



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTÍCULAS DE SUBSALICILATO DE BISMUTO
SINTETIZADAS POR ABLACIÓN LÁSER SOBRE MICROORGANISMOS
SUBGINGIVALES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

C. D. LORENA REYES CARMONA

TUTORES:

DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES

Facultad de Odontología, UNAM

DR. EDGAR ENRIQUE CAMPS CARVAJAL

Instituto Nacional De Investigaciones Nucleares

COMITÉ TUTOR:

DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA

Instituto de Investigaciones en Materiales

DR. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ

Facultad de Odontología, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX. Septiembre, 2020



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.

DEDICATORIAS

*Esta tesis va dedicada, principalmente a mi papá el **Dr. RICARDO REYES CERVANTES**, gracias por guiar mi camino a través de tu ejemplo y sabiduría. Por siempre haberme apoyado en cada etapa de mi vida, por cuidarme, amarme, aconsejarme, por estar para mi hermano César y para mí de forma incondicional.*

Y a pesar de que no pude enseñarte este trabajo finalizado, sé que te habría dado mucha alegría que me siga superando profesionalmente. Esta nueva meta ha sido posible gracias a ti. Te amo y siempre te amaré papá. ¡En tus manos tienes una gran parte de mi corazón!

*A mi mamá y colega la **Dra. Esperanza Carmona Mendoza**, gracias por tu amor incondicional, por apoyarme día con día, motivarme a seguir adelante, escucharme, aconsejarme, guiarme para ser mejor persona a través de tus enseñanzas, por estar siempre presente con todo tu cariño to kelo mi om nom y gracias por ser la mejor mamá del universo.*

*Al mejor hermano mayor que dios, mis padres y la vida me pudieron haber dado, el **Ing. César Ricardo Reyes Carmona**, gracias bro por tu apoyo, por cuidarme, por tus consejos, por ser siempre un gran equipo y gracias por todas las risas juntos que hacen más divertida la vida, To kelo.*

*A mi prima la **chef. Abril Karina**, gracias por todo tu cariño, risas y apoyo en los inicios de mi maestría, eres la mejor teacher.*

*Al **Lic. Pedro David Reyes Martínez**, sabes que eres como mi otro hermano mayor, gracias por siempre estar unidos desde que somos niños, para los buenos y malos momentos, por tu confianza y tu cariño. A mi padrino el **Ing. David Reyes Cervantes**, por siempre brindarme tu cariño, sabiduría, consejos y por todo el apoyo que me has brindado desde el momento que nací.*

*Al **MSc. Diego Andrade**, por haberme alentado a realizar la maestría, por siempre aconsejarme, apoyarme, escucharme, levantarme el ánimo día con día, sobre todo en los momentos difíciles. Gracias por estar al pendiente de mí, por ser un ejemplo profesional y académico, pero en especial, por todo tu cariño y por compartir a lo largo del tiempo diversas metas y sueños juntos.*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Argelia Almaguer Flores, por confiar en mí y darme la oportunidad de pertenecer al laboratorio y a su equipo de trabajo para la elaboración de este proyecto. Gracias por ser una gran líder en el laboratorio, por su paciencia, amabilidad, por no solo guiar mi formación académica, sino también, enseñarme con su ejemplo a ser mejor persona. La admiro mucho y me considero muy afortunada de haber podido trabajar con usted, muchas gracias Dra. Arge.

Al Dr. Enrique Camps, por aceptarme como alumna, por compartirme sus conocimientos, enseñanzas, experiencia científica con la mejor disposición y amabilidad. Por su confianza, paciencia y por guiarme día con día para desarrollar este proyecto. Dr. Camps, para mí ha sido todo un honor que usted fuera mi cotutor durante mis estudios de maestría.

A mi comité tutor: A la Dra. Sandra Rodil, por sus enseñanzas en técnicas de caracterización y sus valiosas observaciones. Al Dr. Víctor Irahuen García, que aparte de formar parte de mi comité tutor, agradezco su apoyo, amabilidad brindada en el laboratorio y por siempre hacerme sentir bienvenida.

Al Dr. Marco A. Álvarez, al Dr. Jesús A. Arenas, a la Dra. Phaedra Silva y al Dr. David M. Giraldo por aceptar formar parte de mi jurado y tomarse el tiempo de leer este escrito, por sus valiosos comentarios enriquecieron este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por aceptarme en sus instalaciones, por permitirme desarrollar gran parte de los experimentos que eran fundamentales para llevar a cabo este proyecto de investigación y que pudiera ampliar mi panorama de la ciencia.

A los integrantes del laboratorio de plasmas de microondas y ablación láser del ININ, al Dr. Enrique Campos, por apoyarme en el uso de los equipos, con las mediciones realizadas por TEM, por su paciencia, comentarios y aportaciones para desarrollar este proyecto. A la Dra. Mariela Flores, por enseñarme a realizar la síntesis de NPs por medio de la técnica de ablación láser, apoyarme con la elaboración de los blancos, por todo el apoyo brindado para determinar la concentración e instruirme en muchas cosas con respecto al proyecto. Gracias a ambos por siempre hacerme sentir bienvenida en el laboratorio, por sus enseñanzas, por sus pláticas divertidas y enriquecedoras.

A todos los integrantes del laboratorio de Genética Molecular, principalmente a Xime, gracias por ser mi amiga, por apoyarme en un sinfín de ocasiones para lo académico y personal, gracias por siempre escucharme, explicarme, ayudarme, por todos los bonitos momentos dentro y fuera del laboratorio. A Gina, a quien admiro por ser una mujer tan brillante y siempre tratarme de la manera más amable, gracias por tu amistad, por todas tus aportaciones en este proyecto y por la bonita convivencia en el laboratorio. A Miryam y Víctor, por siempre brindarme su atención y confianza ante cualquier duda o dificultad que tuviera en el laboratorio, por sus observaciones en los seminarios y por las buenas pláticas en la comida que día con día hace mejor la convivencia en el laboratorio.

A la Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie, por sus enseñanzas en el uso y funcionamiento de cámara de anaerobiosis y compartir algunas historias que demuestran su pasión por la ciencia. A la Dra. Patricia Rodríguez, por su amabilidad, por las buenas pláticas en el laboratorio y la técnico Leticia Cruz, por apoyarme en la realización de mis experimentos.

De la clínica de Periodoncia e Implantología a la Esp. Velia Jacobo Soto, por todo su apoyo para la toma de muestras, a los alumnos de 1er año de la especialidad de periodoncia y principalmente a los pacientes de la clínica que gracias a su participaron voluntaria fue posible este estudio.

Al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) y a la técnico Selene Islas, por la caracterización de las muestras mediante la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR).

Al Laboratorio de Genómica Clínica, principalmente a la Dra. Gabriela Mercado, por permitirme trabajar en su laboratorio para poder llevar a cabo diversos experimentos de esta investigación, con la mejor disposición y amabilidad.

A mis amigos Pepe y Abbie, por vernos de manera express en el posgrado, pero siempre estar apoyándonos. A mis compañeros del posgrado Marisol, Nicté, Israel, Vero, Rita principalmente:

A Lupita, que desde el propedéutico nos hemos acompañado, por todas las aventuras que pasamos en este tiempo, a veces eran ojeras, desvelos, estrés, risas, memes o hasta enojos y tristezas. Gracias por esos cafés a cualquier hora del día ya sea para seguir estudiando o levantarnos el ánimo.

A Eze, por todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio, por ayudarme con la mejor disposición en mis experimentos, enseñarme tus técnicas del laboratorio, por todas esas pláticas e incluso risas que hicieron más divertidas las clases y por tanto la maestría.

A Dany, gracias por recordarme que debo echarle ganas a todo, por compartirme tus conocimientos con la mejor actitud, ayudarme con algunos programas de computación, por tomarte el tiempo para leer este escrito y enriquecerlo con tus observaciones. Principalmente, por todos los momentos compartidos y enseñarme a dejar que la vida fluya.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (con número 719797) para realizar el presente proyecto de investigación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), de UNAM con el número de proyecto IT200319.

Y un eterno agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, por formarme en sus aulas desde los 14 años en la ENP 4, posteriormente como Cirujana Dentista en la Facultad de Odontología y por continuar dirigiendo mi camino académico en esta etapa de Posgrado.

Orgullosamente puma, orgullosamente UNAM.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1. BISMUTO	3
1.1 Propiedades y aplicaciones en Medicina y Odontología	4
1.2 Subsalicilato de bismuto y usos terapéuticos.....	5
2. NANOTECNOLOGÍA.....	8
2.1 Materiales nanoestructurados utilizados en el área Médico-Odontológica....	9
2.2 Nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB).....	11
2.3 Síntesis de nanopartículas por Ablación láser	12
2.4 Técnicas de caracterización de nanopartículas	13
2.4.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).....	13
2.4.2 Difracción de Rayos X (XRD).....	15
2.4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	16
2.4.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	18
3. ECOLOGÍA MICROBIANA ORAL.....	19
3.1 Formación y composición de la biopelícula dental	20
3.2 Enfermedades periodontales.....	23
3.3 Control químico de la biopelícula dental utilizado la terapia periodontal	26
3.4 Microbioma oral humano	30
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	31
III. HIPÓTESIS	33
IV. OBJETIVOS	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SUBSALICILATO DE BISMUTO POR ABLACIÓN LASER (NPs-SSB).....	34
3. CARACTERIZACIÓN DE NPs-SSB.....	36
3.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis)	36
3.2 Difracción de Rayos X (XRD).....	41
3.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	41
3.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	42
4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NPs-SSB	42
4.1 Población de estudio	42
4.1.1 Criterios de selección.....	43

4.1.2	Evaluación clínica periodontal.....	44
4.1.3	Toma de muestras.....	45
4.2	Evaluación microbiológica	46
4.3	Ensayos de susceptibilidad <i>in vitro</i>	46
4.4	Extracción y cuantificación de DNA bacteriano	48
VI.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
VII.	RESULTADOS	50
1.	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPS-SSB.....	50
1.1	Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis)	50
1.2	Difracción de Rayos X (XRD).....	52
1.3	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	53
1.4	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	56
2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE NPs-SSB	57
2.1	Características clínicas de la población de estudio	57
2.2	Evaluación microbiológica	57
2.3	Extracción y cuantificación de DNA bacteriano	58
VIII.	DISCUSIÓN	60
IX.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
X.	REFERENCIAS	72
ANEXOS	83
I.	Consentimiento informado	83
II.	Ficha clínica periodontal.....	88

RESUMEN.

Introducción: El subsalicilato de bismuto (SSB) es un compuesto organometálico, que ha sido utilizado en el área médica por sus diferentes propiedades terapéuticas, entre ellas su capacidad antimicrobiana. Por otra parte, las enfermedades periodontales de origen infeccioso, siguen siendo altamente prevalentes en la población adulta a nivel mundial, por lo que el trabajo interdisciplinario con otras áreas como la nanotecnología, que se encarga de la manipulación de diversos materiales a escala nanométrica, puede generar nuevas alternativas terapéuticas con potencial antimicrobiano para el tratamiento de este tipo de infecciones orales.

Objetivo: El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) sintetizadas por ablación láser sobre microorganismos provenientes de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

Materiales y métodos: Las nanopartículas se sintetizaron por medio de la técnica de ablación láser de un material sólido inmerso en un medio líquido (ALSL). La caracterización de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, se realizó mediante diferentes técnicas analíticas tales como: Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS), Difracción de Rayos X (XRD), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Para la evaluación de la actividad antibacteriana de las NPs, se tomaron dos muestras de biopelícula subgingival de 5 pacientes con periodontitis (n=10). El efecto antibacteriano de las NPs-SSB (% de inhibición de la flora total cultivable de las muestras clínicas) fue determinado mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) presentes en placas de agar solo o adicionado con NPs-SSB (16.6 µg/mL), usando 16 µg/mL de amoxicilina como control positivo. Adicionalmente, se realizó la extracción y cuantificación del DNA bacteriano presente en los cultivos de las placas de agar que tenían de 30-300 UFCs y se corroboró la integridad del material genético mediante la elaboración de geles de agarosa.

Resultados: Las NPs-SSB sintetizadas mediante ablación láser, mantuvieron la estructura química y cristalográfica del subsalicilato de bismuto. Presentaron una morfología cuasiesférica, con un tamaño de ~4 nm y una estabilidad de hasta 170 días. Respecto a su efecto antimicrobiano, se encontró una inhibición del 32.2 ± 7.3 % del total de microorganismos cultivables presentes en muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal, cuando fueron expuestas a las NPs-SSB. De igual manera, se cuantificó una menor cantidad de DNA bacteriano obtenido de las muestras que fueron expuestas a las NPs-SSB, comparado con la cantidad de DNA bacteriano proveniente de los cultivos que no fueron expuestos a las NPs-SSB (18.7 ± 6.14 ng/µL y 29.09 ± 9.19 ng/µL, respectivamente).

Conclusiones: La técnica de ALSL permitió obtener de manera eficaz y reproducible nanopartículas de subsalicilato de bismuto suspendidas en agua con un tamaño uniforme y morfología cuasiesférica. Las NPs-SSB mostraron tener efecto antimicrobiano contra los microorganismos provenientes de biopelículas subgingivales de pacientes con enfermedad periodontal, por lo que tienen el potencial para ser utilizadas como nuevos agentes antimicrobianos alternativos al tratamiento de las enfermedades periodontales, evitando el uso indiscriminado y/o excesivo de antibióticos y por ende el aumento de la resistencia bacteriana.

ABSTRACT.

Introduction: Bismuth subsalicylate (BSS) is an organometallic compound, which has been used in the medical field due to different therapeutic properties, including antimicrobial activity. On the other hand, infectious periodontal diseases are still highly prevalent in the adult population worldwide. The interdisciplinary research with other disciplines like nanotechnology, which deals with the manipulation of various materials at a nanometric scale, could generate novel therapeutic compounds with antimicrobial properties for the treatment of this kind of oral infections.

Objective: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of bismuth subsalicylate nanoparticles (BSS-NPs) synthesized by laser ablation against microorganisms from subgingival biofilm samples of patients with periodontal disease.

Material and methods: The nanoparticles were synthesized by the laser ablation technique of a solid material immersed in a liquid medium (LASiS). The characterization of the physico-chemical properties of the nanoparticles was carried out employing different techniques, such as Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-Vis); X-Ray Diffraction (XRD); Transmission Electron Microscopy (TEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). The evaluation of the antibacterial activity of the BSS-NPs, was performed using two subgingival biofilm samples taken from 5 patients with periodontitis (n=10). The antibacterial effect of the BSS-NPs (% inhibition of total cultured flora) was determined by the counting of the colony-forming units (CFUs) present on the agar plates added with or without BSS-NPs (16.6 µg/mL), using 16 µg/mL of amoxicillin as positive control. Bacterial DNA was extracted and quantified from the bacterial cultures with 30-300 CFUs, the integrity of the genetic material was confirmed through the elaboration of agarose gels.

Results: The nanoparticles synthesized by laser ablation maintained the chemical and crystallographic structure of bismuth subsalicylate. BSS-NPs presented a quasispherical morphology, a size of ~4 nm, and a water-suspended stability up to 170 days. Regarding their antimicrobial effect, an inhibition of $32.2 \pm 7.3\%$ of the bacterial cultures obtained from the subgingival biofilm samples was achieved, when they were exposed to BSS-NPs. In the same fashion, lower amount of bacterial DNA obtained from the samples exposed to the BSS-NPs was quantified, compared with the amount of bacterial DNA quantified from the cultures that were not exposed to the BSS-NPs (18.7 ± 6.14 ng/µL y 29.09 ± 9.19 ng/µL, respectively).

