs a base de Bi (Campos-Ibarra 2010; Hernandez-Delgadillo, Velasco-Arias et al. 2012; Hernandez-Delgadillo, Velasco-Arias et al. 2013).

En este estudio, la máxima concentración utilizada de NPs-SSB fue de 21.7 µg/mL y las bacterias que mostraron mayor sensibilidad fueron *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis* y *P. gingivalis* con porcentajes de inhibición del 90% aproximadamente. Respecto a *A. actinomycetemcomitans*, se ha reportado una MIC de 59 µg/mL utilizando NPs a base de Bi de valencia cero con tamaño de partícula 3.3 nm, mientras que las NPs de trióxido de Bismuto de 6 nm mostraron una MIC de 66 µg/mL (Campos-Ibarra 2010). Es importante recordar que las NPs-SSB de este estudio, están inmersas en agua destilada por lo que su efectividad antibacteriana se debió propiamente al material (SSB). A diferencia del estudio de Campos-Ibarra y cols. donde las NPs de Bismuto cero-valente y de trióxido de Bismuto estaban inmersas en sulfóxido de dimetilo, disolvente reportado con actividad antibacteriana (Wadhvani 2008). Otros estudios de NPs con efecto antibacteriano en contra de *A. actinomycetemcomitans* han reportado un 99% de inhibición a 4 horas de incubación utilizando 2500 µg/mL de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) con un tamaño de partícula entre 10 y 50 nm (Vargas-Reus, Memarzadeh et al. 2012). De la misma manera se ha reportado el uso de NPs de sílice recubiertas de clorhexidina (Seneviratne, Leung et al. 2014) y nanopartículas de Ag (Lu, Rong et al. 2013), obteniendo MICs de 50 y 25 µg/mL, respectivamente. Nuestros resultados indican que con

sólo 21.7 µg/mL de NPs-SSBse logró obtener una efectividad del 90% en *A. actinomycetemcomitans*.

Con respecto a *C. gingivalis*, no existen antecedentes sobre su susceptibilidad a NPs a base de Bi. Sin embargo, existe un estudio sobre el efecto antibacteriano de NPs de plata hidroxiapatita/titanio (Ag-NHA/nTiO<sub>2</sub>) en contra de este microorganismo, en donde reportaron una MIC de 1000 µg/mL, sin informar el tamaño de nanopartícula (Liao, Mo et al. 2007). En nuestro estudio se obtuvo un 90% de inhibición con 21.7 µg/mL.

Hay otros reportes donde se evaluó el efecto antibacteriano de diferentes nanopartículas contra *P. gingivalis*, en nuestro estudio se determinó que esta bacteria tuvo una inhibición de su crecimiento en un 90% en contacto con las NPs-SSB. En el estudio de Campos-Ibarra y cols. se reportó una MIC de 133 µg/mL usando NPs de Bismuto cerovelante y una MIC de 59 µg/mL utilizando NPs de trióxido de Bismuto. Vargas-Reus y cols. 2012, indicaron una reducción del 100% del crecimiento bacteriano en 2 h utilizando 2,500 µg/mL y Seneviratne y cols. informaron de una MIC de 25 µg/mL usando nanopartículas de sílice recubiertas de clorhexidina. En este sentido se sabe que la clorhexidina se usa como una solución antiséptica para prevenir y controlar el crecimiento bacteriano en boca (Jenkins, Addy et al. 1988; Kuyyakanond and Quesnel 1992), por esta razón las nanopartículas recubiertas de sílice-clorhexidina pudieran tener un excelente efecto antibacteriano.

Otras bacterias como *E. corrodens* y *P. micra* tuvieron una inhibición de aprox. 80%, mientras que *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *S. mutans* y *S. sanguinis* mostraron una inhibición del 70% aproximadamente, utilizando 21.7 µg/mL de NPs-SSB. Campos-

Ibarra y cols. reportaron que en *E. corrodens* las NPs de Bi cero-valente y trióxido de Bi se obtuvieron MICs de 66 y 29 µg/mL, respectivamente. En el mismo estudio, se obtuvieron MICs de 133 y 66 µg/mL utilizando NPs de Bi cero-valente en contra de *P. micrayA. israelii*, respectivamente. Mientras que, con las NPs de trióxido de Bi, se obtuvo una MIC de 29 µg/mL en ambas cepas. Con respecto a *F. nucleatum* y *P. intermedia*, se reportó un buen efecto con NPs de Bi cero-valente obteniendo una MIC de 66 µg/mL para ambas cepas. Con las NPs de trióxido de Bi se obtuvieron MICs de 59 y 29 µg/mL en ambas cepas, respectivamente (Campos-Ibarra 2010). En otro estudio, Vargas-Reus y cols. 2012, indicaron una reducción bacteriana del 100% después de 3 horas de incubación con 2,500 µg/mL en contra de *F. nucleatum* y *P. intermedia*.

Finalmente, en lo que respecta a *S. mutans* y *S. sanguinis*, Hernández-Delgadillo y cols. 2012, reportaron un 63% de inhibición de *S. mutans* usando NPs de Bi cero-valente y una MIC de 104 µg/mL. Del mismo modo, Campos-Ibarra y cols. 2010, informaron del efecto inhibitorio contra *S. sanguinis* utilizando las mismas NPs-Bi cero-valente y NPs de BiO<sub>3</sub> (trióxido de Bi) con MICs de 133 y 59 µg/mL, respectivamente. En este estudio, las NPs-SSB con una concentración de 21.7 µg/mL inhibieron el crecimiento bacteriano de *S. mutans* y *S. sanguinis* en un 71 y 77%, respectivamente.

Existen reportes de otras nanopartículas que no están basadas en Bi, que han analizado su efecto antibacteriano en contra de bacterias bucales. En un reporte reciente de Ahrari y cols., se evaluó el efecto antibacteriano contra *S. mutans* y *S. sanguinis* probando coloides de óxido de zinc (nanoZnO), óxido de cobre (nanoCuO), dióxido de titanio (nanoTiO<sub>2</sub>) y nanopartículas de plata (nanoAg). En ese mismo estudio, se obtuvo la MIC

más efectiva a 0.0488  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilizando las nanoTiO<sub>2</sub> con 40 nm (Ahrari, Eslami et al. 2015). En nuestro estudio se utilizó un menor tamaño de partícula (22nm) pero se requirió mayor concentración (21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las NPs para obtener un buen efecto antibacteriano. En otro estudio, utilizando NPs de sílice recubiertas con clorhexidina, se obtuvo una MIC de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *S. mutans* (Seneviratne, Leung et al. 2014). Hernández-Sierra y cols. compararon el efecto antibacteriano de NPs óxido de zinc (ZnO) con tamaño de partícula de 125 nm, y de oro (Au) con tamaño de partícula de 80 nm en contra de *S. mutans*, obteniendo MICs de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 197  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente (Hernández-Sierra, Ruiz et al. 2008). Espinosa-Cristóbal y cols. informaron del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata contra aislados clínicos y cepas de referencia de *S. mutans*, utilizando partículas de 8.4 nm, obteniendo MICs de 101.98 y 66.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Mientras que cuando utilizaron partículas de 16.1 nm, obtuvieron MICs de 145.64 y 108.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente (Espinosa-Cristóbal 2012). Sin embargo, los autores mencionan que las nanopartículas de plata se sumergieron en agua desmineralizada con ácido gálico, un ácido, de tipo orgánico utilizado comúnmente en la industria farmacéutica por su actividad antibacteriana, además no mencionan el porcentaje de ácido gálico que se utilizó (Borges, Ferreira et al. 2013).

Como se ha explicado en este trabajo, los efectos de las NPs de SSB en bacterias aerobias y anaerobias, son evidentes. El mecanismo de acción de las NPs a base de Bi en bacterias anaerobias no es del todo claro, sin embargo hay algunos reportes donde se señala que las bacterias expuestas a sales de bismuto presentan acumulación de Bi en

pared celular y citoplasma (Dodge and Wackett 2005). Además se ha reportado que en condiciones de anaerobiosis las sales de bismuto son capaces de producir trimetilbismuto ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ) en gas que ha sido atribuido al mecanismo de acción (Bentley and Chasteen 2002).

El siguiente paso fue evaluar el grado de toxicidad en células de mucosa oral, como fibroblastos gingivales humanos.

A pesar de las potenciales aplicaciones de los compuestos a base de bismuto en escala nanométrica en diversas áreas de la salud, existe poca información sobre la evaluación de los efectos tóxicos de las NPs en modelos *in vitro*.

Para evaluar la toxicidad inducida por sustancias químicas, existe una serie de requisitos que un biomaterial o cualquier producto con aplicación biomédica (tal es el caso de las nanopartículas), debe de cumplir para asegurar su éxito antes de su uso en la clínica (Lee 2011). Tanto la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) como la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) han recopilado una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo* cuyo objetivo es la evaluación biológica de productos sanitarios. Estos ensayos como la medición de enzimas (LDH) y la capacidad metabólica de las células (MTS) entre otros, han sido aceptados para la evaluación de productos o dispositivos que serán usados en medicina (Kroll, Pillukat et al. 2009; Lee 2011).

Debido al incremento en el número de nanomateriales que son introducidos en la industria, en productos de consumo y en el área médica, ha sido difícil que las nanopartículas sean evaluadas con estas normas ya que aún no se conoce del todo las diferentes interacciones con los reactivos que se usan para la evaluación toxicológica. Sin

embargo, los reportes existentes sobre este tema han reportado resultados que contribuyen a un mejor entendimiento de estas interacciones (Lee 2011).

En este trabajo, se utilizaron ensayos sugeridos por las normas ISO-10993 y FDA, que permitieron obtener resultados que brindaron un panorama general de los efectos que provocan las NPs en las células y de cómo interactúan con las mismas. Al evaluar la citotoxicidad de NPs, es necesario comparar los resultados entre al menos dos técnicas que evalúen diferentes parámetros de la viabilidad celular. El uso simultáneo de al menos dos ensayos de toxicidad proporciona información sobre cómo las nanopartículas interactúan con las células (Kroll, Pillukat et al. 2009).