Conclusions: Bismuth subsalicylate nanoparticles with uniform size and quasispherical morphology were successfully obtained by the LASiS technique. The BSS-NPs showed antimicrobial effect against subgingival microorganisms from biofilm samples taken from patients with periodontal disease. The results obtained against clinical samples showed that BSS-NPs have the potential for being used as new alternative antimicrobial agents to treat periodontal diseases, preventing indiscriminate use of antibiotics and therefore delay increased antibiotic resistance.

I. INTRODUCCIÓN.

1. BISMUTO.

El bismuto (Bi) es un elemento metálico que pertenece al grupo 15 (familia VA) de la tabla periódica, su número atómico es el 83 y posee una masa atómica de 208.9804 g/mol. Este elemento tiene dos estados de oxidación (+3 y +5). Tiene una energía de ionización de 7.289 eV, así como un punto de ebullición de 271.40 °C y un punto de fusión de 1564 °C (Habashi, 2013). A nivel internacional, México es el 4° productor de Bi, siendo Coahuila el principal estado productor (SINEM, 2018).

En la antigüedad se solía confundir al Bi con el plomo (Pb), pero fue hasta el año 1753 que el químico francés Claude-Francois Geoffroy, identificó propiamente al bismuto (Bierer, 1990). En cuanto a sus características visuales, es un metal blanquecino que al oxidarse adquiere un ligero tinte rosado (Leather, 2003).

Una de las principales aplicaciones del Bi y sus diferentes compuestos es en el área farmacológica, siendo el subsalicilato de bismuto el más utilizado. Sin embargo, también se ha reportado su uso en la fabricación de diversos productos, por ejemplo; el oxiclورو de Bi (BiOCl) se utiliza en la fabricación de cosméticos para obtener diversas tonalidades en maquillajes. Otra aplicación es la aleación magnética de Bi y manganeso (MnBi) de la cual se obtiene un imán permanente y estable, e incluso se ha evaluado el uso del óxido de Bi en la fase alfa y beta (α/β -Bi₂O₃) como fotocatalizador para oxidar diversos compuestos orgánicos presentes en aguas residuales, purificación de aire, entre otras (Li et al., 2012).

1.1 Propiedades y aplicaciones en Medicina y Odontología.

El Bi se ha utilizado en el área médica por más de 250 años para el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente trastornos gastrointestinales que incluyen diarrea, gastritis y colitis ocasionados por la presencia de *Helicobacter pylori* (Lambert et al., 1997, Bagchi et al., 1999, Yakoob et al., 2014, Koulinska et al., 2018). A su vez, las sales derivadas del Bi como el subsalicilato de bismuto (SSB), subcitrato de Bi coloidal y citrato de Bi han demostrado su efectividad como agentes antimicrobianos; por ejemplo, el salicilato de Bi, tiene la propiedad de inhibir tanto el crecimiento de bacterias y levaduras patógenas como *Candida albicans* (Kappstein et al., 1987, Cornick et al., 1990, Alharbi et al., 2012, Pitz et al., 2015).

En la **Tabla 1** se muestran los mecanismos de acción antibacteriana del Bi descritos hasta la fecha (Lambert et al., 1997, Stratton et al., 1999, Dodge et al., 2005).

Tabla 1. Mecanismos propuestos de la acción antibacteriana del Bi.

Mecanismo	Estructura
Forma complejos en:	<ul style="list-style-type: none">• Pared bacteriana• Espacio periplásmico
Inhibe:	<ul style="list-style-type: none">• Enzimas como ureasa, catalasa• Lipasa/fosfolipasa• Síntesis de ATP• Adhesión de <i>Helicobacter pylori</i>

Otras aplicaciones terapéuticas de las sales de Bi que se han reportado son en el control de hemorragias y cicatrización, ya que actúa directamente en el factor XII de la cascada de coagulación (Li et al., 2012, Chen et al., 2014), también es un efectivo agente radioterapéutico, ya que tiene la capacidad de reducir los efectos secundarios en la terapia del cáncer (Yang et al., 2007, Sun et al., 2014, Cheng et al., 2018). Además, se ha comprobado el uso del Bi como escudo radioprotector durante la toma de tomografías computarizadas el cual, disminuye la radiación sobre órganos superficiales sensibles (ojos, tiroides, testículos), sin afectar las imágenes tomográficas (Hopper et al., 1997).

En el área odontológica se han utilizado diferentes compuestos de Bi con la finalidad de buscar alternativas en el mejoramiento de la terapéutica bucodental. Por ejemplo; el subcarbonato de Bi ($\text{Bi}_2\text{O}_2(\text{CO}_3)$) ha sido utilizado como partícula de relleno en los selladores endodónticos los cuales se usan para la obturación de conductos radiculares (Schwartzler, 2013), mientras que el óxido de Bi (Bi_2O_3) al ser incorporado a cementos endodónticos (portland o mineral de trióxido agregado, también denominado MTA) les otorga la característica de ser radiopacos (Saliba et al., 2009). También se ha demostrado que utilizar el compuesto organometálico trifenil bismuto ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Bi}$) (TPB) en adhesivos y resinas dentales les permite ser radiopacos, sin afectar la fuerza de la adhesión con la dentina y sin interferir en la fotopolimerización (Kaizer et al., 2014).

1.2 *Subsalicilato de bismuto (SSB) y usos terapéuticos.*

El SSB cuya fórmula química es $\text{C}_7\text{H}_5\text{BiO}_4$ (**Figura 1**). Tiene un peso molecular de 363.00701 g/mol, una densidad de 0.43 g/cm³. Este compuesto se

obtiene por hidrólisis del salicilato de bismuto, formando el SSB el cual es un compuesto insoluble en agua. Físicamente el SSB es un polvo blanquecino, insoluble en el agua (Suzuki et al., 2001, Sun et al., 2014).

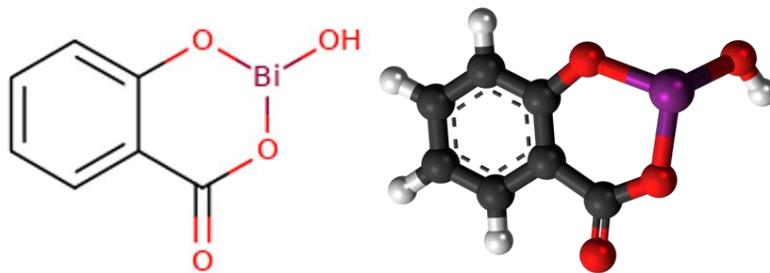


Figura 1. Estructura química del subsalicilato de bismuto.
Imagen tomada de (toxnet.nlm.nih.gov).

En cuanto a los usos terapéuticos, el SSB ha sido utilizado en el área médica a lo largo de los años en diversos tratamientos, de los cuales muchos siguen vigentes a la fecha. Las sales de SSB fueron introducidas en 1924, cuando se reportó su uso contra la sífilis la cual es causada por el microorganismo *Treponema pallidum* (Parnell, 1924, Degos, 1977, Freedman, 1953, Bierer, 1990, Hernandez et al., 2007). Posteriormente se descubrió su eficacia contra padecimientos gastrointestinales como diarrea, gastritis, colitis, relacionados con la presencia de la especie bacteriana *H. pylori*, entre otros (Lambert et al., 1997, Bagchi et al., 1999, Yakoob et al., 2014). Además por su capacidad antibacteriana, es empleado como método preventivo (profiláctico) en padecimientos como la denominada diarrea del viajero (Chowdhury et al., 2001, Guarino et al., 2001).

Un estudio *in vitro* comparó la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos de Bi contra patógenos oportunistas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, demostrando que los compuestos con mejor efecto antibacteriano fueron el subsalicilato de Bi (SSB), el trióxido de Bi y el subgalato de Bi; siendo el SSB el compuesto más eficaz en la inhibición del crecimiento de estos microorganismos (Vega-Jiménez et al., 2012).

Se han postulado diversos mecanismos de acción del SSB, entre ellos la inhibición de la síntesis de ATP, pérdida integral de la membrana, e incluso la reducción de polisacáridos capsulares en bacterias Gram negativas (Sox et al., 1989, Domenico et al., 1991, Lambert et al., 1997).

En cuanto a la absorción de este compuesto, el SSB al llegar al tracto gastrointestinal se hidroliza y se transforma en ácido salicílico y sales de bismuto insolubles. Los átomos de salicilato se absorben y posteriormente son excretados por vía renal (Bradley et al., 1989, Bagchi et al., 1998, Suarez et al., 2000). En cuanto a la dosis farmacéutica de este compuesto el 1 % se absorbe en el sistema gastrointestinal y posteriormente pasa al sistema circulatorio, mientras que el 99% de Bi se excreta en las heces, al ser insoluble en fluidos gástricos e intestinales (Bierer, 1990).

El SSB en dosis farmacéuticas adecuadas (adultos: 262 – 2100 mg por día), se considera un fármaco eficaz y de muy baja toxicidad. Sin embargo, se ha reportado que algunas de las reacciones adversas que puede manifestar este compuesto son el oscurecimiento temporal en lengua y de heces fecales, debido a su mecanismo de acción antibacteriano (Dodge et al., 2005). Adicionalmente, este

compuesto se disocia en iones Bi e iones salicilato, este último al ser similar al ácido acetil salicílico (ASA), puede generar nefrotoxicidad por dosis elevadas y/o crónicas. Se debe evitar su uso pediátrico (niños menores de 12 años), ya que existen reportes de que los salicilatos están asociados como agente etiológico del síndrome de Reye (Bradley et al., 1989).

2. NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es la tecnología generada a partir de manipular la materia en una escala de 1 a 100 nm, (un nanómetro equivale a la mil millonésima parte de un metro) (Svedberg et al., 1923, Noguez, 2013). Actualmente tiene un auge en la investigación ya que a estas dimensiones los materiales presentan fenómenos y propiedades diferentes a las del mismo material a escalas mayores (bulto) (Kattan, 2011, de la Cruz et al., 2012).

Cabe destacar que la interacción de seres vivos con nanopartículas (NPs) no es reciente, ya que a lo largo de los años hemos estado expuestos a NPs de origen natural (presentes en el ambiente), por ejemplo; las que se forman dentro de las olas de mar, en la erosión eólica, o incluso en las erupciones volcánicas, entre otros (Simonet et al., 2009).

El concepto de "nanómetro" fue propuesto por primera vez por Richard Zsigmondy, (Premio Nobel de Química en 1925). Posteriormente, Richard P. Feynman (Premio Nobel en 1956) considerado el fundador de la nanotecnología moderna, introduce las bases para el control, manipulación y fabricación de materiales en muy pequeñas dimensiones (Bayda et al., 2019). Años después, en 1974 el científico japonés Norio Taniguchi fue el primero en utilizar la palabra

"nanotecnología" argumentando que consiste en el procesamiento, consolidación y separación de los materiales mediante un átomo o una molécula. Sin embargo, aunque en la década de los 80s del siglo pasado los investigadores comenzaron a tener interés en esta área, es hasta el siglo XXI que la investigación ha aumentado significativamente en las áreas de la nanociencia y la nanotecnología (Bayda et al., 2019).

La nanociencia y la nanotecnología involucran áreas como la física, química y biología, entre otras. Las NPs exhiben propiedades químicas, electrónicas, magnéticas y ópticas diferentes a las del mismo material en tamaño macroscópico. Esto se debe al confinamiento de los electrones en un volumen limitado, pero también a que en los materiales nanoestructurados la relación superficie-volumen incrementa exponencialmente con la disminución del tamaño de partícula (de la Cruz et al., 2012).

2.1 Materiales nanoestructurados utilizados en el área Médico-Odontológica.

En el campo de la nanotecnología una de sus áreas de gran importancia es la nanobiotecnología, la cual se ha enfocado en buscar alternativas a diversos tratamientos médicos, evaluar métodos de diagnóstico, analizar la eficacia en cuanto al diseño y administración de medicamentos, con la finalidad de ofrecer una medicina preventiva y específica (Allaker et al., 2008, de la Cruz et al., 2012). Por ejemplo, en patologías como el cáncer, se han propuesto alternativas terapéuticas como: encapsulación y transporte de fármacos al sitio diana para generar diversos estímulos físicos (calor/luz, campos magnéticos), liberación de

NPs en pH ácidos (medicamentos de uso gastrointestinal) y afectando el aumento de las de las especies reactivas de oxígeno (ROS) con el fin de obtener un efecto antimicrobiano (Liao et al., 2020). También se han explorado diversas aplicaciones en patologías del sistema nervioso central mediante el uso de NPs metálicas para el diagnóstico oportuno y administración de fármacos (Valentina et al., 2017).

Otra de las aplicaciones de la nanotecnología en la medicina, es en el tratamiento de enfermedades oculares crónicas. Se ha reportado el uso de NPs de Ag que se internalizan a través de las barreras oculares, prolongando la duración del fármaco y aumentando la eficacia en el tratamiento de enfermedades como: queratitis, conjuntivitis, uveítis, glaucoma, retinopatías, entre otras (Abdelkader, 2011). Dentro de las nanopartículas con propiedades antimicrobianas, se ha reportado la síntesis de diferentes NPs con efectividad para inhibir el crecimiento bacteriano, de los ejemplos más destacados son las NPs metálicas de elementos como Ag, Au, compuestos como ZnO, TiO₂ y CuO, entre otros (Allaker et al., 2008, Sánchez-López et al., 2020).

En el área odontológica, la nanotecnología ha tenido un crecimiento importante, se ha utilizado en la odontología restauradora mejorando las propiedades ópticas (translucidez, brillo) y mecánicas (resistencia al desgaste) entre otras de composites dentales (Mitra et al., 2003). También se ha reportado el uso de nanomateriales en la remineralización dental, ya que al incorporar NPs de hidroxiapatita y de fluorapatita en cementos dentales como el ionómero de vidrio, se favorece la remineralización dental (Goenka et al., 2012). También la nanotecnología se utiliza en la esterilización por radiación gamma de dientes

extraídos utilizados para desarrollar y probar diversos biomateriales dentales, lo cual es importante para evitar contaminaciones (Brauer et al., 2008).

Además, se ha reportado que la nanotecnología está presente en la implantología dental mediante el uso de nanocristales de fosfato de calcio depositados en implantes de titanio, los cuales estimulan la oseointegración, mejorando con ello la tasa de éxito clínico de estos aditamentos (Citeau et al., 2005).

2.2 Nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB).

Como se mencionó anteriormente, el uso del subsalicilato de Bi como agente antimicrobiano, ha sido eficaz contra diversas especies bacterianas (Cornick et al., 1990). Recientemente se realizó la síntesis de nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) por medio de la técnica de ablación láser de sólidos en líquidos (ALSL) (Flores-Castañeda et al., 2015). En este estudio, se evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* contra los patógenos oportunistas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, demostrando que estas NPs presentan un buen efecto antimicrobiano en contra de estas especies. Posteriormente, en otro estudio se evaluó el efecto antimicrobiano de las mismas NPs-SSB utilizando bacterias anaeróbicas orales, así como su biocompatibilidad utilizando fibroblastos gingivales humanos. Los resultados mostraron que las NPs-SSB fueron efectivas para disminuir el crecimiento *in vitro* de patógenos periodontales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, presentando muy baja citotoxicidad (Vega-Jimenez et al., 2017).

2.3 *Síntesis de nanopartículas por Ablación láser.*

Actualmente, las NPs son consideradas como materiales altamente prometedores en todos los campos de la ciencia y tecnología. Existen diferentes métodos para sintetizarlas, sin embargo, algunas técnicas producen NPs con ciertas impurezas, como aditivos y residuos de la reacción que generalmente permanecen en los materiales, siendo algunas tóxicas para el ser humano (Zhang et al., 2017).