Los resultados indicaron que las NPs-SSB no son citotóxicas para las células HGF-1 en las concentraciones probadas (3.5 a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 h. Sin embargo, sí se observó un daño entre el 2 al 6% en la membrana celular en todas las concentraciones mientras que la función mitocondrial solo se vio comprometida en la máxima concentración probada (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cabe mencionar que no existen reportes previos donde se haya evaluado el potencial tóxico de las NPs-SSB en fibroblastos gingivales humanos. Sin embargo, existen pocos estudios en donde se reporta el efecto tóxico de NPs a base de Bi pero con diferentes tipos de células y utilizando diferentes ensayos *in vitro* por lo que nuestros resultados se intentarán comparar con lo reportado previamente.

En nuestro estudio, utilizando las NPs-SSB de 22 nm a concentraciones de 3.5 a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se pudo observar un comportamiento dosis-respuesta al obtener porcentajes de toxicidad del 4% después de 24 h en la concentración más alta (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Luo y cols. analizaron el efecto de 4 tipos de NPs de Bi: Bi, Bi con grupos amino, Bi con sílice y Bi con

polietinil-glicol en concentraciones de 0.5, 5 y 50 nM, en la viabilidad de células epiteliales (HeLa) y células osteoblasticas (MG-63)(Luo, Wang et al. 2012). Al igual que en nuestro estudio, los hallazgos de Luo y cols., mostraron que la reducción en la viabilidad celular, fue dosis-respuesta dependiente, al obtener toxicidad de cada NPs de Bi de 45, 52, 41 y 34 % después de 24 h de tratamiento con la máxima concentración de 50nM (24.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En el caso de las células MG-63 a la misma concentración y después de 24 h, las NPs de Bi, Bi con grupos amino, Bi con sílice y Bi con polietil-glicol provocaron un daño de 29, 33, 24, 22 %, respectivamente. Comparando estos resultados con nuestro estudio, podemos sugerir que las NPs-SSB presentan menor toxicidad en los HGF-1.

Por otro lado, en nuestro estudio, se obtuvo una reducción solo del 4% de actividad mitocondrial después de 24 h de tratamiento. Contrario a otro estudio en donde las NPs de Bismuto ferrito ( $\text{BiFeO}_3$ , BFO) con un rango de tamaño de 30-90 nm disminuyeron hasta en un 30% la actividad mitocondrial de células PC12 después de 3 h de exposición(Song 2013).

Existen otros reportes sobre el efecto de NPs de Bi dimercaptopropanol (NPs-BisBAL) en la apoptosis celular. Un estudio señala que en cultivos con eritrocitos y leucocitos, las NPs-BisBAL de 53 nm, ocasionan apoptosis celular utilizando 1000  $\mu\text{M}$  (48507  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) después de 24 h mediante el ensayo de MTT. (Hernandez-Delgadillo, Badireddy et al. 2015). En otro estudio, los mismos autores no observaron citotoxicidad utilizando el mismo ensayo MTT, en células de riñón de mono (MA104) y células epiteliales (HeLa) después de incubarlas con 5  $\mu\text{M}$  de NPs-Bisbal (2,495  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 h (Hernandez-Delgadillo 2016). En

nuestro estudio, las NPs-SSB no causaron muerte celular, solo daño celular del 2 al 6% y con concentraciones de 3.5 a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Esquivel-Gaon y cols. evaluaron la toxicidad de NPs cuyo componente primario es Bi, se trata de NPs de un sistema pseudobinario formado por Bi, sodio (Na), bario (Ba) y Ti comúnmente conocido como BNT-BT. Estas NPs de Bi, con un tamaño de partícula entre 60 y 200 nm, en concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fueron expuestas a células de alveolo humano A549 durante 24, 48 y 72 h. Al igual que nuestro estudio, evaluaron la actividad mitocondrial por MTS y señalaron un incremento en esta actividad a las 24 h. La hiperpolarización mitocondrial registrada se redujo a las 72 h (Esquivel-Gaon, Anguissola et al. 2015). Estos resultados fueron diferentes a nuestro estudio dado que, a las 24 h, las NPs-SSB no provocaron un incremento si no una reducción en la actividad mitocondrial del 4%.

Con respecto a los mecanismos de toxicidad de NPs-SSB, este aun es desconocido ya que nuestro estudio es el primer trabajo que se realiza con estas nanopartículas. Sin embargo, existen indicios de posibles mecanismos de acción de NPs que presentan Bi en su estructura. Algunos reportes señalan que este mecanismo depende de la disolución de las NPs en el ambiente intracelular y/o extracelular. La disolución de las NPs dentro de la célula puede llevar a la presencia de grandes cantidades de iones, los cuales pueden inducir respuestas adversas provocando daño celular (Luo, Wang et al. 2012). La disolución está influenciada por las condiciones del ambiente en el que se encuentran las NPs, dentro de las células esto puede suceder una vez que las NPs ingresan y son acumuladas en vesículas con pH ácido. Sin embargo, la eficacia de la disolución depende

del tiempo de residencia y la actividad enzimática dentro de los orgánulos (Lewinski, Colvin et al. 2008).

Por otra parte, hay que recordar que el SSB es un compuesto de organobismuto, es decir, que tiene una estructura molecular orgánica unida a un metal (Bi) (Ernst 1963; Angino and Long 1979), por lo que el mecanismo de acción de las NPs-SSB podría estar influenciado por la naturaleza del compuesto. En ese sentido existe evidencia de que el mecanismo de acción de los compuestos de organobismuto implica una acción en conjunto de la parte orgánica y la parte metálica y no solo del metal como se ha sugerido en otros estudios (Kohri, Yoshida et al. 2015).

Con el objetivo de observar como ingresaban las NPs-SSB dentro de los fibroblastos, se utilizó la técnica TEM. Con nuestros resultados se pudo observar que las NPs interactuaron con la membrana y que las células internalizaron las NPs localizándose en citoplasma, junto con compartimientos celulares como ribosomas y otras vesículas. De igual manera no hay estudios previos de internalización de NPs-SSB en células HGF-1, sin embargo, sí hay reportes de otras NPs en diferentes modelos *in vitro*.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Dos Santos y cols. que reportaron que el ingreso de las NPs es principalmente por endocitosis. Este proceso puede ser mediado por receptores cuando su diámetro hidrodinámico es similar al tamaño de las vesículas formadas durante la endocitosis, mediada por clatrina o caveolinas que se encuentran entre 60 y 100 nm o por un sistema más flexible como lo es la micropinocitosis que permite el ingreso de partículas de menor tamaño (Dos Santos, Varela et al. 2011). Al ingresar las NPs por endocitosis, estas se pueden encontrar en diferentes

vesículas pertenecientes a esta vía de entrada. Esta información fue confirmada por nuestros resultados que muestran a las NPs interactuando con la membrana celular, además se observan en el interior de las células acumuladas en vesículas como los endosomas que presentan pH ácido.

La presencia de las NPs-SSB cerca del núcleo es interesante, ya que su presencia en forma libre representa un fenómeno que podría estar asociado con alteraciones en la actividad fisiológica del núcleo y sugiere un mecanismo de escape de los compartimentos endolisosomales, relacionados con daño celular (Dos Santos, Varela et al. 2011). Sin embargo, en nuestro estudio las NPs-SSB se encuentran encapsuladas por lo que podemos inferir que el mecanismo de acción no es igual.

Se sabe que la velocidad con que las NPs son internalizadas está relacionada con su tamaño de partícula (Dos Santos, Varela et al. 2011), las partículas que tienen menor tamaño son internalizadas de forma rápida comparadas con las partículas de tamaño micrométrico. En nuestro estudio las NPs-SSB presentan tamaños de 2 a 300 nm, sin embargo el tamaño de partícula de 22 nm fue el que se encontró en mayor cantidad.

Uno de los cambios que se pudieron observar en fibroblastos gingivales en contacto con las NPs-SSB, es la presencia de numerosas vesículas, lo que sugiere que la exposición a estas NPs, induce la vesicularización. Lo anterior está relacionado con el tamaño de las NPs en concordancia con lo señalado por Esquivel-Gaon y cols. (Esquivel-Gaon, Anguissola et al. 2015). En este sentido, Shang y col. señalan que el tamaño primario e hidrodinámico de las NPs es de gran importancia para el ingreso de las NPs a las células ya que se pueden acoplar a receptores en membrana plasmática para su ingreso. Además se ha demostrado

que >50 nm es el tamaño óptimo para que las NPs sean internalizadas de manera más eficiente (Shang, Nienhaus et al. 2014).

Hasta el momento no hay más estudios que reporten el efecto tóxico de las NPs-SSB tanto en bacterias como en células humanas. Por otro lado, existen algunos reportes donde comparan el efecto tóxico de NPs de Ag tanto en bacterias como células humanas. Greulich cols. evaluaron el efecto de NPs de Ag en contra de *S. aureus* y *E. coli* donde se utilizaron tamaños de 70 nm y se obtuvieron MIC de 50 µg/mL. La misma concentración se utilizó para evaluar el efecto tóxico en células madre mesenquimales (hMSCs) a las 24 h encontrando una reducción significativa en la viabilidad celular del 15% (Greulich, Braun et al. 2012). Nuestros resultados mostraron un comportamiento diferente, ya que las NPs-SSB tuvieron un efecto inhibitorio en *S. aureus* y *E. coli* del 90% con 34.7 µg/mL. La concentración de 30 µg/mL de NPs-SSB (cerca a la concentración con un buen efecto antibacteriano) tuvo una reducción del 3% de la viabilidad celular en fibroblastos gingivales humanos (HGF-1), es decir que con menos concentración de NPs-SSB obtuvimos un excelente efecto antibacteriano y baja toxicidad en células humanas.

## **IX. CONCLUSIONES.**

En este estudio, se obtuvieron nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) por medio de la técnica de ablación laser de sólidos inmersos en líquidos, lo cual permitió que se mantuviera la composición química del SSB que se comprobó con las técnicas de caracterización utilizadas.

El efecto antibacteriano de las NPs-SSB en contra de las diversas especies que fueron probadas en este estudio tanto aerobias como anaerobias, fue dependiente tanto del tamaño como de la concentración. Es decir, la mejor actividad inhibitoria se encontró con las muestras que tenían el menor tamaño de partícula y mayor concentración.