Entre los métodos para sintetizar NPs, destaca la técnica de ablación láser de un material sólido inmerso en un medio líquido (ALSL) el cual se conoce, por ser de los procedimientos físicos más eficientes, llevando a la formación de soluciones coloidales, así como la fabricación de diferentes nanoestructuras como nanotubos (Mafune et al., 2000). Actualmente, este método ha causado gran interés en la fabricación de nanomateriales por sus diversas ventajas como: síntesis sencilla, facilidad para el montaje experimental, se puede controlar el tamaño y concentración de las NPs, además no utiliza precursores químicos tóxicos para su elaboración, por lo tanto, se obtienen NPs libres de contaminantes y de residuos químicos (Yang, 2012, Ibrahimkutty et al., 2015, Semaltianos et al., 2016). Sin embargo, una de las principales desventajas de esta técnica, es el alto costo del equipo utilizado para producirlas (Yang, 2007, Yang, 2012).

La síntesis de NPs por ablación láser en líquidos, es una herramienta versátil para la producción de nanomateriales (Yang, 2012, Ibrahimkutty et al., 2015). Este método consiste en irradiar un blanco (generalmente y por comodidad en forma de una pastilla) utilizando la luz de un láser, que normalmente se enfoca en la superficie del blanco. Los láseres utilizados son de alta potencia, lo cual se

logra a través de la aplicación de una cierta cantidad de energía en tiempos muy cortos (para el caso del presente trabajo se utilizó una energía por pulso de 60 mJ y el tiempo de duración del pulso fue de 5 ns, lo cual en términos de potencia serían 12 MW por pulso). La luz del láser se absorbe por el blanco, fundiéndolo y ionizando el vapor del material del blanco. Posteriormente se forma un plasma que se condensa rápidamente en el líquido que contiene al blanco. Junto con el plasma formado se produce una gran cantidad de partículas neutras, entre ellas partículas muy grandes y otras pequeñas que forman las NPs del mismo material del blanco. Las partículas grandes tienden a depositarse en el fondo del recipiente, mientras que las NPs quedan en suspensión por un cierto tiempo.

2.4 Técnicas de caracterización de nanopartículas.

Las NPs presentan propiedades únicas relacionadas con su tamaño y concentración, por lo tanto, es importante caracterizar con precisión las propiedades físicas y químicas de las NPs. A continuación, se hace una descripción de las técnicas de caracterización de NPs utilizadas en este proyecto.

2.4.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).

Esta técnica espectroscópica fue descrita por primera vez por Brewster en el año 1833 cuando evaluó la interacción y dispersión de la luz con diferentes materiales (Brewster, 1833). La espectroscopía de absorción ultravioleta y visible (UV-Vis) consiste en medir la absorbancia de una muestra en las longitudes de onda del espectro electromagnético correspondientes al UV cercano, a través de un proceso energético mediante transiciones electrónicas en el que se excitan las moléculas y pasan de un estado de energía basal a un estado de energía

excitado, como se muestra en la **Figura 2** (Owen, 2000). Cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, pueden ocurrir diversos procesos como reflexión, dispersión, absorbanza, transmitancia y fluorescencia, entre otros.

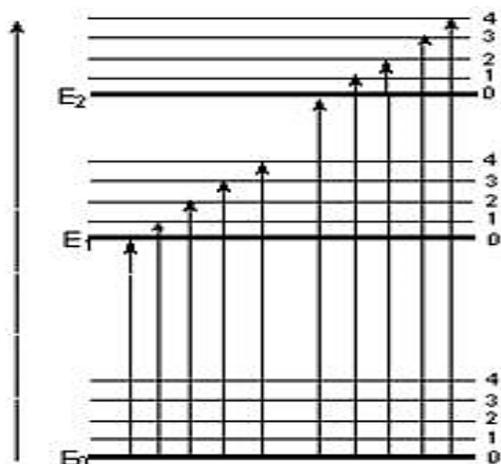


Figura 2. Transiciones electrónicas en espectroscopia UV-Vis, representa los estados de energía cuantizados (discretos) para electrones. Imagen tomada de (repositorio.innovacionumh.es).

Con esta técnica espectroscópica se pueden identificar diversos tipos de grupos funcionales y moléculas, lo cual permite identificar compuestos químicos. Al medir la absorbancia, se obtiene un espectro característico de la molécula o compuesto que se está analizando. Se debe seleccionar el disolvente correcto para evitar que se obstruya el espectro de absorción de la muestra experimental (Díaz et al., 2009). Además, con la técnica de espectroscopia UV-Vis, se puede determinar cuantitativamente la concentración de un compuesto por medio de una curva de calibración usando la ley de Lambert- Beer (Mánteles et al., 2017).

En algunas moléculas y átomos, los fotones de luz UV-visible tienen suficiente energía para causar transiciones entre los diferentes niveles de energía.

La longitud de onda de la luz absorbida es aquella que tiene la energía requerida para mover un electrón desde un nivel de energía basal a un nivel de energía excitado, y sólo se absorberá la energía que permita el paso al estado excitado (Owen, 2000).

Estudios recientes mencionan que la técnica de espectroscopía UV-Vis tiene la capacidad de caracterizar NPs, además de que tiene la capacidad de evaluar la concentración de las mismas, a partir de una curva de calibración basada en la relación entre la concentración de las NPs y las unidades de absorbancia de la muestra, e incluso sirve para analizar a través del tiempo la estabilidad de la muestra (Behzadi et al., 2015).

2.4.2 Difracción de Rayos X (XRD).

Esta técnica de caracterización conocida como XRD por sus siglas en inglés (X-Ray Diffraction) fue descrita en 1912 por Von Laue (Laue, 1913, Eckert, 2012). Este científico reportó que al enviar un haz de rayos X a través de un cristal de sulfato de cobre a placas fotográficas, éstas mostraban unas manchas de difracción alrededor del punto central del haz primario (Borisov et al., 2012). Este descubrimiento, dio origen a la cristalografía de rayos X y a la espectroscopía de rayos X (Eckert, 2012).

Los rayos X son radiación electromagnética, cuya energía varía de 100 eV a 100 keV, con una longitud de onda mucho más corta (10^{-10} m) que la longitud de onda de la luz visible (400-700 nm).

El fundamento de esta técnica se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de Rayos X, esta estructura cristalina

consiste en la repetición periódica de los átomos o moléculas que forman este sólido en tres direcciones del espacio. La técnica de XRD es utilizada para identificar la estructura de un material cristalino y sus propiedades estructurales como tamaño de grano, dimensiones de la celda unitaria, distancias interplanares, constantes de geometría, y orientación de monocristales, policristales y defectos, entre otros (Barbero et al., 2014, Sharma et al., 2012). El equipo de XRD produce rayos X mediante un tubo de rayos catódicos, los cuales son filtrados para generar radiación monocromática, con una longitud de onda que varía de 0.7 a 2 Å, la cual incide en la muestra y se difracta por las fases cristalinas en el espécimen según la ley de Bragg: ($\lambda = 2d \sin\theta$). Esta ley relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética en el ángulo de difracción y de la red cristalina de la muestra. Los rayos X difractados son detectados, procesados y sus intensidades son medidas, de esta forma indica la ubicación de los átomos en el cristal (Barbero et al., 2014, Hart, 1981).

El patrón de difracción se utiliza para identificar las fases cristalinas de la muestra y permite medir sus propiedades estructurales. La XRD es una técnica no destructiva, no requiere una preparación de muestras elaborada y permite el análisis de los patrones de difracción, por tanto, es una herramienta de gran utilidad para en la caracterización de nanomateriales (Raval et al., 2019, Ameh, 2019).

2.4.3 *Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).*

La microscopía electrónica de transmisión denominada como “TEM” por sus siglas en inglés (Transmission Electron Microscopy), tiene sus inicios en 1931 por

los científicos Max Knoll y Ernst Ruska, quienes investigaron las propiedades de diversos lentes ópticos y fueron los primeros en construir un microscopio electrónico de transmisión (Knoll et al., 1932).

Es una técnica analítica, con la que se puede observar, analizar e identificar, diversos materiales. Sus principales aplicaciones son la obtención del tamaño, forma y contraste del material analizado, así como la identificación de diversos materiales cristalinos por medio del análisis de las distancias interplanares y difracción de electrones (Williams et al., 2009).

El fundamento de esta técnica consiste en incidir un haz de electrones acelerados que bombardean y atraviesan la muestra generando un difractograma, que a su vez es transformado en una imagen a través de las lentes magnéticas y se puede obtener una proyección de la estructura cristalina (Reimer, 1989). La dispersión de los electrones puede ser elástica o inelástica. En el caso de la dispersión elástica, los electrones interactúan con el potencial electrostático del núcleo atómico. Este potencial desvía los electrones incidentes sin ninguna pérdida de energía, al detectarse estos electrones, se pueden formar imágenes por contraste, imágenes de difracción de electrones e imágenes de alta resolución. Por otra parte, en el caso de la dispersión inelástica, los electrones pueden transferir energía a diferentes grados de libertad del átomo. Esta transferencia puede causar excitación o ionización de los electrones, vibraciones en la red cristalina y la posibilidad de calentamiento de la muestra, obteniendo así imágenes con diferentes acoplamientos del TEM como la Microscopía electrónica de transmisión barrido (STEM), imágenes por filtrado de energía (EFTEM), imágenes

de campo oscuro a ángulo grande (HAADF) y espectroscopia por pérdida de energía de electrones (EELS) (Reimer et al., 2008).

2.4.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).

La espectroscopía infrarroja es una técnica muy utilizada para caracterización e identificación de materiales en estado sólido, líquido, gases, disoluciones, pastas, polvos, fibras, recubrimientos y nanopartículas, entre otros (Perkins, 1987). Los fundamentos de esta técnica espectroscópica se basan en los estudios descritos por el físico Albert A. Michelson a finales de siglo XIX (Michelson, 1891).

La espectroscopía infrarroja (IR) consiste en utilizar la energía electromagnética de la región del infrarrojo que se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$, y que se clasifica en tres zonas: infrarrojo cercano (NIR): $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, infrarrojo medio: $4000-400\text{ cm}^{-1}$ e infrarrojo lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$. Siendo la región del infrarrojo medio, donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas (Ozaki, 2012).

Uno de los avances más importantes de la técnica de IR fue adicionar la ecuación matemática descrita por Joseph Fourier en 1822 conocida como Transformada de Fourier (Fourier, 1822). Esta ecuación matemática mejora la calidad de los espectros, aumentando la sensibilidad y reduciendo el tiempo para la obtención de datos. Actualmente la mayoría de equipos de espectroscopia IR están acoplados a la transformada de Fourier (FT-IR) (Perkins, 1986).

El fundamento de esta técnica está basado en la interacción de la radiación infrarroja con las moléculas. Una condición necesaria para cumplir este

fundamento, es la presencia del momento dipolar (**Figura 3**), lo que da origen a las denominadas vibraciones permitidas o activas. Por otro lado, si el momento dipolar es nulo, no habrá absorción de energía infrarroja (Durig, 1996).

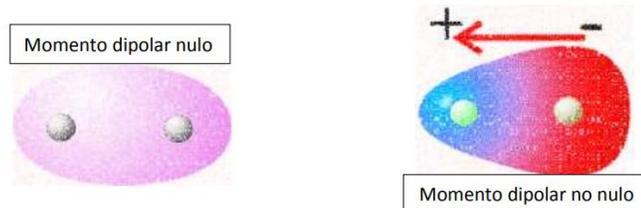


Figura 3. Molécula sin momento dipolar (izquierdo), molécula con momento dipolar (derecho).
Imagen tomada de (sceu.frba.utn.edu.ar)

Se le denomina vibración molecular cuando se produce cualquier cambio en la forma de los enlaces moleculares (estiramiento, cambio de ángulo, rotaciones). Estas vibraciones van a depender de la estructura atómica de la molécula, la geometría y masa atómica. El espectro del FT-IR se obtiene al medir los procesos de absorción/emisión de radiación infrarroja, ocasionando cambios en los estados vibracionales de los enlaces presentes en el material de estudio (Durig, 1996).

3. ECOLOGÍA MICROBIANA ORAL.

La cavidad oral se compone de una compleja y diversa comunidad microbiana, que se denomina microbioma oral. En estados de salud, este microbioma se encuentra en equilibrio con el huésped (homeostasis). Hasta la fecha, se han identificado formando parte de este microbioma oral, un poco más de 700 especies bacterianas diferentes (Dewhirst et al., 2010, Gao et al., 2018),

las cuales se encuentran colonizando los diversos hábitats o estructuras anatómicas presentes en la cavidad oral (mucosa labial, lengua, carrillos, surco gingival, paladar duro y blando, superficies dentales, entre otras) (Costalonga et al., 2014). El desequilibrio del microbioma oral conlleva a diversas enfermedades, siendo la caries y la enfermedad periodontal los principales padecimientos bucales en la población mexicana y mundial (SIVEPAB, 2015, Petersen et al., 2012).

3.1 *Formación y composición de la biopelícula dental.*

La biopelícula dental o también conocida anteriormente como placa dentobacteriana, es una estructura compuesta por comunidades de microorganismos fuertemente asociados entre sí, embebidos en una matriz de exopolisacáridos que se encuentran adheridos en la superficie dental (Marsh, 2004, Marsh, 2006, Filoche et al., 2010).

El proceso de formación de una biopelícula, ocurre de manera altamente organizada y secuencial (Xie et al., 2000, Marsh, 2006). La formación de la biopelícula dental, inicia en la con la formación de la película adquirida sobre la superficie de los dientes, la cual es una capa delgada de proteínas salivales que se adsorben en la superficie del esmalte dental (Huang et al., 2011). La adhesión bacteriana a la superficie dental de los primeros colonizadores, los cuales son especies Gram positivas de los géneros *Actinomyces* y *Streptococcus*, se lleva a cabo gracias a la interacción de las proteínas de la película adquirida y los receptores bacterianos. A su vez, estos microorganismos tienen la capacidad de promover la coagregación de otras bacterias conocidas como colonizadores secundarios (Parashar et al., 2015). Los colonizadores secundarios son especies

como *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus* y bacterias Gram negativas de los géneros *Capnocytophaga*, *Fusobacterium* y *Prevotella* entre otros, las cuales a su vez van a permitir la colonización de especies llamadas colonizadores tardíos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, conocidas como especies periodontopatógenas reconocidas (Socransky et al., 1998, Socransky et al., 2005, Belstrom et al., 2018).

Un avance significativo en el conocimiento de la composición y organización de la biopelícula dental se dio a partir de los estudios realizados por Socransky y cols., los cuales desarrollaron una técnica molecular llamada de “checkerboard” para hibridaciones de DNA-DNA, la cual permite la identificación simultánea de múltiples especies bacterianas en un gran número de muestras con mezclas complejas de microorganismos, como la biopelícula dental (Socransky et al., 1994). A través de esta técnica, y analizando más de 13,000 muestras de placa dentobacteriana subgingival, se pudo determinar que existen asociaciones específicas entre las bacterias presentes en las biopelículas dentales, las cuales denominó "complejos bacterianos" (Socransky et al., 1998, Socransky et al., 2005). El diagrama de los cinco complejos bacterianos subgingivales, a los cuales con fines prácticos les fueron asignados colores, representa tanto la secuencia de colonización, como la composición de la placa dentobacteriana subgingival o biopelícula subgingival (**Figura 4**).

Las bacterias que conforman cada complejo se encuentran fuertemente asociadas entre sí. Es decir, los complejos amarillo, verde y morado se encuentran más fuertemente asociados entre sí y éstos a su vez asociados al complejo naranja pero no con los miembros del complejo rojo. Este mismo diagrama,

también ejemplifica la secuencia de colonización de la biopelícula subgingival (de izquierda a derecha). De tal manera que, dentro del complejo amarillo y azul, se encuentran las especies pioneras de la superficie dental o llamadas también colonizadores primarios. Los complejos morado, verde y naranja están formados principalmente por especies llamadas colonizadores puente o secundarios, y finalmente el complejo rojo, formado por especies llamadas colonizadores tardíos y que son patógenos periodontales reconocidos.