Las concentraciones de las NPs-SSB que presentaron un buen efecto antibacteriano presentaron baja toxicidad en los fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) y no causaron muerte celular. Sin embargo, se detectó una ligera alteración en la membrana celular aunque la función mitocondrial no estuvo comprometida.

## REFERENCIAS.

1. Adams, C. P., K. A. Walker, et al. (2014). "Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles." PLoS One**9**(1): e85981.
2. Ahrari, F., N. Eslami, et al. (2015). "The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes." Dent Res J (Isfahan)**12**(1): 44-49.
3. Alipour, M., C. Dorval, et al. (2011). "Bismuth-ethanedithiol incorporated in a liposome-loaded tobramycin formulation modulates the alginate levels in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*." J Pharm Pharmacol**63**(8): 999-1007.
4. Allaker, R. P. and K. Memarzadeh (2014). "Nanoparticles and the control of oral infections." Int J Antimicrob Agents**43**(2): 95-104.
5. Andrieux-Ledier, A., B. Tremblay, et al. (2013). "Synthesis of Silver Nanoparticles Using Different Silver Phosphine Precursors: Formation Mechanism and Size Control." Journal of Physical Chemistry C**117**(28): 14850-14857.
6. Angino, E. E. and D. T. Long (1979). Geochemistry of bismuth. Stroudsburg, Pa. New York, Dowdendistributed world wide by Academic Press.
7. Archer, N. K., M. J. Mazaitis, et al. (2011). "*Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease." Virulence**2**(5): 445-459.
8. Auffan, M., J. Rose, et al. (2009). "Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective." Nat Nanotechnol**4**(10): 634-641.
9. Aydin Sevinc, B. and L. Hanley (2010). "Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles." J Biomed Mater Res B Appl Biomater**94**(1): 22-31.
10. Aye, H. L., S. Choopun, et al. (2010). "Preparation of Nanoparticles by Laser Ablation on Copper Target in Distilled Water." Functionalized and Sensing Materials**93-94**: 83-86.
11. Badireddy, A. R., S. M. Marinakos, et al. (2013). "Lipophilic nano-bismuth inhibits bacterial growth, attachment, and biofilm formation." Surface Innovations**1**(3): 181-189.
12. Balcazar, J. L., J. Subirats, et al. (2015). "The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance." Front Microbiol**6**.
13. Balows, A. (1992). The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. New York, Springer.
14. Bandhyopadhyaya, A. and S. Bose (2013). Characterization of biomaterials.
15. Baneyx, F. and J. K. Park (2013). "Editorial: Nanobio versus Bionano--what's in a name?" Biotechnol J**8**(2): 158-159.
16. Barcikowski, S. D., F.; Moldenhauer, K. (2009). "Impact and structure of literature on nanoparticle generation by laser ablation in liquids." Journal of Nanoparticle Research**11**(2): 1878-1883.
17. Bentley, R. and T. G. Chasteen (2002). "Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth." Microbiol Mol Biol Rev**66**(2): 250-271.

18. Bera, R. K., S. M. Mandal, et al. (2014). "Antimicrobial activity of fluorescent Ag nanoparticles." Lett Appl Microbiol**58**(6): 520-526.
19. Berkowitz, J. M. (1990). "The Efficacy of Bismuth Subsalicylate in Relieving Gastrointestinal Discomfort Following Excessive Alcohol and Food-Intake." Journal of International Medical Research**18**(5): 351-357.
20. Berne, B. J. and R. Pecora (2000). Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics. Mineola, N.Y., Dover Publications.
21. Bhushan, B. (2010). Springer handbook of nanotechnology. Berlin ; New York, Springer.
22. Bierer, D. W. (1990). "Bismuth Subsalicylate - History, Chemistry, and Safety." Reviews of Infectious Diseases**12**: S3-S8.
23. Boone, D. R., R. W. Castenholz, et al. (2001). Bergey's manual of systematic bacteriology. New York, Springer.
24. Borges, A., C. Ferreira, et al. (2013). "Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria." Microb Drug Resist**19**(4): 256-265.
25. Boudreau, M. D., M. S. Imam, et al. (2016). "Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks." Toxicological Sciences**150**(1): 131-160.
26. Brenner, D. J., N. R. Krieg, et al. (2005). Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology, Springer.
27. Briand, G. G. and N. Burford (1999). "Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance." Chem Rev**99**(9): 2601-2657.
28. Brogan, A. P., J. Verghese, et al. (2005). "Bismuth-dithiol inhibition of the Escherichia coli rho transcription termination factor." J Inorg Biochem**99**(3): 841-851.
29. Brooks, G. F. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. K. C. Carroll. Norwalk, Conn., McGraw-Hill: volumes.
30. Bueno, C. E., E. G. Zeferino, et al. (2009). "Study of the bismuth oxide concentration required to provide Portland cement with adequate radiopacity for endodontic use." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**107**(1): e65-69.
31. Camilleri, J. (2008). "Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate." Int Endod J**41**(5): 408-417.
32. Campos-Ibarra, V. D., D.; Velasco-Arias, D.; Almaguer-Flores, A.; Rodil, S.E. (2010). Antimicrobial Effect of Bismuth and Silver Nanoparticles in Oral Species. International Association of Dental Research General Session 2010. I. A. o. D. R. General. Barcelona, Spain.
33. Cao, G. and Y. Wang (2011). Nanostructures & nanomaterials : synthesis, properties, and applications. New Jersey, World Scientific.
34. Carlson, C., S. M. Hussain, et al. (2008). "Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species." J Phys Chem B**112**(43): 13608-13619.
35. Carotenuto, G., C. L. Hison, et al. (2009). "Synthesis and thermoelectric characterisation of bismuth nanoparticles." Journal of Nanoparticle Research**11**(7): 1729-1738.

36. Casado, P. L., I. B. Otazu, et al. (2011). "Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites." Implant Dent**20**(3): 226-235.
37. Cerca, N., S. Martins, et al. (2005). "Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry." J Antimicrob Chemother**56**(2): 331-336.
38. Cook, G. S., J. W. Costerton, et al. (1998). "Biofilm formation by Porphyromonas gingivalis and Streptococcus gordonii." J Periodontal Res**33**(6): 323-327.
39. Copenhagen, U. o. (2001). Esquema de la dispersión de rayos X a bajo ángulo. X-rayUserSupportnexus.dk/About the experimental method.html. E. d. l. d. r. X. a. b. ángulo. University of Copenhagen: Esquema de la dispersión de rayos X a bajo ángulo.
40. Costerton, J. W., G. S. Cook, et al. (1999). The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease. N. H. Newman and M. Wilson. London, Eastman Dental Institute, University College London: 5-14.
41. Costerton, J. W., P. S. Stewart, et al. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science**284**(5418): 1318-1322.
42. Costerton, W., R. Veeh, et al. (2003). "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections." J Clin Invest**112**(10): 1466-1477.
43. Coutinho-Filho, T., G. De-Deus, et al. (2008). "Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**106**(6): e69-77.
44. Chandki, R., P. Banthia, et al. (2011). "Biofilms: A microbial home." J Indian Soc Periodontol**15**(2): 111-114.
45. Chaughule, R. S. and R. V. Ramanujan (2010). Nanoparticles : synthesis, characterization and applications. Stevenson Ranch, Calif., American Scientific Publishers.
46. Chavez de Paz, L. E. (2007). "Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities." J Endod**33**(6): 652-662.
47. Chen, G. X., M. H. Hong, et al. (2004). "A convenient way to prepare magnetic colloids by direct Nd : YAG laser ablation." Applied Surface Science**228**(1-4): 169-175.
48. Chen, L., W. Zhao, et al. (2007). "Characterization of Ag/Pt core-shell nanoparticles by UV-vis absorption, resonance light-scattering techniques." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**68**(3): 484-490.
49. Chrisey, D. B. and G. K. Hubler (1994). Pulsed laser deposition of thin films. New York, J. Wiley.
50. Chu, B. L., T. (2000). "Characterization of nanoparticles by scattering techniques." Journal of Nanoparticle Research**2**: 29-41.
51. Darouiche, R. O. (2004). "Treatment of infections associated with surgical implants." N Engl J Med**350**(14): 1422-1429.
52. De Logu, A., M. L. Pellerano, et al. (2003). "Comparison of the susceptibility testing of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by the XTT colorimetric method and the NCCLS standards method." Int J Antimicrob Agents**21**(3): 244-250.

53. Deb, S., S. Abdulghani, et al. (2002). "Radiopacity in bone cements using an organo-bismuth compound." Biomaterials**23**(16): 3387-3393.
54. Delchier, J. C., P. Malfertheiner, et al. (2014). "Use of a combination formulation of bismuth, metronidazole and tetracycline with omeprazole as a rescue therapy for eradication of *Helicobacter pylori*." Aliment Pharmacol Ther**40**(2): 171-177.
55. Dever, L. A. and T. S. Dermody (1991). "Mechanisms of Bacterial-Resistance to Antibiotics." Archives of Internal Medicine**151**(5): 886-895.
56. Diaz, D., D. Velasco-Arias, et al. (2008). "COLL 212-Synthesis and characterization of small bismuth zero-valent nanoparticles in colloidal dispersion." Abstracts of Papers of the American Chemical Society**236**.
57. Dibbern, H. W. (1978). UV and IR Spectra of Some Important Drugs: Classified in Therapeutic Including Tables of Characteristic UV Absorption Data and Examples for the UV Spectroscopic Identification Drugs. Cantor, Editio Cantor.
58. Dodge, A. G. and L. P. Wackett (2005). "Metabolism of bismuth subsalicylate and intracellular accumulation of bismuth by *Fusarium* sp. strain BI." Appl Environ Microbiol**71**(2): 876-882.
59. Dos Santos, T., J. Varela, et al. (2011). "Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines." Small**7**(23): 3341-3349.
60. Drugs.com (2000). Esquema de la estructura química del Subsalicilato de Bismuto. [drugs.com/ingrediente/bismuth-subsalicylate.html](http://drugs.com/ingrediente/bismuth-subsalicylate.html). E. d. l. e. q. d. S. d. Bismuto. drugs.com, Drugs **2.4x2.4**: Esquema de la estructura química del Subsalicilato de Bismuto.
61. Ehrlich, G. D., F. Z. Hu, et al. (2004). "Intelligent implants to battle biofilms." Asm News**70**(3): 127-133.
62. Ericsson, C. D., D. G. Evans, et al. (1977). "Bismuth subsalicylate inhibits activity of crude toxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*." J Infect Dis**136**(5): 693-696.
63. Ernst, Z. L. M., J. (1963). "The spectrophotometric determination of the dissociation constants of some substituted salicylic acids." Transactions of the Faraday Society**59**(2): 230-240.
64. Espinosa-Cristóbal, L. F. M.-C., G.A.; Martínez-Martínez, R.E.; Loyola-Rodríguez, J.P.; Patiño-Marín, N.; Reyes-Macías, J.F.; Ruiz, F. (2012). "Antimicrobial sensibility of *Streptococcus mutans* serotypes to silver nanoparticles." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**32**(4): 896-901.
65. Esquivel-Gaon, M., S. Anguissola, et al. (2015). "Bismuth-based nanoparticles as the environmentally friendly replacement for lead-based piezoelectrics." Rsc Advances**5**(35): 27295-27304.
66. fabreminerals.com (1977). Bismuto, aspecto metálico. JPG. B. nativo. [www.fabreminerals.com](http://www.fabreminerals.com), Fabre Minerals. **346x271**: TA16D15.
67. Fayaz, A. M., K. Balaji, et al. (2010). "Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria." Nanomedicine**6**(1): 103-109.
68. Figueroa-Quintanilla, D., E. Salazar-Lindo, et al. (1993). "A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease." N Engl J Med**328**(23): 1653-1658.