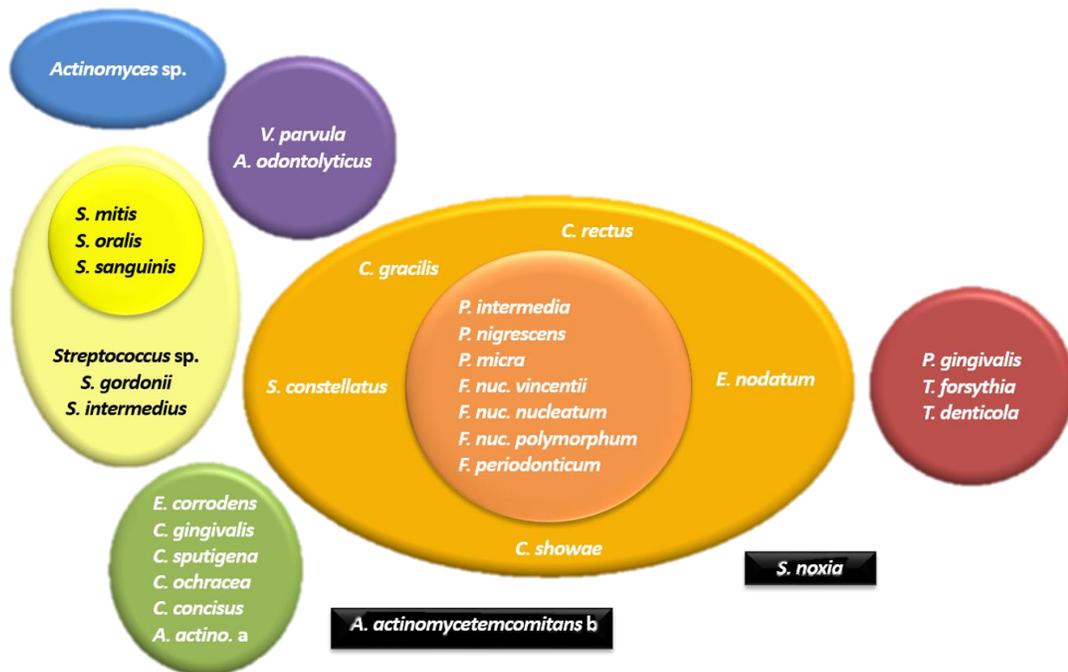


Figura 4. Complejos bacterianos de la placa dentobacteriana subgingival (Socransky et al., 1998, Socransky et al., 2005).

3.2 *Enfermedades periodontales.*

Las enfermedades periodontales comprenden múltiples alteraciones en las estructuras de soporte de los dientes (encía, hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal), ocasionando una interrupción de la homeostasis bucal y con ello una disbiosis del microbioma oral (Kinane et al., 2017). La principal etiología de estas enfermedades son los microorganismos que conforman la biopelícula dental, en especial los colonizadores tardíos (complejo rojo) ya que están asociados de forma significativa con enfermedades periodontales (Socransky et al., 1998, Kinane et al., 2017).

Algunos de los factores de riesgo son: genéticos, consumo de ciertos medicamentos hormonales, hábitos como tabaquismo, algunas enfermedades sistémicas como diabetes mellitus, cambios hormonales, entre otras (Chapple et al., 2013, Jepsen et al., 2018, Sampaio-Maia et al., 2016). Esta patología bucal continua teniendo una alta prevalencia a nivel mundial y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera como problema de salud pública nivel mundial (Petersen et al., 2012).

En el año 2017 la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP) juntaron a expertos internacionales en el tema y se llevó a cabo un World Workshop para reclasificar la enfermedad periodontal, y padecimientos periimplantarios. En esta nueva clasificación, indica la gravedad de la enfermedad y la complejidad del tratamiento de la misma a través de estadios (I, II, III y IV) y grados (A, B, C). En las categorías de estadios de la enfermedad periodontal están clasificadas por una serie de variables que van desde la fase I (menor gravedad), hasta la fase IV (mayor gravedad) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación de periodontitis por estadios, según la gravedad del diagnóstico inicial y la complejidad, sobre la base de factores locales (Caton et al., 2018).

		Estadio I Periodontitis Inicial	Estadio II Periodontitis Moderada	Estadio III Periodontitis Severa con potencial para pérdida dental adicional	Estadio IV Periodontitis Severa con potencial para pérdida de la dentición
Severidad	*PIC interdental en el sitio de mayor pérdida	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Pérdida ósea radiográfica	Tercio coronal de la raíz (<15%)	Tercio coronal de la raíz (15-33%)	Extensión a tercio medio o apical de la raíz	Extensión a tercio medio o apical de la raíz
	Pérdida dentaria	Sin pérdida dentaria por razones periodontales		Pérdida dentaria por periodontitis en ≤ 4 dientes	Pérdida dentaria por periodontitis en ≤ 5 dientes
Complejidad	Local	Profundidad al sondaje ≤ 4mm	Profundidad al sondaje ≤ 5 mm	Profundidad de sondaje 6 mm	Además de complejidad Estadio III: Necesidad de rehabilitación debido a: Disfunción masticatoria Trauma oclusal secundario (movilidad dental grado ≥2)
		Mayoría con pérdida ósea horizontal	Mayoría con pérdida ósea horizontal	Pérdida ósea vertical ≥ 3mm Afectación de furca grado II o III Defecto moderado del reborde	Defecto severo del reborde Colapso de mordida, migración o vestibularización. Menos de 20 dientes permanentes (10 antagonistas)
Extensión y distribución	Agregar al estadio como un descriptor	Para cada estadio, describir extensión como localizada (<30% de dientes involucrados), generalizada (>30% de dientes involucrados), o patrón molar/incisivo)			

*PIC = *Perdida de Inserción Clínica*

Esta nueva clasificación periodontal también toma en cuenta el estado de salud sistémico del paciente y también los factores de riesgo como tabaquismo y diabetes. Siendo el Grado A (bajo riesgo), Grado B (riesgo moderado) y Grado C (alto riesgo) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Velocidad de propagación de la periodontitis (Caton et al., 2018).

Grado de periodontitis		Grado A Lenta progresión	Grado B Moderada progresión	Grado C Rápida progresión	
	Evidencia directa de progresión	Evidencias (Pérdida ósea radiográfica o PIC)	Sin evidencia de pérdida en más de 5 años	Pérdida <2mm en más de 5 años	Pérdida ≥ 2mm en más de 5 años
		% Pérdida ósea vs. Edad	< 0.25	0.25-1.0	> 1.0
Criterio principal	Evidencia indirecta de progresión	Caso de fenotipo	Grandes depósitos de biopelícula con bajos niveles de destrucción	Destrucción acorde con los depósitos de biopelícula	La Destrucción excede las expectativas de biopelícula; patrones clínicos específicos que sugieren periodos de progresión rápida y/o enfermedad de inicio temprano (por ejemplo falta de respuesta esperada a las terapias de control bacteriano)
Modificadores de grado	Factores de riesgo	Tabaquismo	No fumador	Fumador <10 cigarros al día	Fumador ≥10 cigarros al día
		Diabetes	con/sin diagnóstico de diabetes	Hemoglobina glucosilada (HbA1c) <7.0% con diabetes	Hemoglobina glucosilada (HbA1c) ≥7.0% con diabetes

3.3 *Control químico de la biopelícula dental utilizado en la terapia periodontal.*

La naturaleza infecciosa de las enfermedades periodontales causadas por la presencia de una biopelícula dental, hace que la terapia mecánica periodontal enfocada en el control y reducción de la biopelícula dental sea muy importante. Sin embargo, para el tratamiento de estas enfermedades es común el uso de antibióticos sistémicos y antisépticos como coadyuvantes al tratamiento periodontal y a la higiene bucal.

Antibióticos sistémicos.

El uso de antibióticos por vía sistémica como coadyuvantes de la terapia periodontal, tiene ventajas y desventajas que se relacionan con sus propiedades farmacológicas. Algunos de los antibióticos más comunes en el tratamiento periodontal son los siguientes:

Amoxicilina. Es una penicilina semisintética de amplio espectro, eficaz contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana (Tipper et al., 1965). Es uno de los antimicrobianos más utilizados como coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis, por su capacidad de alcanzar una concentración de 1.5 a 14 µg/mL en el fluido crevicular (Walker et al., 1983, Gordon et al., 1993). Aunque como ocurre con otras penicilinas, puede desencadenar reacciones adversas como hipersensibilidad y ocasionar resistencia bacteriana (da Fonseca, 2000).

Tetraciclina. Es un derivado semisintético de la clortetraciclina, la cual se descubrió en 1948 por Benjamin M. Duggar, quien la obtuvo a partir del

Streptomyces aureofaciens (Duggar, 1948). Es un antibiótico de amplio espectro, tiene actividad sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S bacteriana (Tripathi, 2013). Este fármaco alcanza altas concentraciones en el fluido crevicular (1 a 8 µg/mL) por lo que se utiliza como complemento en el tratamiento de la periodontitis (Gordon et al., 1981). Aunque se ha reportado que las tetraciclinas son quelantes del calcio y se pueden fijar en hueso, dientes y cartílago, está contraindicada en embarazadas por riesgo a ocasionar hipoplasia del esmalte en el producto, también pueden manifestarse efectos secundarios como fotosensibilidad y ocasionar resistencia bacteriana (Tripathi, 2013).

Metronidazol. Es un agente sintético que forma parte de la clase de nitroimidazoles, es eficaz contra bacterias anaerobias Gram positivas y Gram negativas. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de DNA bacteriano (Muller, 1983). Es un antibiótico que inhibe el crecimiento de patógenos periodontales como *P. gingivalis* y espiroquetas (Wright et al., 1997, Poulet et al., 1999, Sato et al., 2008). En el fluido crevicular alcanza una concentración aproximada de 1.24 µg/mL (Sato et al., 2008) por lo que es utilizado en el tratamiento de abscesos difusos de origen periodontal y dental, en gingivitis ulcero necrosante y lesiones periodontales (Poulet et al., 1999). Los efectos adversos se relacionan con el aparato digestivo, puede ocasionar sabor metálico, náuseas, vómito, diarrea y en algunos casos efectos neurotóxicos.(Kafadar et al., 2013).

Clindamicina. Es un derivado semisintético de la lincomicina, está conformado por un metilprolina y una piranosa unidos por una amida. Su mecanismo de acción es suprimiendo la síntesis proteica de las bacterias mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S (Kasten, 1999). Es un antibiótico eficaz contra bacterias anaerobias, puede ser utilizado en pacientes alérgicos a la penicilina y como coadyuvante de la terapia periodontal, ya que alcanza niveles en el fluido crevicular de 2 µg/mL y se ha reportado que mejora los parámetros clínicos periodontales (Walker et al., 1981, Gordon et al., 1990). Aunque en algunas ocasiones puede alterar el microbioma gastrointestinal (Kapoor et al., 2012).

Antisépticos.

Los principales agentes antiplaca que están presentes en los enjuagues orales se mencionan a continuación.

Clorhexidina. Es una bisguanida catiónica efectiva contra una gran cantidad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Su mecanismo de acción es inhibir la adhesión bacteriana, el transporte de azúcares que producen ácidos de especies de *Streptococcus* asociados con la caries dental, además de inhibir la proteinasa (gingipaina) del patógeno periodontal *P. gingivalis*, entre otros (Rolla et al., 1975). Es el agente antiplaca más utilizado en la odontología, por su eficacia se le denomina “el estándar de oro”. El uso de este compuesto al 0.12% durante un minuto dos veces al día, ha demostrado que inhibe de manera importante la formación de biopelícula dental y la disminución de la gingivitis, además minimiza los compuestos de sulfuro relacionados con la halitosis (Addy et al., 1997). Sin

embargo, si es utilizada por más de 15 días genera efectos secundarios como alteración del sentido del gusto, pigmentación de las superficies dentales y mucosas bucales (Fardai et al., 1986).

Aceites esenciales. También denominados aceites aromáticos o volátiles, son extraídos de plantas por destilación al vapor, hidrodifusión o presión (Manion et al., 2017). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe a su composición química de terpenos y fenoles (Dagli et al., 2015). Su mecanismo de acción es destruir la pared celular bacteriana, inhibir enzimas y la extracción de lipopolisacáridos bacterianos (Leszczyńska et al., 2011). Se ha demostrado que el aceite de tomillo, menta, aceite té de árbol, son efectivos contra agentes patógenos oportunistas como *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, además la utilización de aceites esenciales en la cavidad oral reduce la formación de biopelícula dental y la gingivitis (Thosar et al., 2013). Aunque la desventaja es que en algunos casos pueden desarrollar alergias y causar intoxicación (Millet et al., 1981).

Triclosán. Es un compuesto aromático no iónico con efecto antibacteriano. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de ácidos grasos, generando una disrupción de la pared celular bacteriana (Binney et al., 1997, Heath et al., 2001). Se ha reportado que al ser incorporado en pastas dentales y enjuagues reduce la formación de biopelícula dental y gingivitis (Kraglund, 2014). Sin embargo, se ha generado controversia por su absorción, y metabolismo, ocasionando efectos adversos como alergias, alteraciones endocrinas, toxicidad, acumulación, entre otras (Weatherly et al., 2017).

Cloruro de cetilpiridino. Es un compuesto de amonio cuaternario, eficaz contra microorganismos que conforman la biopelícula supragingival, su mecanismo de acción es desestabilizar la membrana celular bacteriana (Leszczyńska et al., 2011) para evitar la formación de biopelícula y el desarrollo de la gingivitis, por lo que se considera un agente antiplaca. Se ha reportado que puede pigmentar de color marrón la superficie dental (He et al., 2011).

La dificultad de erradicar las biopelículas con los tratamientos convencionales, incluyendo el uso de antibióticos y antisépticos es difícil ya que se ha reportado que las bacterias que conforman las biopelículas, pueden ser hasta mil veces más resistentes al estrés antimicrobiano, que sus contrapartes bacterianas que se encuentran en estado libre o plantónico (Patel et al., 2005). Se ha reportado en poblaciones de todo el mundo incluyendo la mexicana, que las bacterias orales han desarrollado resistencia a diversos antibióticos (Almaguer-Flores et al., 2006, Rams et al., 2014).

3.4 *Microbioma oral humano.*

Anteriormente el conjunto de microorganismos localizados en la cavidad oral, eran referidos como microflora oral, microbiota y recientemente se le denomina microbioma oral (Dewhirst et al., 2010). El microbioma hace referencia a la comunidad ecológica de microorganismos simbióticos y patógenos con los cuales se comparte un espacio corporal (Lederberg, 2001). La función principal del microbioma es mantener un equilibrio dinámico en el cuerpo humano, sin embargo, constantemente puede ser alterado por factores ambientales y estímulos externos (Martín et al., 2014).

El microbioma oral ha sido investigado a partir de medios de cultivo y métodos moleculares independientes de cultivo, en ambos casos se puede realizar el análisis de la fracción 16S rRNA. Para organizar y formar una base de datos a partir de estas secuencias se creó la base de datos del microbioma oral humano (HOMD) por sus siglas en inglés “Human Oral Microbiome Database” (www.homd.org). Recientemente en el año 2018 se expande esta base de datos y cambia su abreviatura a expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) en esta actualización se incorpora una nueva base a partir del microbioma del tracto aerodigestivo humano (incluyendo fosas nasales, garganta, esófago) (Escapa et al., 2018). Actualmente, el eHOMD incluye un total de 771 especies microbianas. De todas las especies, el 57% tienen nombre oficial, un 13% son cultivables, pero sin nombre y el 30% restante se conocen como filotipos no cultivables. Continuamente se siguen incorporando otros proyectos de secuenciación y hasta a la fecha están disponibles un total de 1,570 genomas que representan 475 taxones. (www.homd.org).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades periodontales continúan siendo un problema de salud pública muy importante. En México, ocupan el segundo lugar en las enfermedades más frecuentes en cavidad bucal (SIVEPAB, 2015) y de igual forma a nivel mundial, existe una alta prevalencia (Petersen, 2003, Petersen et al., 2012).

Para el tratamiento de las enfermedades periodontales, el método más eficaz hasta ahora sigue siendo la terapia mecánica (raspado y alisado radicular),

la cual permite la perturbación de la biopelícula formada sobre la superficie dental y radicular. Adicionalmente, se utilizan como adjuntos a esta terapia mecánica, antibióticos y antisépticos los cuales han mostrado cierta efectividad en el control del crecimiento de la biopelícula dental. Sin embargo, el uso de estos agentes ha mostrado ciertas desventajas ya sea por los efectos secundarios que pueden causar (por ejemplo: hipersensibilidad, afecciones en el sistema digestivo como sabor metálico, náuseas, vómito, diarrea y en algunos casos efectos neurotóxicos), o por el desarrollo de resistencia bacteriana a diversos antibióticos, ocasionando que la terapéutica de enfermedades infecciosas se vuelva más compleja (Jia et al., 2018).

Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de diferentes alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas como las enfermedades periodontales, con agentes que muestren alta eficacia antibacteriana y pocos o nulos efectos secundarios. En nuestro grupo de trabajo se ha realizado de manera exitosa la síntesis y caracterización de NPs de subsalicilato de bismuto que han mostrado un buen efecto antimicrobiano *in vitro* en contra de bacterias de importancia médica y en especies anaeróbicas de la cavidad bucal (Flores-Castañeda et al., 2015, Vega-Jimenez et al., 2017). Es por eso que, en este proyecto se propone evaluar el efecto antimicrobiano de las NPs-SSB en muestras de biopelícula dental subgingival de pacientes con enfermedad periodontal. Los resultados de este proyecto de investigación van a aportar información valiosa para el desarrollo de una posible alternativa a los tratamientos convencionales de antibióticos y antisépticos, disminuyendo los efectos secundarios de éstos.

III. HIPÓTESIS.

Las nanopartículas de subsalicilato de bismuto presentan efecto antimicrobiano *in vitro* en muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) sintetizadas por ablación láser sobre microorganismos provenientes de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar NPs-SSB mediante la técnica de ablación laser en líquidos.
- Caracterizar las NPs-SSB mediante Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectroscopía infrarroja (FT-IR) y Difracción de Rayos X (XRD).
- Evaluar la actividad antibacteriana de las NPs-SSB mediante la determinación del porcentaje de inhibición de la flora total cultivable de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

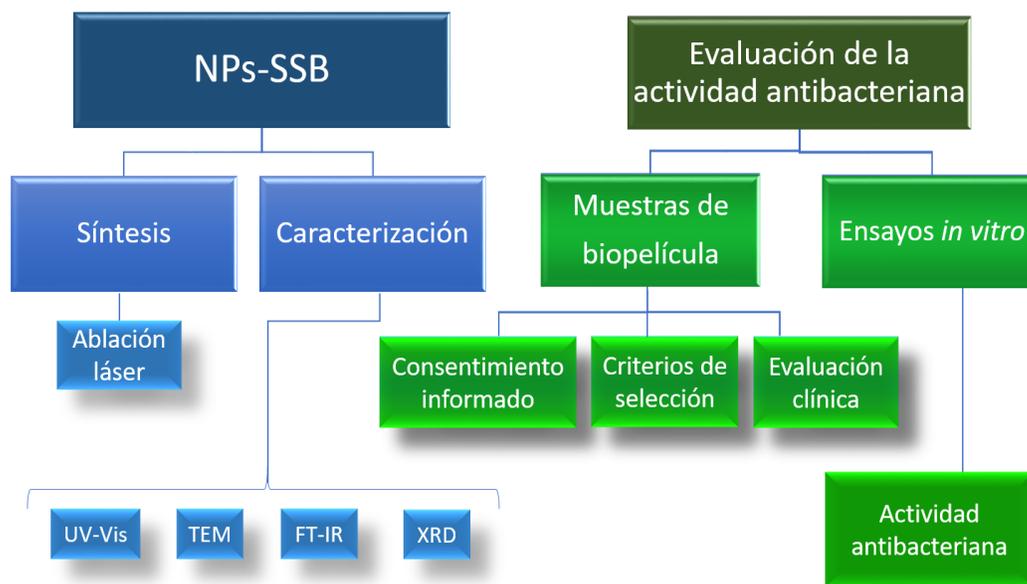


Figura 5. Secuencia experimental del proyecto.

2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SUBSALICILATO DE BISMUTO POR ABLACIÓN LÁSER (NPs-SSB).

La síntesis y caracterización de las NPs-SSB se llevaron a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). La síntesis se realizó mediante la técnica de ablación láser de sólidos inmersos en líquidos (ALSL) y el SSB ($C_7H_5BiO_4$) en polvo con un 99% de pureza fue proporcionado por FarmaQuimia especialidades®.

Para la síntesis de las nanopartículas primeramente se elaboraron blancos de SSB en forma de pastilla de 2.5 cm de diámetro. Se compactaron 5 g de SSB, que se mantuvieron bajo 10 Ton de presión durante 2 horas en una prensa

hidráulica con troqueles. Una vez obtenido el blanco, se colocó dentro de un vaso de precipitados de 50 mL, el cual se posicionó en una mesa giratoria a una velocidad de 15 rpm, con el fin de lograr un proceso de ablación más uniforme sobre el blanco.

Para la ablación láser, se utilizó un láser de Neodimio YAG (Nd:YAG) por sus siglas en inglés (Neodymium doped Yttrium Aluminium Garnet). Una vez optimizada la técnica, se establecieron los siguientes parámetros de síntesis: una longitud de onda del láser de 532 nm, con pulsos cortos de aproximadamente 5 ns, lo cual en términos de potencia equivalen a 12 MW por pulso, una energía de salida máxima de 60 mJ y una frecuencia de repetición de 10 Hz. Para enfocar la luz del láser, se utilizó una lente con distancia de enfoque de 20 cm, la cual se desenfocó para reducir la densidad de energía depositada sobre la superficie del blanco y la distancia establecida del blanco a la lente de enfoque fue de 14 cm.

Como medio líquido para la ablación se utilizó agua estéril. Se realizaron tres ablaciones (cada una de 5 minutos) para obtener las NPs en la concentración deseada (100 µg/mL), entre cada ablación se filtró la solución coloidal con un filtro PES (polietersulfuona) de 0.45 µm de tamaño de poro y 30 mm de diámetro. Posterior a esto se midió la absorbancia de la muestra recién sintetizada mediante la técnica de espectroscopía Ultravioleta-Visible.

3. CARACTERIZACIÓN DE NPs-SSB.

3.1 *Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Espectro UV-Vis).*

Una de las técnicas para estudiar la presencia de NPs sintetizadas es la espectroscopía UV-Vis, con esta técnica es posible evaluar la concentración y estabilidad de las NPs. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro LAMBDA UV/Vis/NIR (PerkinElmer®) en la longitud de onda de 200-600 nm y en todas las mediciones se utilizó agua estéril como línea base.

La espectroscopía de absorción al ser una técnica no destructiva y extremadamente sensible, es ideal para determinar la presencia de NPs-SSB. Aunque, no se han reportado espectros de absorbancia de referencia que permitan la adecuada identificación del SSB, el hecho de que se observen bandas de absorción similares de la sal dispersa en el agua y la solución coloidal obtenida después del proceso de ablación láser, es un indicativo de la conservación de la estructura molecular.

La estructura molecular del SSB, presenta un núcleo de óxido de bismuto trivalente con iones salicilato en la superficie o también es considerado una sal de bismuto de ácido salicílico por tanto, se espera que los grupos funcionales del ácido salicílico dominen en el espectro de UV-Vis. El espectro UV-Vis del ácido salicílico disuelto, presenta dos bandas de absorción alrededor de 234-237 nm y de 296-303 nm (Purvis, 1926) siendo este último el más intenso y característico. Por lo tanto, las bandas dominantes que aparecen en los espectros UV-Vis del SSB, corresponden con las transiciones electrónicas de la parte salicílica, aunque la banda que aparece alrededor de 190 nm no es muy precisa, ya que el agua

comienza a absorber la luz fuertemente a partir de 205 nm. Además, la intensidad de todas las bandas de absorción, es mayor para los coloides en comparación con la sal, efecto que podría estar relacionado con la baja solubilidad de la sal SSB (Flores-Castañeda et al., 2015).

Para determinar la concentración de las NPs-SSB se utilizó la espectroscópica UV-Vis y se realizó una curva de calibración del SSB en bulto en una mezcla 1:1 de ácido acético: agua y posteriormente se mezcló el coloide obtenido de la síntesis con ácido acético en proporciones 1:1, midiendo directamente en el espectrofotómetro. El procedimiento realizado se menciona a continuación:

1. Se preparó una solución de SSB en bulto, disuelta en una mezcla de ácido acético al 2.39% y agua en proporciones 1:1 con una concentración de 270.7 ppm.
2. De esta solución stock de 270.7 ppm, se realizaron 7 diluciones de concentraciones conocidas (como se observa en la tabla 4). La dilución se hizo con una mezcla de ácido acético: agua (1:1).
3. Posteriormente se realizó una medición de absorbancia en UV-Vis de las 8 muestras antes mencionadas. Se tomó el valor de absorbancia en 296 nm para cada una de las muestras.
4. Se graficaron los datos de concentración (dato conocido de la dilución) vs absorbancia (en 296 nm) y se obtuvo una $R^2 = 0.9998$ y la ecuación de la recta (**Figura 6**) se agregó un punto en el origen a la recta.

5. Se sintetizaron diferentes muestras de NPs de subsalicilato de bismuto en agua, con valores de absorbancia diferentes, se tomó el espectro de absorbancia de las muestras medidas después de la síntesis una vez filtradas y se registró el dato de absorbancia en 296 nm (banda correspondiente a las NPs-SSB).
6. Posteriormente se realizó una mezcla de los coloides con ácido acético en una relación 1:1, se midió el espectro de absorbancia de estas mezclas, y se registró el valor de absorbancia a 296 nm.
7. Usando la curva de calibración y el valor de absorbancia de la dilución se obtuvo la concentración de la dilución.
8. Debido a que la dilución se realizó en una proporción 1 a 1, basta con multiplicar la concentración de la dilución por 2 y de esta manera se obtuvo el valor de concentración de la muestra directa.
9. Como era conocido el valor de absorbancia en 296 nm de la muestra directa se pudo graficar la absorbancia de la muestra directa contra la concentración y de esta manera se obtuvo una segunda curva de calibración (**Figura 7**), la cual es útil para determinar la concentración de los coloides de manera directa sin necesidad de hacer la mezcla con ácido acético, teniendo únicamente el valor de la absorbancia en 296 nm. La segunda curva de calibración presenta una $R^2 = 0.9958$.

Tabla 4. Valores de concentración y absorbancia de las muestras usadas de SSB en bulto para la elaboración de la curva de calibración.

Concentración (ppm)	Absorbancia en 296 nm
270.7	2.522
200.0	1.863
135.3	1.260
100.0	0.895
67.6	0.635
54.1	0.510
27.0	0.258
13.5	0.135

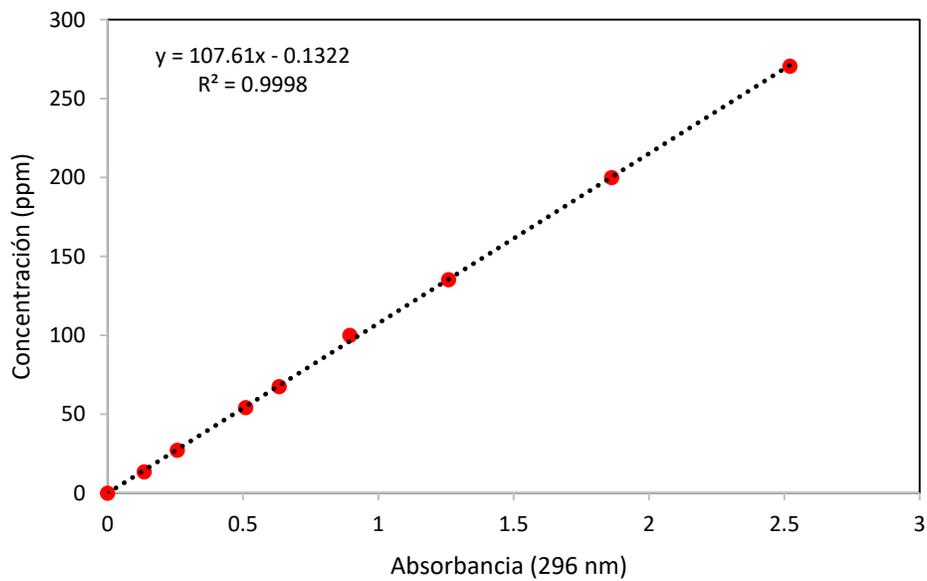


Figura 6. Curva de calibración muestras del SSB en bulto.

Tabla 5. Valores UV-Vis obtenidos para la elaboración de la curva de calibración.

Muestra	Absorbancia de la Dilución	Concentración de la dilución (ppm)	Absorbancia directa de la muestra	Concentración directa de la muestra (ppm)
NPs-SSB1	0.101	10.741	0.206	21.481
NPs-SSB2	0.111	11.815	0.225	23.629
NPs-SSB3	0.120	12.818	0.252	25.635
NPs-SSB4	0.186	19.955	0.382	39.911
NPs-SSB5	0.193	20.720	0.397	41.441
NPs-SSB6	0.264	28.277	0.543	56.554
NPs-SSB7	0.290	31.092	0.585	62.184
NPs-SSB8	0.304	32.591	0.633	65.182
NPs-SSB9	0.388	41.703	0.867	83.407
NPs-SSB10	0.533	57.265	1.090	114.530

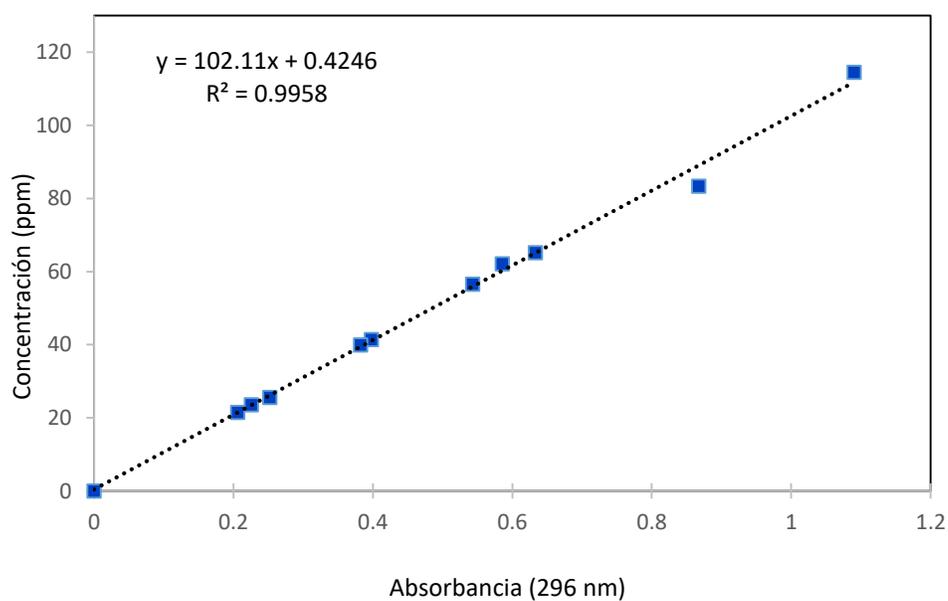


Figura 7. Curva de calibración muestras del SSB en bulto.