69. Flores-Castaneda, M., E. Camps, et al. (2015). "Bismuth nanoparticles synthesized by laser ablation in lubricant oils for tribological tests." Journal of Alloys and Compounds**643**: S67-S70.
70. Flores-Castañeda, M. C., E.; Camacho-López, M.; Muhl, S.; García, E.; Figueroa, M. (2015). "Bismuth nanoparticles synthesized by laser ablation in lubricant oils for tribological tests." Journal of Alloys and Compounds**643**: 67-70.
71. Fowler, B. A. and M. J. Sexton (2007). "Bismuth." Handbook on the Toxicology of Metals, 3rd Edition: 433-443.
72. Ge, R., Z. Chen, et al. (2012). "The actions of bismuth in the treatment of Helicobacter pylori infections: an update." Metallomics**4**(3): 239-243.
73. Ghatak, K. P. and S. Bhattacharya (2012). Bismuth : characteristics, production, and applications. Hauppauge, N.Y., Nova Science Publishers.
74. Gibbons, R. J. (1989). "Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases." J Dent Res**68**(5): 750-760.
75. Gibbons, R. J., D. I. Hay, et al. (1991). "Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of Streptococcus gordonii to apatitic surfaces." Infect Immun**59**(9): 2948-2954.
76. Gilbert, P., T. Maira-Litran, et al. (2002). "The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities." Adv Microb Physiol**46**: 202-256.
77. Gondal, M. A. S., T. A.; Drmosh, Q. (2012). "Optical Properties of Bismuth Oxide Nanoparticles Synthesized by Pulsed Laser Ablation in Liquids." Science of Advanced Materials**4**(3-4): 507-510.
78. Gonzalez-Cabezas, C. "The chemistry of caries: remineralization and demineralization events with direct clinical relevance." Dent Clin North Am**54**(3): 469-478.
79. Greulich, C., D. Braun, et al. (2012). "The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range." Rsc Advances**2**(17): 6981-6987.
80. Grossner-Schreiber, B., J. Teichmann, et al. (2009). "Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions." Clinical Oral Implants Research**20**(8): 817-826.
81. Guo, H. J. and J. D. Wang (2009). "Bacterial biofilm on the apical external root surfaces of human teeth associated with chronic periradicular lesions." Beijing Da Xue Xue Bao**41**(5): 571-574.
82. Hadrup, N. and H. R. Lam (2014). "Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - A review." Regulatory Toxicology and Pharmacology**68**(1): 1-7.
83. Hahn, A. B., S.; Chichkov, B. N. (2008). "Influences on nanoparticle production during pulsed laser ablation." Pulse**40**(45): 50.
84. Haiss, W., N. T. K. Thanh, et al. (2007). "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra." Anal Chem**79**(11): 4215-4221.
85. Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et al. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol**2**(2): 95-108.

86. Hampel, C. A. and G. G. Hawley (1973). The Encyclopedia of chemistry. New York,, Van Nostrand Reinhold.
87. Harwig, H. A. and A. G. Gerards (1978). "Electrical-Properties of Alpha, Beta, Gamma and Delta Phases of Bismuth Sesquioxide." Journal of Solid State Chemistry**26**(3): 265-274.
88. Heni, W., L. Vonna, et al. (2015). "Experimental characterization of the nanoparticle size effect on the mechanical stability of nanoparticle-based coatings." Nano Lett**15**(1): 442-449.
89. Heravi, F., M. Ramezani, et al. (2013). "In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide Nano-particles." J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**7**(4): 192-198.
90. Hernandez-Delgadillo, R., A. R. Badireddy, et al. (2015). "Effect of Lipophilic Bismuth Nanoparticles on Erythrocytes." Journal of Nanomaterials.
91. Hernandez-Delgadillo, R., A. R. Badireddy, et al. (2015). "Effect of Lipophilic Bismuth Nanoparticles on Erythrocytes." Journal of Nanomaterials**2015**.
92. Hernandez-Delgadillo, R., D. Velasco-Arias, et al. (2012). "Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit Streptococcus mutans growth and formation of biofilm." Int J Nanomedicine**7**: 2109-2113.
93. Hernandez-Delgadillo, R., D. Velasco-Arias, et al. (2013). "Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit Candida albicans growth and biofilm formation." Int J Nanomedicine**8**: 1645-1652.
94. Hernandez-Delgadillo, R. B., A. R.; Zaragoza-Magaña, V.; Sánchez-Nájera, R. I.; Chellam, S.; Cabral-Romero, C. (2016). "Cytotoxic Effect of Lipophilic Bismuth Dimercaptopropanol Nanoparticles on Epithelial Cells." J Nanosci Nanotechnol**16**(1): 203-209.
95. Hernandez-Sierra, J. F., F. Ruiz, et al. (2008). "The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold." Nanomedicine**4**(3): 237-240.
96. Herrmann, A. (2010). Nanoparticle, Characterization and Instrumentation. Nanometrology Section. N. M. I. Australia. Australia, National Mesearument Institut Australia.
97. Hossain, M. and M. Su (2012). "Nanoparticle location and material dependent dose enhancement in X-ray radiation therapy." J Phys Chem C Nanomater Interfaces**116**(43): 23047-23052.
98. Howe, R. A. and J. M. Andrews (2012). "BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 11)." J Antimicrob Chemother**67**(12): 2783-2784.
99. Hunter, R. J. (2013). Zeta potential in colloid science: principles and applications.
100. Jenkins, S., M. Addy, et al. (1988). "The Mechanism of Action of Chlorhexidine - a Study of Plaque Growth on Enamel Inserts Invivo." J Clin Periodontol**15**(7): 415-424.
101. Jenkinson, H. and R. Lamont (1997). "Streptococcal adhesion and colonization." Crit Rev Oral Biol Med**8**(2): 175-200.
102. Jiang, W., H. Mashayekhi, et al. (2009). "Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles." Environ Pollut**157**(5): 1619-1625.

103. Jones, D. S., C. P. Garvin, et al. (2004). "Relationship between biomedical catheter surface properties and lubricity as determined using textural analysis and multiple regression analysis." Biomaterials**25**(7-8): 1421-1428.
104. Kanaparthi, R. and A. Kanaparthi (2011). "The changing face of dentistry: nanotechnology." Int J Nanomedicine**6**: 2799-2804.
105. Kiley, P. and S. C. Holt (1980). "Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27." Infect Immun**30**(3): 862-873.
106. Killedar, V. V., C. D. Lokhande, et al. (1996). "Preparation and characterization of Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> thin films spray deposited from non-aqueous media." Thin Solid Films**289**(1-2): 14-16.
107. Kim, J. J., H. J. Moon, et al. (2007). "The effect of nanofiller on the opacity of experimental composites." J Biomed Mater Res B Appl Biomater**80**(2): 332-338.
108. Kim, M. H., J. Lee, et al. (2012). "Synthesis and characterization of silver nanoparticle composite with poly(p-Br-phenylsilane)." J Nanosci Nanotechnol**12**(5): 4344-4347.
109. Kim, S. H., V. A. Tramontina, et al. (2012). "Bismuth subgallate as a topical haemostatic agent at the palatal wounds: a histologic study in dogs." Int J Oral Maxillofac Surg**41**(2): 239-243.
110. Kohri, K., E. Yoshida, et al. (2015). "The cytotoxicity of organobismuth compounds with certain molecular structures can be diminished by replacing the bismuth atom with an antimony atom in the molecules." J Toxicol Sci**40**(3): 321-327.
111. Kolenbrander, P. E. (2000). "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems." Annu Rev Microbiol**54**: 413-437.
112. Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, et al. (1999). Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease. N. H. Newman and M. Wilson. London, Eastman Dental Institute, University College London: 171-186.
113. Kopfmaier, P. (1994). "Complexes of Metals Other Than Platinum as Antitumor Agents." European Journal of Clinical Pharmacology**47**(1): 1-16.
114. Krajnovich, D. J., J. E. Vazquez, et al. (1993). "Impurity-driven cone formation during laser sputtering of graphite." Science**259**(5101): 1590-1592.
115. Kricheldorf, H. R. (2009). "Syntheses of biodegradable and biocompatible polymers by means of bismuth catalysts." Chem Rev**109**(11): 5579-5594.
116. Kroll, A., M. H. Pillukat, et al. (2009). "Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges." Eur J Pharm Biopharm**72**(2): 370-377.
117. Kumar, C. S. S. R., J. Hormes, et al. (2005). Nanofabrication towards biomedical applications : techniques, tools, applications, and impact. Weinheim, Wiley-VCH.
118. Kuyyakanond, T. and L. B. Quesnel (1992). "The Mechanism of Action of Chlorhexidine." FEMS Microbiol Lett**100**(1-3): 211-215.
119. Lambert, J. R. (1991). "Pharmacology of bismuth-containing compounds." Reviews of Infectious Diseases**13 Suppl 8**: S691-695.