También se utilizó esta técnica (espectro UV-Vis), para evaluar la presencia y estabilidad de los coloides. En algunos de los coloides recién sintetizados se les dio seguimiento, midiendo su absorbancia en los días 1, 9, 86 y 170 posterior a la síntesis.

3.2 *Difracción de Rayos X (XRD).*

Se realizó la técnica de XRD, para corroborar la estructura cristalina del SSB en polvo. El patrón de difracción, se obtuvo en un intervalo de 2θ de 20° a 80° usando el difractorómetro Bruker D8 XRD con radiación $\text{CuK}\alpha$.

3.3 *Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).*

Para analizar las NPs-SSB mediante la técnica de TEM, se colocó una gota de NPs-SSB en una rejilla de cobre (200 mesh) con recubrimiento de formvar, se dejó secar un día y posteriormente se ingresó al microscopio electrónico de transmisión de la marca JEOL JEM-2010Ex. Este equipo fue operado en un voltaje de 200 kV de esta forma se determinó la morfología y las distribuciones de tamaño de las NPs. También se utilizó el modo de alta resolución (HRTEM) para visualizar las distancias interplanares de las muestras. Una vez obtenidas las micrografías, se analizaron con el software *Digital Micrograph* y se utilizaron 10 micrografías para determinar el tamaño promedio de las NPs-SSB, el cual se expresó como la media (ME) \pm error estándar de la media (EEM). Se repitió la metodología a los 44 días posteriores a la síntesis de NPs-SSB para comprobar la presencia y estabilidad de las mismas.

3.4 *Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).*

En el Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) se realizó la medición de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) en el modo de reflexión total atenuada (ATR). Para comprobar la presencia de los modos vibracionales característicos del SSB en bulto y en NPs. El equipo que se utilizó fue un espectrómetro de FTIR Nicolet modlo iS50R acoplado con el equipo Smart iTX con una punta de diamante. Primero se depositó una gota de SSB en bulto suspendido en agua en el cristal del equipo, se dejó evaporar el agua por 30 minutos y se realizó la medición para obtener el espectro característico del SSB, se limpió la superficie y se repitió el mismo procedimiento con las NPs-SSB.

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NPs-SSB.

4.1 *Población de estudio.*

El presente estudio de investigación fue sometido y aprobado por Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la UNAM con el número de aprobación: **CIE/0305/02/2019.**

La población de estudio consistió de un total de 5 pacientes con diagnóstico periodontal de estadio III grado A, los cuales fueron seleccionados a partir de los pacientes que reciben atención odontológica en la clínica de Periodoncia e Implantología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM. Los pacientes, fueron invitados a participar de forma voluntaria y recibieron copia del Consentimiento Informado (**Anexo I**), el

cual firmaron estableciendo su entendimiento y deseo voluntario de participar en el estudio.

4.1.1 Criterios de selección.

En la **Tabla 6** se describen los criterios de inclusión empleados para seleccionar a la población de estudio. Fueron excluidos del estudio todos los pacientes que hubieran tomado cualquier clase de antibiótico sistémico o local e incluyendo el uso de enjuagues con clorhexidina en los 3 meses previos a su inclusión en el estudio. También se excluyeron mujeres embarazadas o lactando, sujetos que presentaban alguna afección sistémica que pudiera influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal tales como diabetes, VIH/SIDA, hemofilia y enfermedades autoinmunes, así como cualquier persona que fuera fumador actual (consumo regular de 3 cigarros o más a la semana) o que hubiera dejado de fumar en los 3 meses previos a su evaluación para el estudio.

Tabla 6. Criterios de selección de la población de estudio

CRITERIOS DE SELECCIÓN	
Inclusión	<ul style="list-style-type: none">• Diagnóstico de Periodontitis estadio III grado A, de acuerdo con el 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions (Caton et al., 2018).• Sin tratamiento periodontal, excepto profilaxis.• Sin compromiso sistémico.• Mínimo 20 dientes naturales.
Exclusión	<ul style="list-style-type: none">• Embarazo o lactancia.• Utilización de antibióticos (sistémico/local), o clorhexidina (3 meses previos).• Afección sistémica que pudiera influir sobre el curso o severidad de la enfermedad (diabetes, VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes e infecciosas).• Fumador actual (consumo regular de 3 cigarrillos o más a la semana) o que hubiera dejado de fumar en los 3 meses previos a su evaluación para el estudio.

4.1.2 Evaluación Clínica Periodontal.

A cada paciente seleccionado para participar en este estudio, se le realizó una evaluación periodontal completa, elaborada por un clínico calibrado para este propósito. Todas las mediciones clínicas fueron registradas en un periodontograma (**Anexo II**), en el cual se registraron 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes de la boca de cada sujeto de estudio excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios sondeados por sujeto dependiendo del número de dientes

faltantes). El procedimiento se realizó de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura (Haffajee et al., 1983) y todas las mediciones fueron tomadas y registradas en una sola visita. Los parámetros clínicos evaluados y el orden de las mediciones se realizaron de la siguiente manera (**Tabla 7**).

Las mediciones de la profundidad de bolsa y el nivel de inserción fueron registradas dos veces por el mismo clínico y el promedio de las dos mediciones fue utilizado para el análisis de datos. El resto de los parámetros clínicos (presencia o no de biopelícula dental, sangrado y supuración) fueron evaluados en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) o ausencia (0).

Tabla 7. Parámetros clínicos para las mediciones periodontales (Haffajee et al., 1983).

PARÁMETROS CLÍNICOS	
1. Acumulación de placa (0 ó 1)	4. Nivel de inserción (mm)
2. Enrojecimiento gingival (0 ó 1)	5. Sangrado al sondeo (0 ó 1)
3. Profundidad de bolsa (mm)	6. Supuración al sondeo (0 ó 1)

4.1.3 Toma de muestras.

Una vez concluida la evaluación periodontal, a cada sujeto de estudio (N=5) se le tomaron dos muestras de biopelícula subgingival de la zona mesiobucal de dos primeros molares utilizando curetas Gracey (11/12) estériles. En total, de los 5 sujetos de estudio fueron recolectadas 10 muestras de biopelícula subgingival (n=10). Cada muestra fue colocada en un tubo para microcentrifuga con 1 mL de caldo de cultivo enriquecido MB (*Mycoplasma* broth base (BBL™), 0.3 µg/mL de menadiona (vitamina K, Sigma-Aldrich) y 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich).

4.2 *Evaluación microbiológica*

La evaluación microbiológica del presente proyecto de investigación fue realizada en el laboratorio de Genética Molecular de la DEPEI de la Facultad de Odontología, UNAM.

4.3 *Ensayos de susceptibilidad in vitro.*

Cada una de las muestras de biopelícula subgingival se dispersó mediante agitación vigorosa (vórtex) durante 10 segundos y se realizaron 6 diluciones seriales (1:10) de cada una de las muestras. Posteriormente, se sembraron 100 μ L de las diluciones -3 a -6 (**Figura 8**) en placas petri con agar TSA enriquecido (Agar Soya Triptecaseina (BBL™), Brain Heart Infusion Agar (BBL™) y Yeast extract (BBL™), suplementado con 25 mL (5 %) sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V.), menadiona (vitamina K) 5mL (0.3 μ g/mL) y 5 mL (5 μ g/mL) de hemina), y en placas con agar TSA enriquecido adicionadas con 40 mL (16.6 μ g/mL) de NPs-SSB, o con 1 mL (16 μ g/mL) de amoxicilina (Sigma-Aldrich). Una vez sembradas todas las diluciones, las placas Petri fueron incubadas a 35 °C en una cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products Inc., Michigan USA) en condiciones atmosféricas de 80 % N₂, 10 % CO₂ y 10 % H₂ durante 5 días (**Figura 8**).

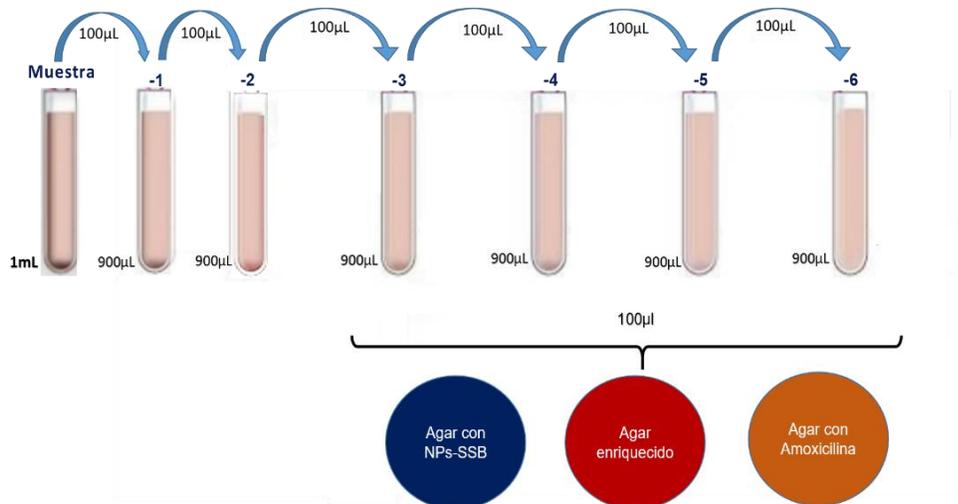


Figura 8. Diluciones seriales y cultivo de cada una de las muestras de biopelícula dental subgingival.

Después de la incubación anaeróbica se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) de todas las placas de agar.

La efectividad antibacteriana de las NPs-SSB sobre los microorganismos cultivables de cada una de las muestras de biopelícula dental fue expresada como porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Dónde:

A1= número de UFCs que crecieron en placas Petri con medio de cultivo (control negativo).

A2= número de UFCs que crecieron en presencia de NPs-SSB ó inhibidor de crecimiento (control positivo).

4.4 *Extracción y cuantificación de DNA bacteriano.*

Una vez seleccionadas las placas de agar en las que crecieron entre 30 a 300 colonias fueron lavadas con 6 mL de PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4 (GIBCO), se transfirió la suspensión obtenida de cada placa de agar a tubos para centrifuga. Cada tubo con la suspensión fue centrifugado en un equipo SORVALL Legent RT a 2600 rpm por 15 minutos a 4 °C para obtener un pellet el cual fue utilizado para la extracción y cuantificación del DNA bacteriano.

De cada tubo con la suspensión centrifugada, se separó y desechó el sobrenadante, y al pellet se le agregaron 200 µL de PBS pH 7.4 para que tuviera una consistencia más fluida y poder recuperarlo con una punta de la pipeta al alicuotar la muestra.

La extracción del DNA bacteriano se realizó con el kit DNeasy UltraCLEAN Microbial Kit (QUIAGEN) (Vesty et al., 2017). Se colocaron 200 µL de la solución del pellet en un tubo eppendorf de 2 mL, después se centrifugó a 100 X 100 g X 10 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 300 µL de las soluciones powerbeat y 50 µL de SL, se procedió a incubar en un thermoblock por 10 min a 55 °C, después se colocó la muestra en un tubo con perlas y se dio vórtex por 10 minutos, se volvió a centrifugar a 100 X 100 g X 2 min, y se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo (del kit), donde se le adicionaron 100 µL de solución IRS y se dio vórtex por 5 segundos. Se incubó a 4 °C por 5 minutos, se volvió a centrifugar (100 X 100 g X 2 min), se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 2 mL, se agregaron 900 µL de solución SB y se dio vórtex por 5 segundos, se transfirió en un tubo con filtro (del kit) y se centrifugó a 100 X 100 g X 2 min. Posteriormente, se colocaron 300 µL de solución CB y se centrifugó a

100 X 100 g X 2 min, se eluyó con 40 µL de agua destilada libre de DNAsas/RNAsas (UltraPure™ de Invitrogen) precalentada a 55 °C, se dejó reposar 5 min, se centrifugó a 100 X 100 g X 2 min, y se recuperó todo el volumen.

Una vez obtenido el DNA bacteriano de cada muestra, se realizó la primera cuantificación con el equipo NANODROP 2000 (Thermo Scientific) para determinar la concentración en nanogramos, la pureza (absorbancia 260/280) y la presencia de contaminantes (absorbancia 230/260). Se tomó un volumen de 2 µL por muestra para su cuantificación, utilizando como blanco agua destilada libre de DNAsas/RNAsas. La segunda cuantificación se realizó mediante el equipo Qubit 3.0, ya que este equipo tiene la capacidad de analizar exclusivamente el DNA de doble cadena (dsDNA), por medio de la unión de un fluoróforo a esta molécula.

Para evaluar la integridad del material genético bacteriano se llevó a cabo la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (Invitrogen). Se utilizaron 100 mL de buffer Tris- acetato y EDTA (TAE) 1X (ThermoFisher). En todos los geles se designó el primer pozo para colocar el peso molecular compuesto por 1 µL de 1 kb DNA Ladder (Biolab), 1 µL de buffer de carga (Biolab) y 4 µL de agua destilada previamente filtrada. En los demás pozos se colocaron las muestras (4 µL de cada muestra y 2 mL de buffer de corrida). Todos los geles se corrieron en la fuente de poder a 120 V, durante 1 hora y se tiñeron con Gel Red.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para la descripción de la población de estudio de donde se obtuvieron las muestras de biopelícula subgingival, se realizó un análisis descriptivo de los

parámetros clínicos evaluados tales como edad, género, profundidad de bolsa, nivel de inserción, acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración, los cuales se expresaron como media (ME) \pm error estándar de la media (EEM) y rango.

Los resultados de la susceptibilidad *in vitro* (actividad antibacteriana) del número de microorganismos presentes en las muestras de biopelícula dental subgingival (n=10) de todos los sujetos de estudio (N=5), se presentan como la media (ME) \pm el error estándar de la media (EEM), en porcentajes de efectividad antibacteriana (% inhibición). Los análisis para determinar las diferencias de entre la efectividad antibacteriana de las NPs-SSB, se llevaron a cabo usando la prueba t-de Student para determinar diferencias significativas.

VII. RESULTADOS.

1. SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPS-SSB.

La caracterización de las NPs-SSB se llevó a cabo tomando como comparativo el SSB en polvo.

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

En la **Figura 9** se muestra el espectro de absorción característico del SSB en polvo y en NPs, se observa la presencia de dos bandas de absorción electrónica en la longitud de onda que va de 234-237 nm y 296-303 nm que corresponden a los grupos funcionales asociados al ácido salicílico presentes en la estructura molecular del SSB, siendo la banda que aparece en 296 nm la más estable y característica del SSB.

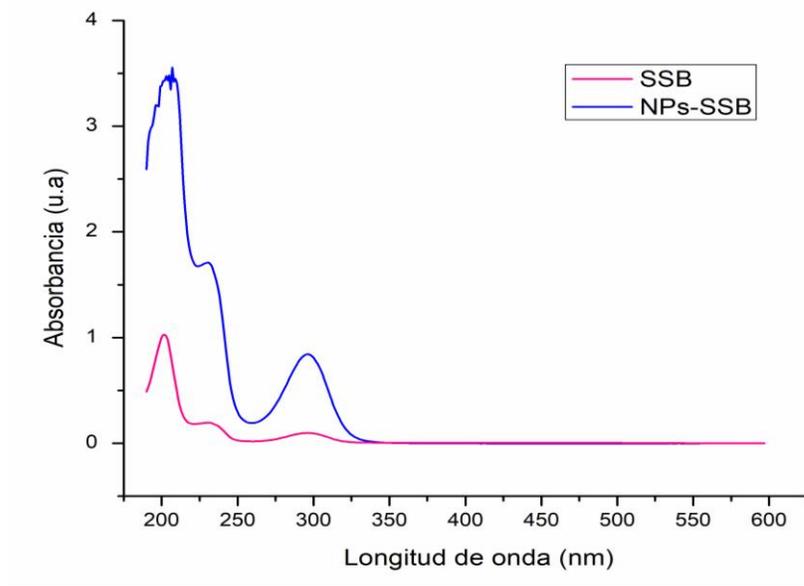


Figura 9. Caracterización con UV-Vis del SSB en bulto y en NPs.

Además, se realizaron mediciones de las NPs-SSB a los días 1, 9, 86 y 170 después de su síntesis, donde se puede observar la estabilidad de las NPs (**Figura 10**).

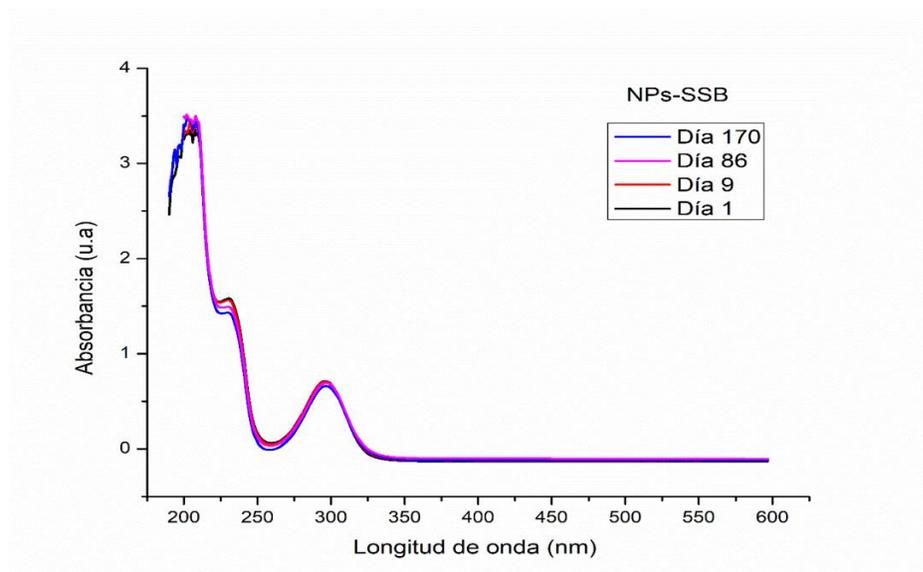


Figura 10. Caracterización con UV-Vis, donde se aprecia la estabilidad de las muestras a los días 9, 86 y 170 después de la síntesis.

1.2 Difracción de Rayos X (XRD).

Como se mencionó anteriormente, se realizó la caracterización del SSB en polvo, con la finalidad de comparar los resultados del SSB en polvo con las NPs. Sin embargo, en esta técnica no fue posible obtener un difractograma de las NPs-SSB debido a que el equipo de XRD, no tiene la sensibilidad de medir tan baja cantidad de NPs-SSB secas. Aunque al obtener las distancias interplanares del SSB en polvo, mediante la técnica de XRD, sirvió como guía para la comparación de las distancias interplanares de las NPs obtenidas mediante HRTEM y esto sugiere que se mantiene la composición química al sintetizarse en NPs se mantiene. En la **Figura 11**, se aprecia el difractograma de rayos X correspondiente al polvo del SSB indicando la distancia interplanar, donde los picos de difracción coincidieron con lo reportados para el SSB con fase triclinica en las Tarjetas PDF (7001563 y 7001555).

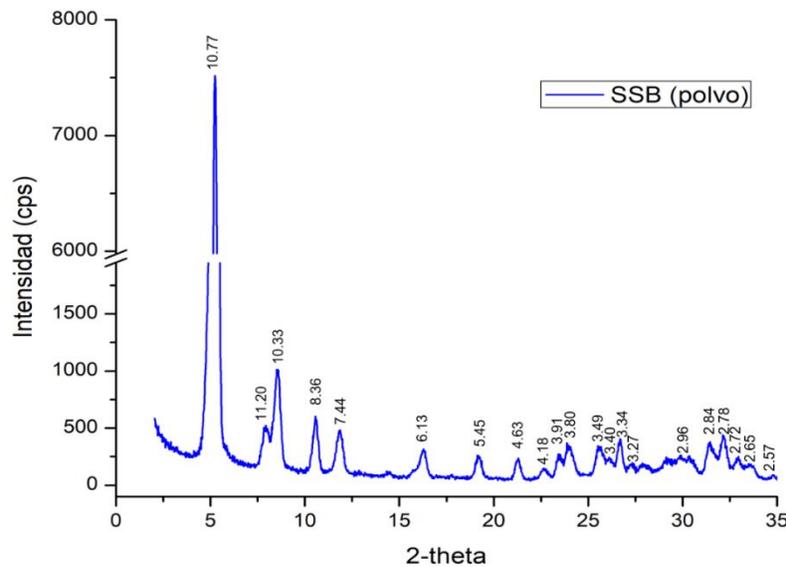


Figura 11. Patrón de XRD del SSB en polvo y distancias interplanares correspondientes.

1.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Mediante esta técnica microscópica, se obtuvieron micrografías de alta resolución donde se observan NPs con morfología cuasiesférica y estructura cristalina (**Figura 12 A, B, C y D**), cuyas distancias interplanares fueron 3.25, 3.27, 2.94 y 2.84 Å, las cuales concuerdan con el patrón de difracción del SSB en bulto de acuerdo a lo reportado en las Tarjetas PDF (7001563 y 7001555).

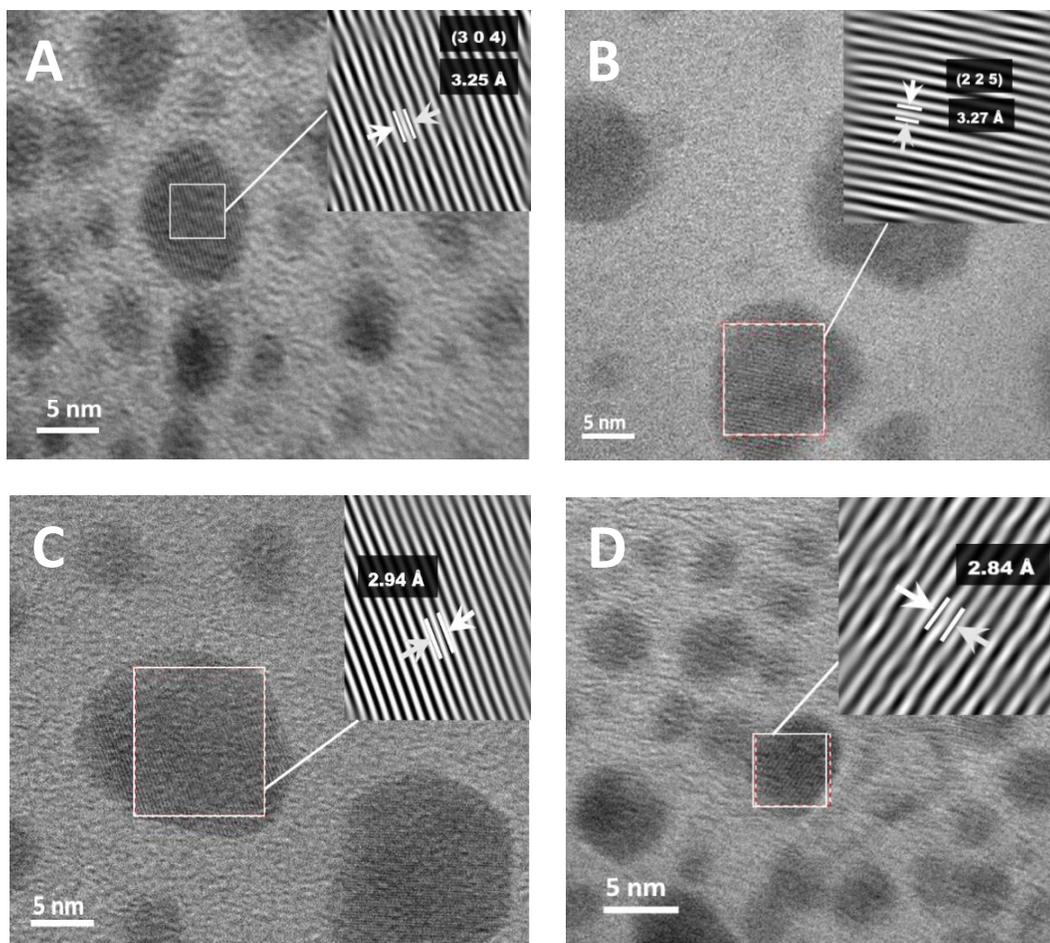


Figura 12 A, B, C y D. Micrografías obtenidas con TEM: (A) Nanopartícula con distancia interplanar de 3.251 Å. (B) Nanopartícula con distancia interplanar de 3.274 Å. (C) Nanopartícula con distancia interplanar de 2.944 Å. (D) Nanopartícula con distancia interplanar de 2.84 Å.

Adicionalmente, por medio de la difracción de electrones (**Figura 13**) también se identificó en las NPs la distancia interplanar 6.439 Å correspondiente al plano (1-1-1) del SSB.

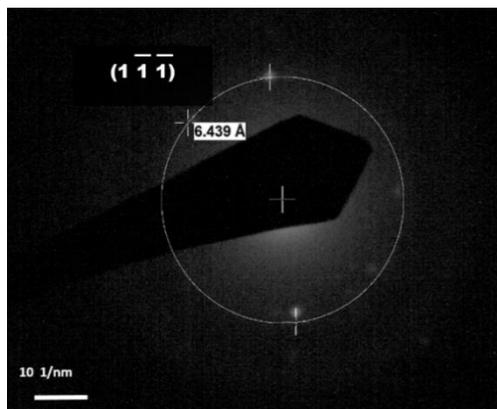


Figura 13. Patrón de difracción de electrones mostrando reflexiones pertenecientes de las NPs-SSB que corresponden al SSB.

Así mismo con las microfotografías obtenidas con TEM, se calcularon los diámetros de las NPs y se realizó un histograma para determinar la distribución de tamaño de las NPs, cuyo promedio corresponde 4.5 ± 0.18 nm (**Figura 14 A y B**).

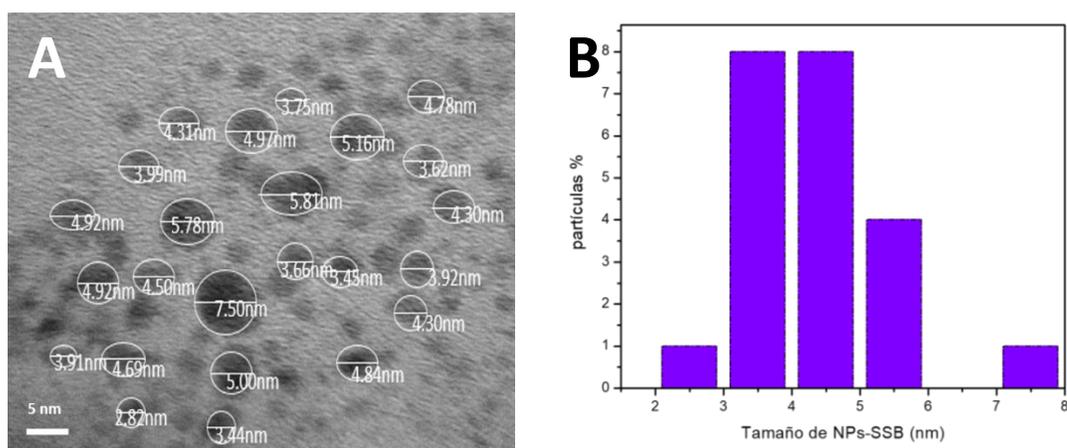


Figura 14 A y B. Tamaño de distribución de nanopartículas. (A) Diámetro de NPs-SSB (B) Histograma donde se registró la distribución de tamaño, y el tamaño promedio de NPs corresponde a 4.5 ± 0.18 nm.

Posteriormente, se volvieron a analizar las NPs mediante TEM para corroborar la presencia y estabilidad de las mismas a los 44 días de que se habían sintetizado (**Figura 15 A, B y C**). En las micrografías obtenidas se aprecia que después de 44 días de la síntesis, las NPs continúan presentes, manteniendo la morfología cuasiesférica, tamaño nanométrico y estructura cristalina que coincide con el sistema cristalino triclinico y con las distancias interplanares 3.27 y 4.19 Å del SSB.

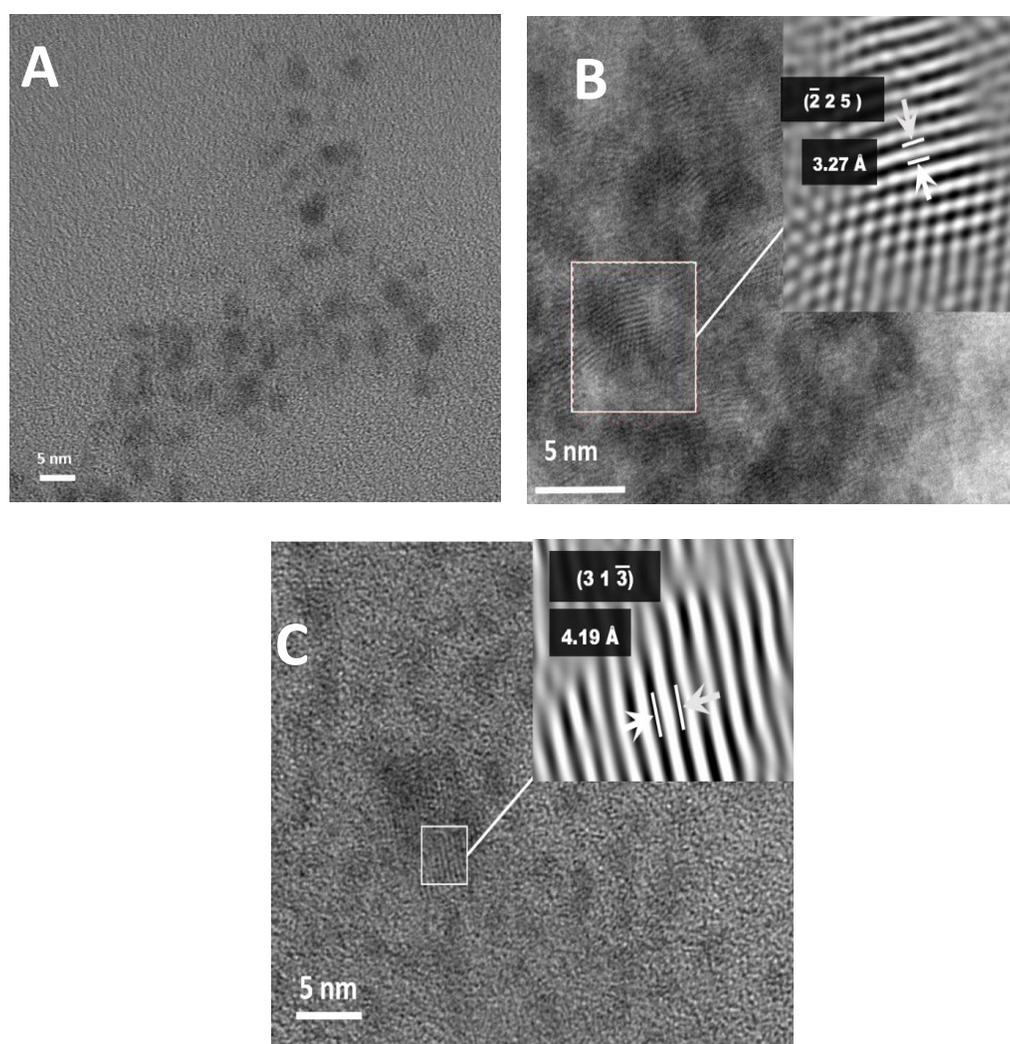


Figura 15 A, B y C. Presencia y estabilidad de las NPs-SSB después de 44 días de la síntesis. (A) Micrografía con NPs. (B) Nanopartícula con distancia interplanar de 3.27 Å. (C) Nanopartícula con distancia interplanar de 4.19 Å.

1.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).