120. Lambert, J. R. and P. Midolo (1997). "The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection." Aliment Pharmacol Ther**11 Suppl 1**: 27-33.
121. Lang, L. A., P. A. Mattie, et al. (2000). "The effect of triphenylbismuth on the radiopacity and performance properties of compression- and injection-molded denture resins." J Prosthodont**9**(1): 23-29.
122. Lavender, H. F., J. R. Jagnow, et al. (2004). "Biofilm formation in vitro and virulence in vivo of mutants of *Klebsiella pneumoniae*." Infect Immun**72**(8): 4888-4890.
123. Lee, G. J., H. M. Lee, et al. (2007). "Bismuth nano-powder electrode for trace analysis of heavy metals using anodic stripping voltammetry." Electrochemistry Communications**9**(10): 2514-2518.
124. Lee, K., W. S. Seo, et al. (2003). "Synthesis and optical properties of colloidal tungsten oxide nanorods." J Am Chem Soc**125**(12): 3408-3409.
125. Lee, S. B. (2011). "Nanotoxicology: toxicity and biological effects of nanoparticles for new evaluation standards." Nanomedicine (Lond)**6**(5): 759-761.
126. Lee, Y. P., Y. H. Liu, et al. (1999). "Formation of bayerite, gibbsite and boehmite particles by laser ablation." Physical Chemistry Chemical Physics**1**(19): 4681-4686.
127. Lewinski, N., V. Colvin, et al. (2008). "Cytotoxicity of nanoparticles." Small**4**(1): 26-49.
128. Li, Z., D. Lee, et al. (2006). "Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities." Langmuir**22**(24): 9820-9823.
129. Liao, J., A. C. Mo, et al. (2007). "Antibacterial activity of silver-hydroxyapatite/titania nanoparticles on oral bacteria." Bioceramics, Vol 19, Pts 1 and 2**330-332**: 299-302.
130. Lin, G., D. Z. Tan, et al. (2011). "Linear and nonlinear optical properties of glasses doped with Bi nanoparticles." Journal of Non-Crystalline Solids**357**(11-13): 2312-2315.
131. Lin, G. T., D.; Luo, F.; Chen, D.; Zhao, Q.; Qiu, J.; Xu, Z. (2010). "Fabrication and photocatalytic property of  $\alpha$ -Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles by femtosecond laser ablation in liquid." Journal of alloys and compounds**507**(2): 43-46.
132. Listgarten, M. (1999). "Formation of dental plaque and other oral biofilms." In: Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Eastman Dental Institute, University College London: 187-210.
133. Lu, Z., K. Rong, et al. (2013). "Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria." J Mater Sci Mater Med**24**(6): 1465-1471.
134. Luo, Y., M. Hossain, et al. (2013). "Targeted nanoparticles for enhanced X-ray radiation killing of multidrug-resistant bacteria." Nanoscale**5**(2): 687-694.
135. Luo, Y., M. Hossain, et al. (2013). "Targeted nanoparticles for enhanced X-ray radiation killing of multidrug-resistant bacteria." Nanoscale**5**(2): 687-694.
136. Luo, Y., C. Wang, et al. (2012). "In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles." Journal of Materials Science: Materials in Medicine**23**(10): 2563-2573.
137. Luo, Y., C. Wang, et al. (2012). "In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles." J Mater Sci Mater Med**23**(10): 2563-2573.

138. Luo, Y., C. M. Wang, et al. (2012). "In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles." Journal of Materials Science-Materials in Medicine**23**(10): 2563-2573.
139. Lv, K. L., J. X. Zhang, et al. (2007). "Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries." Bioceramics, Vol 19, Pts 1 and 2**330-332**: 267-270.
140. Macklis, R. M., W. D. Kaplan, et al. (1989). "Residents Essay Award - Alpha-Particle Radio-Immunotherapy - Animal-Models and Clinical Prospects." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**16**(6): 1377-1387.
141. Mafune, F., J. Kohno, et al. (2000). "Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution." Journal of Physical Chemistry **B104**(39): 9111-9117.
142. Mafune, F., J. Kohno, et al. (2001). "Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant." Journal of Physical Chemistry **B105**(22): 5114-5120.
143. Mafune, F., J. Y. Kohno, et al. (2002). "Full physical preparation of size-selected gold nanoparticles in solution: Laser ablation and laser-induced size control." Journal of Physical Chemistry **B106**(31): 7575-7577.
144. Mafune, F., J. Y. Kohno, et al. (2003). "Formation of stable platinum nanoparticles by laser ablation in water." Journal of Physical Chemistry **B107**(18): 4218-4223.
145. Mafune, F., J. Y. Kohno, et al. (2003). "Nanoscale soldering of metal nanoparticles for construction of higher-order structures." J Am Chem Soc**125**(7): 1686-1687.
146. Mah, T. F. and G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." Trends Microbiol**9**(1): 34-39.
147. Mahmoudi, M., V. Serpooshan, et al. (2011). "Engineered nanoparticles for biomolecular imaging." Nanoscale**3**(8): 3007-3026.
148. Mahony, D. E., A. Woods, et al. (2005). "Interaction of bismuth subsalicylate with fruit juices, ascorbic acid, and thiol-containing substrates to produce soluble bismuth products active against *Clostridium difficile*." Antimicrob Agents Chemother**49**(1): 431-433.
149. Mandell, R. L., L. S. Tripodi, et al. (1986). "The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis." J Periodontol**57**(2): 94-99.
150. Manhart, M. D. (1990). "In vitro antimicrobial activity of bismuth subsalicylate and other bismuth salts." Reviews of Infectious Diseases**12 Suppl 1**: S11-15.
151. Marsh, P. D. (2004). "Dental plaque as a microbial biofilm." Caries Res**38**(3): 204-211.
152. Marsh, P. D. (2010). "Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries." Dent Clin North Am**54**(3): 441-454.
153. Matano, Y. and H. Suzuki (1996). "A new aspect of organobismuth chemistry: Synthesis, properties, and reactions of bismuthonium compounds." Bulletin of the Chemical Society of Japan**69**(10): 2673-2681.
154. McNeil, S. E. (2011). Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. New York, Humana Press/Springer.
155. Monteiro, D. R., L. F. Gorup, et al. (2009). "The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver." Int J Antimicrob Agents**34**(2): 103-110.

156. Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, et al. (2005). "The bactericidal effect of silver nanoparticles." Nanotechnology**16**(10): 2346-2353.
157. Mueller, A. A., B. Saldamli, et al. (2009). "Oral bacterial cultures in nontraumatic brain abscesses: results of a first-line study." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**107**(4): 469-476.
158. Murphy, T. F. and C. Kirkham (2002). "Biofilm formation by nontypeable Haemophilus influenzae: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili." BMC Microbiol**2**: 7.
159. Murray, P. R., K. S. Rosenthal, et al. (2009). Medical microbiology. Philadelphia, Mosby/Elsevier.
160. Nazari, P., R. Dowlatabadi-Bazaz, et al. (2014). "The antimicrobial effects and metabolomic footprinting of carboxyl-capped bismuth nanoparticles against Helicobacter pylori." Appl Biochem Biotechnol**172**(2): 570-579.
161. Nomoto, R., M. Komoriyama, et al. (2004). "Effect of mixing method on the porosity of encapsulated glass ionomer cement." Dental Materials**20**(10): 972-978.
162. Owen, T. (2000). Fundamentos de Espectroscopia UV-Visible. Alemania.
163. Pacifico, L., J. F. Osborn, et al. (2012). "Review article: bismuth-based therapy for Helicobacter pylori eradication in children." Aliment Pharmacol Ther**35**(9): 1010-1026.
164. Pamphlett, R., G. Danscher, et al. (2000). "Tissue uptake of bismuth from shotgun pellets." Environ Res**82**(3): 258-262.
165. Pamphlett, R., M. Stoltenberg, et al. (2000). "Uptake of bismuth in motor neurons of mice after single oral doses of bismuth compounds." Neurotoxicol Teratol**22**(4): 559-563.
166. Parahitiyawa, N. B., L. J. Jin, et al. (2009). "Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis." Clin Microbiol Rev**22**(1): 46-64, Table of Contents.
167. Parker, W. L. and P. Boudjouk (1990). "Chemical-Reactivity of Metal Particles Produced by Laser Ablation into Liquids." Laser Ablation for Materials Synthesis**191**: 103-107.
168. Peng, J. J. Y., M. G. Botelho, et al. (2012). "Silver compounds used in dentistry for caries management: A review." Journal of Dentistry**40**(7): 531-541.
169. Polte, J., T. T. Ahner, et al. (2010). "Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation." J Am Chem Soc**132**(4): 1296-1301.
170. Pratt, L. A. and R. Kolter (1998). "Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." Mol Microbiol**30**(2): 285-293.
171. Preshaw, P. M., R. A. Seymour, et al. (2004). "Current concepts in periodontal pathogenesis." Dent Update**31**(10): 570-572, 574-578.
172. Promega (2012). CellTiter 96 (R) AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Cell Proliferation. USA, Promega: 12.
173. Rai, M. K., S. D. Deshmukh, et al. (2012). "Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria." J Appl Microbiol**112**(5): 841-852.

174. Rao, C. N. R., A. Müller, et al. (2004). The chemistry of nanomaterials : synthesis, properties and applications in 2 volumes. Weinheim, Wiley-VCH.
175. Rawls, H. R., M. V. Marshall, et al. (1992). "Cytotoxicity Evaluation of a New Radiopaque Resin Additive Triphenyl Bismuth." Dental Materials**8**(1): 54-59.
176. Ray, T. R., B. Lettiere, et al. (2015). "Quantitative characterization of the colloidal stability of metallic nanoparticles using UV-vis absorbance spectroscopy." Langmuir**31**(12): 3577-3586.
177. Reim, N., A. Littig, et al. (2013). "Controlled Electrodeposition of Bismuth Nanocatalysts for the Solution-Liquid-Solid Synthesis of CdSe Nanowires on Transparent Conductive Substrates." J Am Chem Soc**135**(49): 18520-18527.
178. Roche (2011). Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Technical bulletin. Cell Viability. Germany, Roche Diagnostics GmbH: 1-6.
179. Roslev, P. and G. M. King (1993). "Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria." Appl Environ Microbiol**59**(9): 2891-2896.
180. Roveri, N., E. Battistella, et al. (2009). "Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects." Journal of Nanomaterials: -.
181. Roy, A., S. S. Gauri, et al. (2013). "Antimicrobial activity of caO nanoparticles." J Biomed Nanotechnol**9**(9): 1570-1578.
182. Ryu, J. H. and L. R. Beuchat (2005). "Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine." Appl Environ Microbiol**71**(1): 247-254.
183. Sadeghi, R. O., P.; Rezvani, MB.; Taleghani, F.; Sharif, F. (2010). "Comparison of the nanosilver and chlorhexidin antimicrobial effect on Streptococcus sanguinis and Actinomicosis viscosus." Journal of Islamic Dental Association**23**.
184. Saxton, C. (1973). "Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque." Caries Res**7**(2): 102-119.
185. Scannapieco, F. A. (1994). "Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology." Crit Rev Oral Biol Med**5**(3-4): 203-248.
186. Schmid, G. (2004). Nanoparticles. From theory to application. USA, Weinheim: Wiley-VCH. **2**: 1234-1500.
187. Sen, D., O. Spalla, et al. (2007). "Slow drying of a spray of nanoparticles dispersion. In situ SAXS investigation." Langmuir**23**(8): 4296-4302.
188. Seneviratne, C. J., K. C. Leung, et al. (2014). "Nanoparticle-encapsulated chlorhexidine against oral bacterial biofilms." PLoS One**9**(8): e103234.
189. Seneviratne, C. J., K. C. F. Leung, et al. (2014). "Nanoparticle-Encapsulated Chlorhexidine against Oral Bacterial Biofilms." PLoS One**9**(8).
190. Serena, T. E., L. K. S. Parnell, et al. (2007). "Bismuth subgallate/borneal (suile) vs. nanocrystalline silver in the human forearm biopsy model for acute wound healing." Wound Repair and Regeneration**15**(2): A15-A15.

191. Seven, N., A. Ayyildiz, et al. (1989). "[The characteristics of antibacterial root canal-filling materials]." Mikrobiyol Bul**23**(4): 361-368.
192. Shafer, W. G., M. K. Hine, et al. (1983). A textbook of oral pathology. Philadelphia, Saunders.
193. Shaikh, A. R., R. Giridhar, et al. (2007). "Bismuth-norfloxacin complex: synthesis, physicochemical and antimicrobial evaluation." Int J Pharm**332**(1-2): 24-30.
194. Shang, L., K. Nienhaus, et al. (2014). "Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters." J Nanobiotechnology**12**: 5.
195. Sigma-Aldrich (2010). In Vitro Toxicology Assay kit, XTT Based. Technical Bulletin. Cell Viability and Proliferation. St, Louis USA, Sigma-Aldrich: 2.
196. Slikkerveer, A. and F. A. de Wolff (1989). "Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds." Med Toxicol Adverse Drug Exp**4**(5): 303-323.
197. Slots, J. and M. A. Taubman (1992). Contemporary Oral Microbiology and Immunology. U S A, Mosby.
198. Soares, G. M. S., L. C. Figueiredo, et al. (2012). "Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs." Journal of Applied Oral Science**20**(3): 295-309.
199. Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). "Periodontal microbial ecology." Periodontol**200038**: 135-187.
200. Song, Q., Y. P. Liu, et al. (2014). "The acute cytotoxicity of bismuth ferrite nanoparticles on PC12 cells." Journal of Nanoparticle Research**16**(5).
201. Song, Q. L., Y.; Jiang, Z.; Tang, M.; Li, Y.; Wei, F.; Cheng, G. (2013). "The acute cytotoxicity of bismuth ferrite nanoparticles on PC12 cells." Journal of Nanoparticle Research**16**(1).
202. Sox, T. E. and C. A. Olson (1989). "Binding and killing of bacteria by bismuth subsalicylate." Antimicrob Agents Chemother**33**(12): 2075-2082.
203. Spence, J. C. H. (2003). High-resolution electron microscopy. Oxford ; New York, Oxford University Press.
204. Staedler, D., S. Passemard, et al. (2015). "Cellular uptake and biocompatibility of bismuth ferrite harmonic advanced nanoparticles." Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**11**(4): 815-824.
205. Stahlhut, S. G., C. Struve, et al. (2012). "Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae." FEMS Immunol Med Microbiol**65**(2): 350-359.
206. Standards, N. C. f. C. L. (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
207. Starner, T. D., N. Zhang, et al. (2006). "Haemophilus influenzae forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med**174**(2): 213-220.
208. Stoltenberg, M. and G. Danscher (2000). "Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections." Histochem J**32**(11): 645-652.

209. Stoltenberg, M., G. Danscher, et al. (2000). "Histochemical tracing of bismuth in testis from rats exposed intraperitoneally to bismuth subnitrate." Reprod Toxicol**14**(1): 65-71.
210. Stoltenberg, M., A. Larsen, et al. (2002). "Bismuth-induced lysosomal rupture in J774 cells." APMIS**110**(5): 396-402.
211. Stoltenberg, M., J. D. Schionning, et al. (2001). "Retrograde axonal transport of bismuth: an autometallographic study." Acta Neuropathol**101**(2): 123-128.
212. Stratton, C. W., R. R. Warner, et al. (1999). "Bismuth-mediated disruption of the glycocalyx-cell wall of *Helicobacter pylori*: ultrastructural evidence for a mechanism of action for bismuth salts." J Antimicrob Chemother**43**(5): 659-666.
213. Svergun, D. I., L. A. Feigin, et al. (1987). Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering. New York, Plenum Press.
214. Taylor, E. A. O. D. (1950). "A convenient demonstration of diamagnetism." Journal of Chemical Education**27**(8): 457.
215. Theilade, E., J. Theilade, et al. (1982). "Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans." J Periodontal Res**17**(1): 12-25.
216. Tillman, L. A., F. M. Drake, et al. (1996). "Review article: safety of bismuth in the treatment of gastrointestinal diseases." Aliment Pharmacol Ther**10**(4): 459-467.
217. Tomita, R. J., R. A. de Matos, et al. (2014). "A simple and effective method to synthesize fluorescent nanoparticles using tryptophan and light and their lethal effect against bacteria." J Photochem Photobiol B**140**: 157-162.
218. Tomsia, A. P., M. E. Launey, et al. (2011). "Nanotechnology Approaches to Improve Dental Implants." International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**26**: 25-44.
219. Tramontina, V. A., M. A. Machado, et al. (2002). "Effect of bismuth subgallate (local hemostatic agent) on wound healing in rats. Histological and histometric findings." Braz Dent J**13**(1): 11-16.
220. Trampuz, A. and W. Zimmerli (2005). "New strategies for the treatment of infections associated with prosthetic joints." Curr Opin Investig Drugs**6**(2): 185-190.
221. Tsuji, T. (2012). "Preparation of Nanoparticles Using Laser Ablation in Liquids: Fundamental Aspects and Efficient Utilization." Laser Ablation in Liquids: Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials: 207-268.
222. Tunney, M. M., G. Ramage, et al. (2004). "Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother**48**(5): 1879-1881.
223. Vargas-Reus, M. A., K. Memarzadeh, et al. (2012). "Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens." Int J Antimicrob Agents**40**(2): 135-139.
224. Vega-Gonzalez, M. and X. Bokhimi (2007). "Atomic distribution and morphology of colloidal particles precursors of bismuthinite." Journal of Physical Chemistry C**111**(1): 188-193.
225. Velasco-Arias, D., I. Zumeta-Dube, et al. (2012). "Stabilization of Strong Quantum Confined Colloidal Bismuth Nanoparticles, One-Pot Synthesized at Room Conditions." Journal of Physical Chemistry C**116**(27): 14717-14727.

226. Wadhvani, T. D., K.; Patel, D.; Lawani, D.; Bahaley, P.; Joshi, P.; Kothari, V. (2008). "Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials." Journal of Microbiology**7**(1): 204-211.
227. Wagner, K. W., R. Schon, et al. (2006). "Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**102**(4): e21-23.
228. Wang, F. and W. E. Buhro (2010). "An easy shortcut synthesis of size-controlled bismuth nanoparticles and their use in the SLS growth of high-quality colloidal cadmium selenide quantum wires." Small**6**(4): 573-581.
229. Wang, L., Z. L. Cui, et al. (2007). "Bi nanoparticles and Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanorods formed by thermal plasma and heat treatment." Surface & Coatings Technology**201**(9-11): 5330-5332.
230. Wang, X., H. Lunsdorf, et al. (2010). "Characteristics of biofilms from urinary tract catheters and presence of biofilm-related components in *Escherichia coli*." Curr Microbiol**60**(6): 446-453.
231. Wang, Z., Y. H. Lee, et al. (2010). "Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles." Chemosphere**80**(5): 525-529.
232. Warren, B. E. (1990). X-ray diffraction. New York, Dover Publications.
233. Willcox, R. R. (1948). "The role of bismuth oxychloride in the treatment of syphilis." Practitioner**161**(963): 203.
234. Winn, W. J., S. Allen, et al. (2005). Koneman's Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
235. Xiao, Y., F. Patolsky, et al. (2003). "'Plugging into enzymes': Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle." Science**299**(5614): 1877-1881.
236. Xie, H., G. S. Cook, et al. (2000). "Intergeneric communication in dental plaque biofilms." J Bacteriol**182**(24): 7067-7069.
237. Yang, G. (2012). Laser Ablation in Liquids: Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials, Pan Stanford.
238. Yang, G. (2012). Laser ablation in liquids: principles and applications in the preparation of nanomaterials. G. Yang. Boston, Pan Stanford Publishing Pte Ltd: 1192.
239. Yeh, M. S., Y. S. Yang, et al. (1999). "Formation and characteristics of Cu colloids from CuO powder by laser irradiation in 2-propanol." Journal of Physical Chemistry B**103**(33): 6851-6857.
240. Zambon, J. J., C. DeLuca, et al. (1983). "Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line." Infect Immun**40**(1): 205-212.
241. Zeng, H. D., X.; Singh, S; Kulinich, S (2012). "Nanomaterials via Laser Ablation/Irradiation in Liquid: A Review." Advanced Functional Materials**22**(2): 1333-1353.

## ANEXOS.

### a. Ensayo piloto para la determinación actividad antibacteriana de diferentes compuestos de bismuto.

Diez compuestos basados en Bismuto (**tabla 1**), fueron utilizados para la determinación de unidades formadoras de colonia (CFU). Se utilizaron cuatro cepas bacterianas (**tabla 2**).

**Tabla 1. Compuestos de Bismuto**

Nombre
1. Bioclop UVS
2. Subnitrate de Bismuto
3. Subgalato de Bismuto
4. Pearl 2600 UVS
5. Satín B UVS
6. Citrato de Bismuto
7. Subcitrato de Bismuto
8. Bismuto metálico en polvo
9. Trióxido de Bismuto
10. Subsalicato de Bismuto

**Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas para determinar la efectividad anti-microbiana de diferentes compuestos de Bismuto.**

Especie	ATCC*
<i>Escherichia coli</i>	33780
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43636
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990

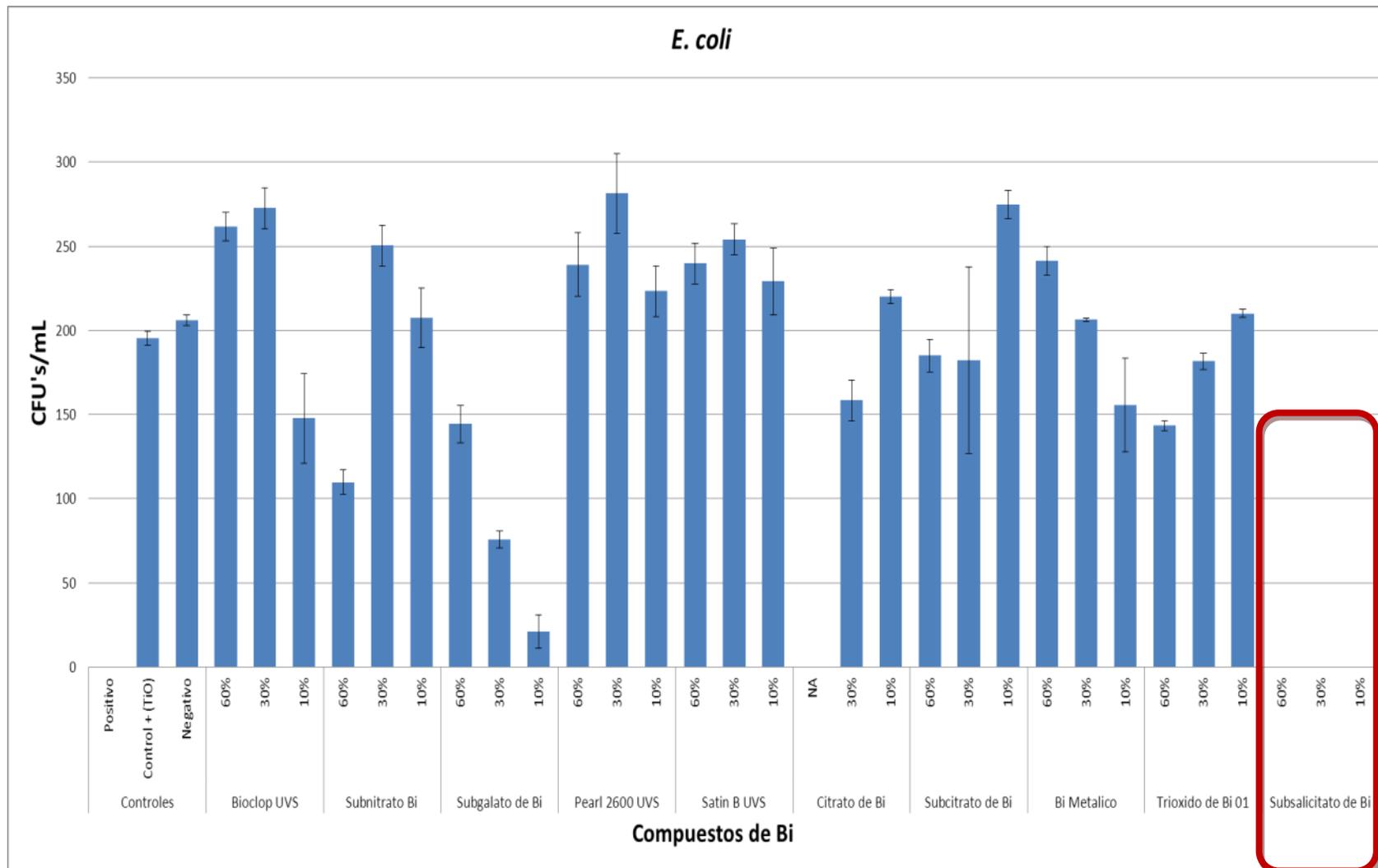
\* American Type Culture Collection, Rockville, MD

Se recolectó el crecimiento de cada cepa en cultivo puro de la superficie del agar y se suspendió en un tubo con medio caldo enriquecido TSB. La densidad óptica (D.O.) de cada tubo será ajustada a 1 en un espectrofotómetro (600 nm) para obtener  $1 \times 10^9$  células/mL. Posteriormente, se realizaron 5 diluciones seriadas y 100  $\mu$ l de cada dilución fueron sembrados por triplicado en placas de agar enriquecido TSA con y con diferentes

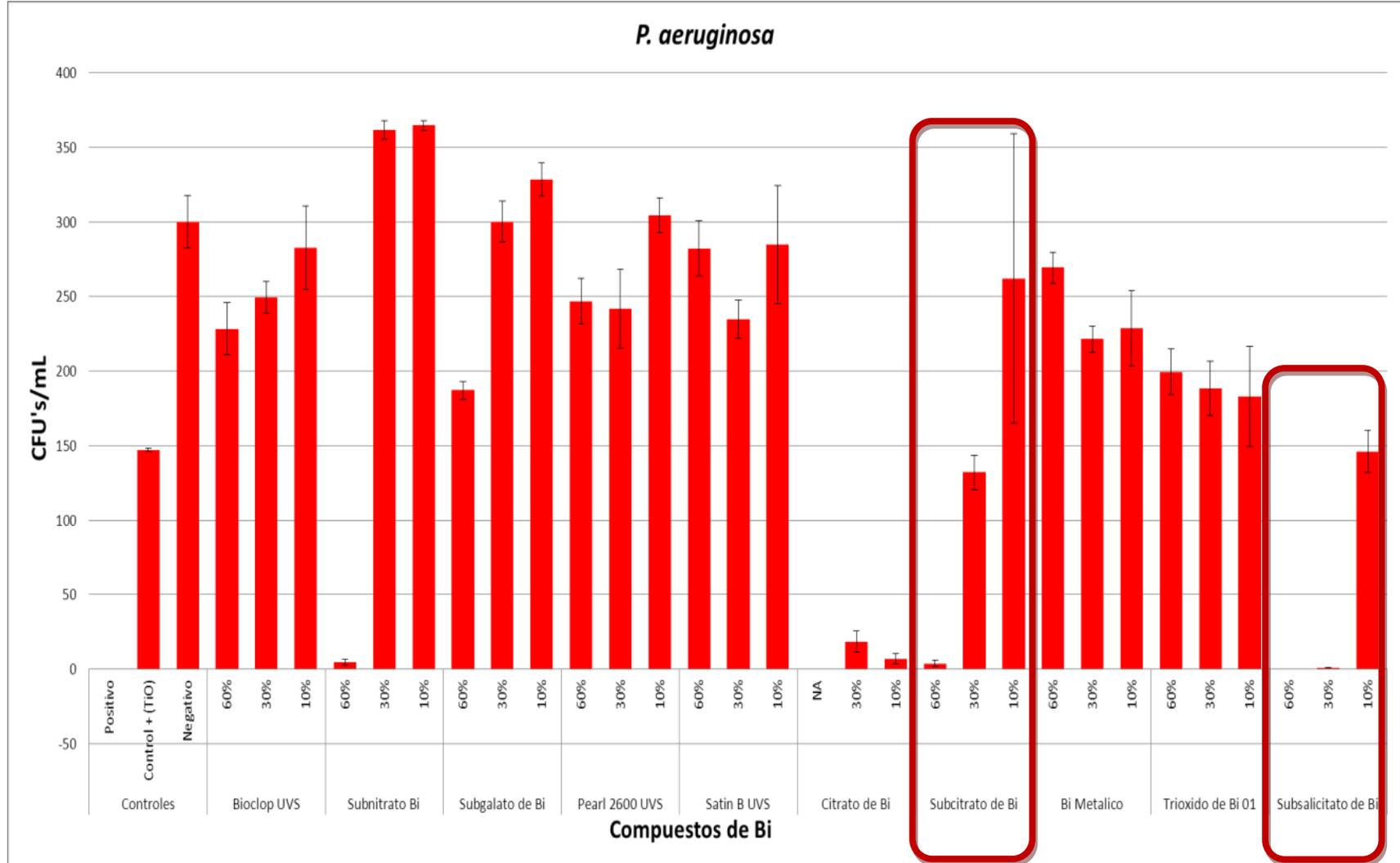
concentraciones (10, 30 y 60% de cada compuesto de Bismuto). En cada experimento, se utilizó como control positivo placas de agar enriquecido TSA adicionados con 256 µg/mL de ciprofloxacina. Todas las placas fueron incubadas en condiciones anaeróbicas dependiendo de la cepa durante 3 días. Después de la incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (CFUs) que crecieron en las placas con compuestos de Bismuto como en las placas sin antibiótico.

## RESULTADOS

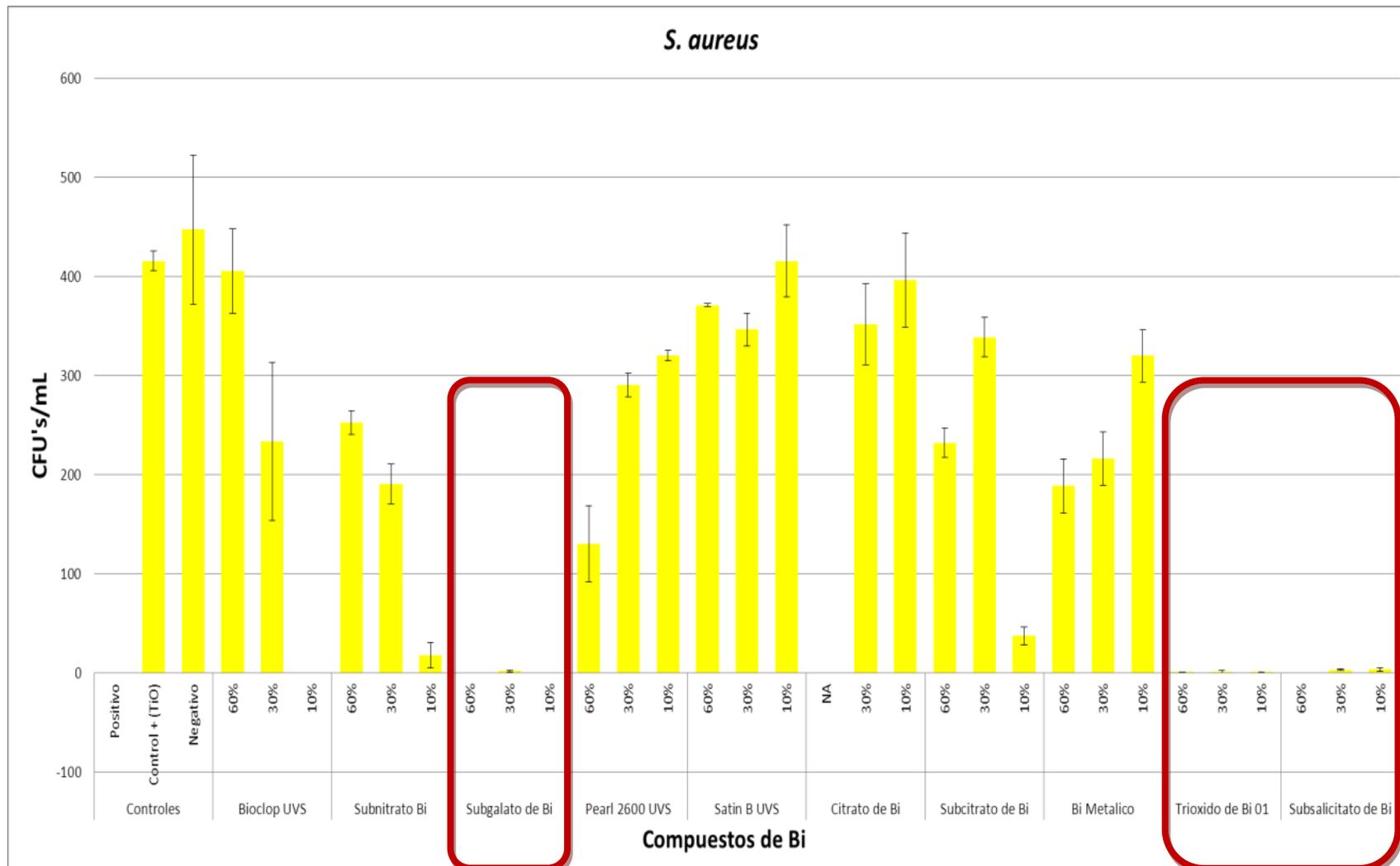
Los resultados del efecto antibacteriano de los compuestos de bismuto contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis* se presentan en las **figuras 1-4**. *E. coli* fue muy sensible al subsalicilato de bismuto, ya que no se pudo contar ninguna CFUs en las placas de agar con cualquiera de las concentraciones indicadas (**figura 1**). Con respecto a *P. aeruginosa*, el subsalicilato de bismuto y subcitrato de bismuto también fueron eficaces en la inhibición del crecimiento de esta cepa. El número de CFUs en presencia de subsalicilato de bismuto en 10, 30 y 60% de concentración, fue de  $146 \pm 14.2$ ,  $1 \pm 0.6$  y  $0 \pm 0$ , respectivamente, mientras que en presencia de subcitrato de bismuto el número de UFC fueron ( $262 \pm 54$ ,  $132 \pm 11$  y  $4 \pm 2.1$ ) en concentraciones de 10, 30 y 60%, respectivamente (**figura 2**). *S. aureus* mostró mayor inhibición de su crecimiento en presencia del subsalicilato de bismuto, subgalato de bismuto y trióxido de bismuto, ya que no se pudieron detectar CFUs en la concentración de 60% (**figura 3**). Finalmente, *S. epidermidis* fue sensible al subsalicilato de bismuto ( $114 \pm 12$ ,  $2 \pm 1.5$ ,  $0 \pm 0.3$ ) y Pearl 2600 UVS ( $139 \pm 23$ ,  $41 \pm 8$  y  $0 \pm 0$ ) en presencia de 10, 30 y 60% concentración de estos compuestos, respectivamente (**figura 4**).



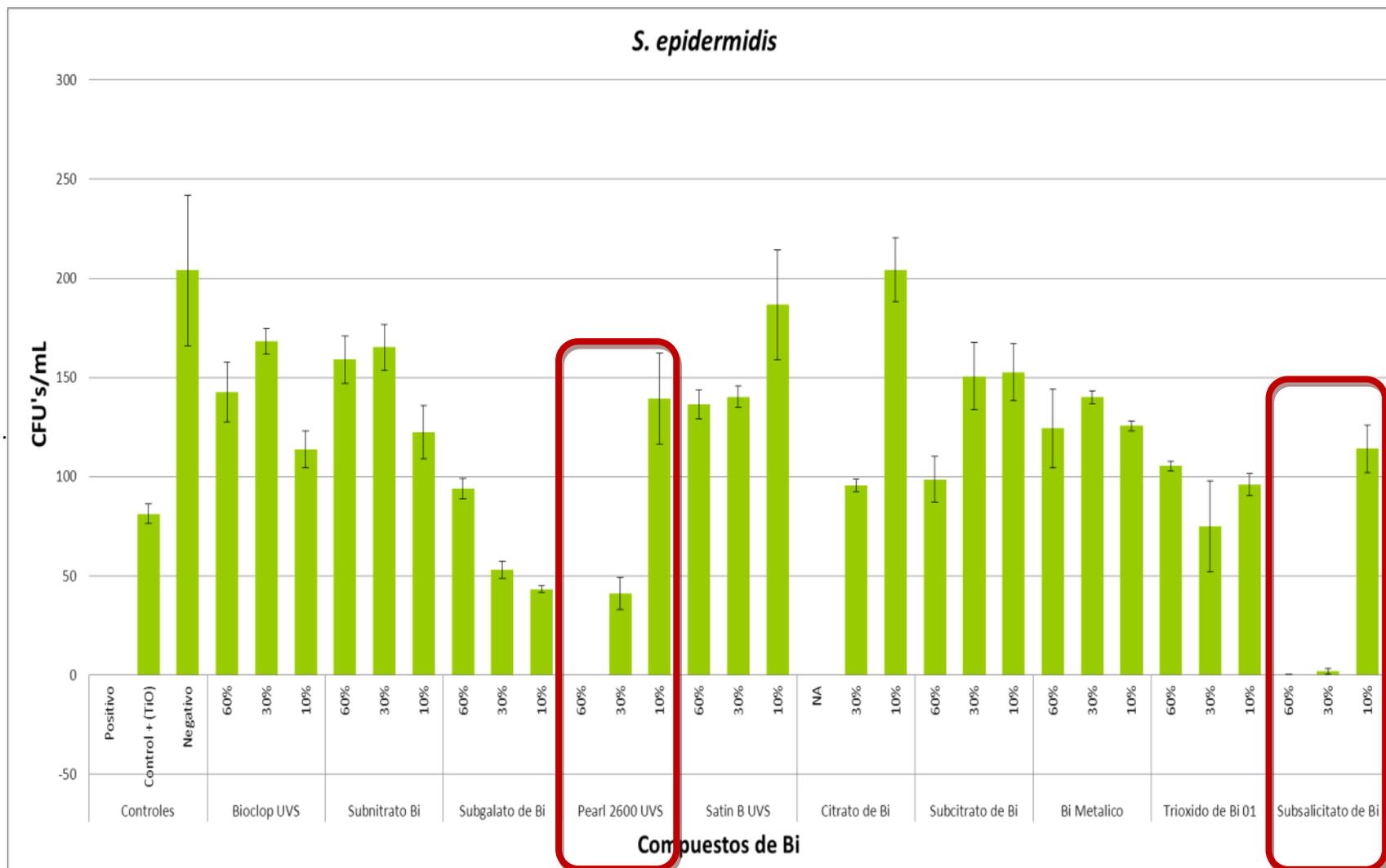
**Figura 1.** Efecto antibacteriano (CFUs) de diferentes compuestos de Bismuto en diferentes concentraciones (10, 30 y 60%), en contra de *Escherichia coli*. El recuadro rojo indica el mejor efecto antibacteriano. Media ± DE de 3 experimentos por triplicado.



**Figura 2.** Efecto antibacteriano (CFUs) de diferentes compuestos de Bismuto en diferentes concentraciones (10, 30 y 60%), en contra de *Pseudomonas aeruginosa*. El recuadro rojo indica el mejor efecto antibacteriano. Media ± DE de 3 experimentos por triplicado.



**Figura 3.** Efecto antibacteriano (CFUs) de diferentes compuestos de Bismuto en diferentes concentraciones (10, 30 y 60%), en contra de *Staphylococcus aureus*. El recuadro rojo indica el mejor efecto antibacteriano. Media  $\pm$  DE de 3 experimentos por triplicado.



**Figura 4.** Efecto antibacteriano (CFUs) de diferentes compuestos de Bismuto en diferentes concentraciones (10, 30 y 60%), en contra de *Staphylococcus epidermidis*. El recuadro rojo indica el mejor efecto antibacteriano. Media  $\pm$  DE de 3 experimentos por triplicado.