Se realizaron las mediciones del SSB en bulto y en NPs por medio de la espectroscopía infrarroja y en ambos casos, se obtuvieron espectros característicos de esta molécula de estudio (**Figura 16**). Se ha reportado en la literatura que las vibraciones principales que caracterizan al SSB son las vibraciones de los enlaces Bi-O en el número de onda 485 cm^{-1} , el enlace COO^- asimétrico que va de $1523\text{-}1543\text{ cm}^{-1}$ y el simétrico en 1393 cm^{-1} , el enlace $\text{C}=\text{O}$ en 1664 cm^{-1} , y el enlace CH que va de $1258\text{-}1351\text{ cm}^{-1}$ (Timakova et al., 2008, Salavati-Niasari et al., 2014, Ortiz-Quiñonez et al., 2017).

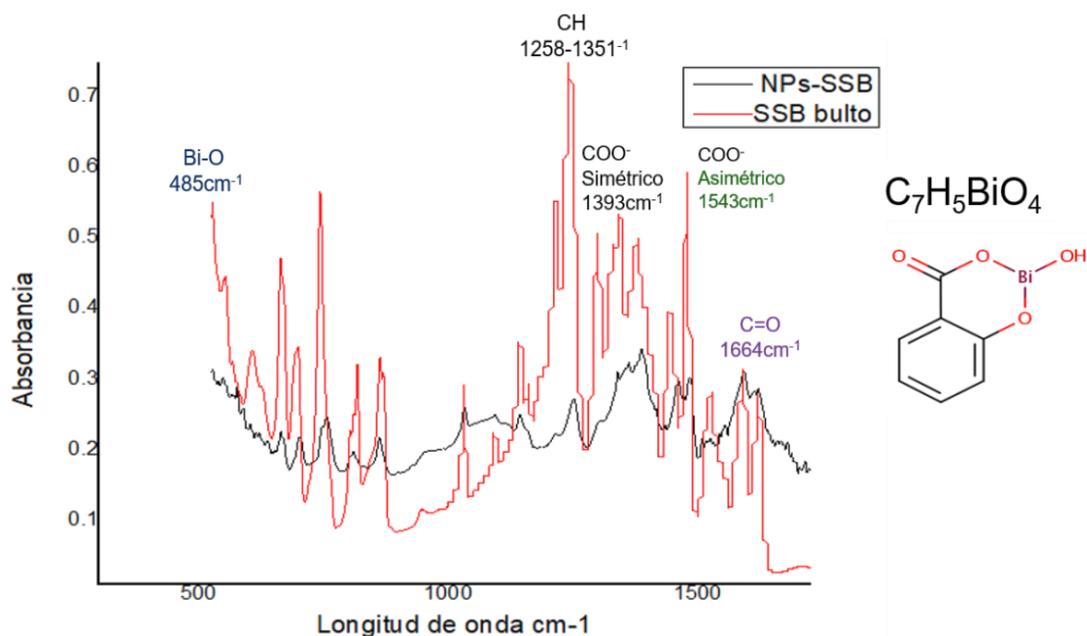


Figura 16. Espectro del SSB en bulto y de las NPs-SSB en ambos casos aparecen las bandas características del SSB.

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS NPs-SSB.

2.1 Características clínicas de la población de estudio.

Las características clínicas de todos los pacientes a los que se les tomaron muestras de biopelícula dental subgingival se describen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Características clínicas de la población de estudio (N = 5).

Características clínicas	Media \pm EEM	Rango
Edad (años)	48.6 \pm 7.6	24-68
Número de dientes perdidos	4.2 \pm 1.3	2 - 7
Género (% mujeres)	60	
Profundidad de bolsa promedio (mm)	3.41 \pm 0.1	3 -3.7
Nivel de inserción promedio (mm)	4.26 \pm 0.4	3.1 -5.4
% de sitios con:		
placa	31.2 \pm 16	0.8 - 86.5
enrojecimiento gingival	22.7 \pm 10.7	1.4 - 58.3
sangrado al sondeo	43 \pm 8.3	19.4 - 64.3
supuración	6.6 \pm 4.4	0.6 - 23.8

2.2 Evaluación microbiológica.

El número de UFCs que fueron contadas en presencia de agar enriquecido (control negativo), o agar enriquecido adicionado con NPs-SSB, o con amoxicilina (control positivo) se presenta en la **Tabla 9**. En esta misma tabla se presenta la efectividad antibacteriana expresada como % de inhibición en presencia de las NPs-SSB.

Tabla 9. Cuantificación de UFCs a partir de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

Paciente/muestra	NPs-SSB	Medio TSA (Control -)	Amoxicilina (Control +)
P1			
A	105	209	0
B	11	150	0
P2			
A	300	350	1
B	75	100	3
P3			
A	290	300	7
B	300	300	11
P4			
A	210	300	295
B	100	170	0
P5			
A	25	130	5
B	150	300	1
ME	156.6*#	230.9	32.3†
EEM	35.41	28.15	29.2
% de inhibición	32.2	NA	86.0
EEM	7.3		76.7

* p< 0.05 NPs-SSB vs. Control -

p< 0.05 NPs-SSB vs. Control +.

† p< 0.001 control - vs. Control +.

Podemos observar que la efectividad de las NPs-SSB para inhibir el crecimiento de microorganismos fue del 32.2 ± 7.3 %, mientras que el control positivo (amoxicilina) presentó un mejor efecto con el 86 ± 76.7 % de inhibición.

2.3 Extracción y cuantificación de DNA bacteriano.

Los resultados de la cuantificación del DNA bacteriano obtenido a partir de las UFCs que crecieron en presencia de agar enriquecido adicionado con NPs-SSB, con amoxicilina (control positivo) y con agar enriquecido (control negativo),

se presenta en la **Tabla 10**. Los resultados son expresados como la ME \pm EEM. La pureza (absorbancia en 260/280) de las muestras fue de 1.87 ± 0.02 y las mediciones para evaluar la presencia de contaminantes (absorbancia en 230/260) mostraron un valor de 1.81 ± 0.04 .

Tabla 10. Cuantificación del DNA bacteriano a partir de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

Equipo	NPs-SSB (ng/ μ L)	Control Negativo (ng/ μ L)	Control positivo (ng/ μ L)
Nanodrop	51.82 \pm 16.54	110.51 \pm 37.13	31.8 \pm 12.01
Qubit	18.7 \pm 6.14	29.09 \pm 9.19	10.82 \pm 4.74

En la **Figuras 17**, se muestran los gels de agarosa que se realizaron para comprobar la integridad del DNA bacteriano de las muestras. En la parte inferior se señala la concentración obtenida de cada muestra.

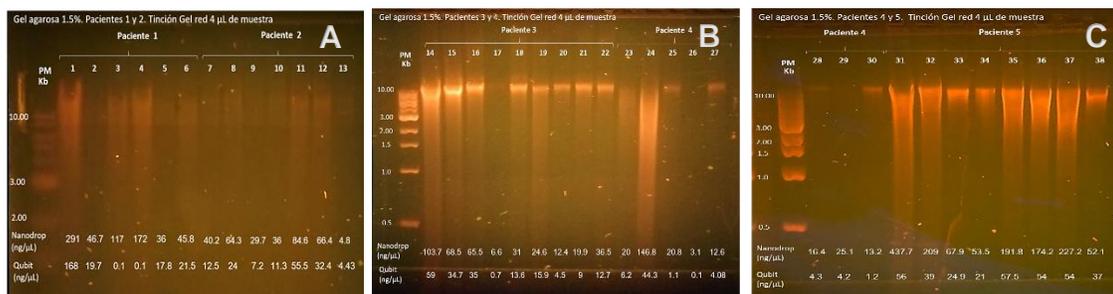


Figura 17. Gel de agarosa de las muestras de DNA bacteriano
A) Pacientes 1 y 2. **B)** Pacientes 3 y 4. **C)** Pacientes 4 y 5.

VIII. DISCUSIÓN.

En el presente proyecto de investigación se evaluó el efecto antibacteriano de nanopartículas de subsalicilato de bismuto en contra de microorganismos provenientes de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

En este estudio se sintetizaron NPs de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) suspendidas en agua, por medio de la técnica de ablación láser de un sólido inmerso en un medio líquido (ALSL). En diversas investigaciones se ha demostrado que sintetizar NPs con esta técnica, permite controlar los parámetros de síntesis y con ello, modificar propiedades como forma, tamaño y concentración de las nanopartículas en la solución coloidal. La eficacia de esta técnica para sintetizar NPs metálicas y orgánicas utilizando diversos medios líquidos y materiales ha sido reportada previamente (Mafuné et al., 2000, Mafuné et al., 2003, Yang, 2007, Correard et al., 2014, Flores-Castañeda et al., 2019). Además, la técnica de ALSL no requiere de precursores químicos a diferencia otras técnicas convencionales como la de reducción química (Martínez-Castañón et al., 2008, Guzmán et al., 2009, Vatandost et al., 2016), y tampoco requiere ajustar la temperatura, ni el uso de cámaras de alto vacío como en la síntesis de NPs con depósito químico en fase vapor (CVD) (Bachmatiuk et al., 2009, Hoyos-Palacio et al., 2019).

Una ventaja de utilizar agua como medio de síntesis es que permite el paso de luz en las técnicas de caracterización (Labille et al., 2010). Y nosotros observamos que al sintetizar NPs-SSB utilizando agua estéril y trabajando en

condiciones limpias, se favoreció la estabilidad del coloide, ya que se mantuvieron estables hasta por 170 días. En un estudio donde se sintetizaron NPs de cobre (NPs-Cu) utilizando agua, se reportó una estabilidad de dos semanas debido a procesos de oxidación (Tilaki et al., 2007), mientras que en otro estudio donde también se utilizó agua como medio de síntesis de nanopartículas de Pt y Au, éstas mostraron ser estables durante un mes (Mafuné et al., 2003, Kim et al., 2009).

En otras investigaciones, se han probado diferentes líquidos para mantener la estabilidad de las NPs en un medio líquido, como acetona y dodecil sulfato de sodio (SDS), con resultados variables; en la síntesis de NPs-Cu utilizando acetona mantuvo la estabilidad de las NPs por 10 meses (Tilaki et al., 2007), mientras que con el uso del SDS en la síntesis de NPs de Pt se mantuvo la misma estabilidad que las NPs sintetizadas en agua (Mafuné et al., 2003). Un factor importante para mantener la estabilidad de las NPs sintetizadas en medio líquido, es que el material que se desea nanoestructurar debe ser insoluble en el medio líquido utilizado, de lo contrario la estabilidad y concentración de las NPs obtenidas será limitado y podrá modificarse con el paso del tiempo (Cowen et al., 2018).

Actualmente, los únicos estudios publicados acerca de la síntesis y caracterización de NPs-SSB han sido reportados por parte de nuestro grupo de trabajo, los cuales demuestran que el SSB en forma de NPs es un eficaz agente antimicrobiano contra bacterias aerobias y anaerobias presentes en la cavidad oral (Vega-Jimenez et al., 2017, Flores-Castañeda et al., 2015). Sin embargo, existen diversas publicaciones acerca de la síntesis de NPs a partir de sales de Bi, por ejemplo; NPs de Bi (NPs-Bi) (Nazari et al., 2014), NPs de óxido de Bi (NPs- Bi_2O_3)

(Hernandez-Delgadillo et al., 2012), NPs de bismuto dimercaptopropanol (Badireddy et al., 2014).

Una de las técnicas con las que se evaluó la presencia de las NPs-SSB fue la espectroscopía de absorbancia UV-Vis. Aunque hasta la fecha no existen referencias disponibles de los espectros de absorción moleculares del SSB que permitan su correcta identificación con esta técnica, al poseer iones salicilato se espera que los grupos funcionales del ácido salicílico dominen en el espectro UV-Vis del SSB (Purvis, 1926). Además, en los hallazgos reportados previamente (Flores-Castañeda et al., 2015), se ha observado que las bandas de absorción en el rango UV-Visible del polvo de SSB dispersado en agua y los coloides obtenidos después del proceso de ablación (NPs-SSB) fueron similares, lo que indica una estructura molecular similar y que el proceso de ablación láser no descompone la estructura química del SSB (Tomaszewska et al., 2013). La determinación de la concentración de los coloides con la técnica de espectroscopía UV-Vis, se realizó mediante una curva de calibración. Este procedimiento también se ha reportado para calcular concentraciones de SSB en bulto a partir de una solución stock de SSB diluido en ácido clorhídrico (Shinde et al., 2017) y en NPs poliméricas (Klepac-Ceraj et al., 2011).

La morfología y el tamaño de las NPs-SSB fueron determinadas mediante la técnica TEM. La morfología de las NPs-SSB se consideró cuasiesférica, mientras que el tamaño promedio obtenido fue de 4.5 ± 0.18 nm. En la literatura se ha descrito la obtención NPs con morfología circular en distintos tipos síntesis y materiales como Cu, Au y Ag (Wu et al., 2004, Tilaki et al., 2007, Raza et al.,

2016) y también NPs con forma triangular, hexagonal principalmente en óxidos metálicos como las NPs de ZnO (Raza et al., 2016).

Con los parámetros de síntesis utilizados en este estudio (λ del láser de 532 nm, pulsos 5 ns, energía de salida máxima de 60 mJ, frecuencia de repetición de 10 Hz y distancia del blanco a la lente de enfoque de 14 cm) se obtuvieron NPs con un tamaño promedio de 4 nm el cual es menor al tamaño promedio reportado en estudios anteriores, en donde los tamaños de NPs-SSB que obtuvieron, fueron de 22, 31, 45 y 58 nm, esto se debió a los distintos parámetros de síntesis (λ del láser de 1064 nm, pulsos 28 ns, energía de salida máxima de 135 mJ, frecuencia de repetición de 20 Hz y principalmente a la distancia del blanco a la lente de enfoque que fue de 21-24 cm) (Vega-Jimenez et al., 2017, Flores-Castañeda et al., 2015).

El haber logrado sintetizar NPs de menor tamaño es favorable con lo reportado en la literatura, ya que se tiene la noción de que las NPs más pequeñas pueden interactuar con mayor facilidad con las membranas de los microorganismos, mejorando su acción antibacteriana y reduciendo la concentración necesaria para ser efectivas (Kattan, 2011, Raza et al., 2016).

Otros tipos de NPs basadas en bismuto se han obtenido en tamaños de 6 nm (Hernandez-Delgadillo et al., 2012) hasta 100 nm (Nazari et al., 2014). De la misma manera, NPs elaboradas a partir de otros elementos como Ag, CuO Y ZnO se han sintetizado en tamaños de 9 nm hasta 300 nm (Basith et al., 2014, Raza et al., 2016, Jayaprakash et al., 2017).

La estructura cristalina de las NPs-SSB que se sintetizaron, coincidió con la estructura cristalina del SSB en bulto que es un sistema triclinico y del grupo

espacial P-1 (2). Esto indica que al comparar las mediciones de las distancias interplanares de las NPs obtenidas con HRTEM, con las distancias interplanares del SSB en bulto obtenidas con XRD. Otras NPs sintetizadas a partir de materiales como el Ni, Cu, Zn y Fe, han sido caracterizadas de la misma manera, es decir comparando las distancias interplanares del material en bulto por medio de XRD, con las distancias interplanares las NPs obtenidas por HRTEM (Chaudhari et al., 2013). En este estudio, tanto el material en bulto, como las NPs de SSB coincidieron con lo establecido en las tablas internacionales de cristalografía de Rayos X (7001563 y 7001555). De manera similar, las bandas obtenidas en el espectro de absorción de FTIR del SSB en bulto y las NPs-SSB coincidieron con los espectros FTIR del SSB reportados en la literatura (Timakova et al., 2008, Nazari et al., 2014, Ortiz-Quiñonez et al., 2017) confirmando con ello que se mantiene la molécula del SSB en las NPs obtenidas.

Por otra parte, el efecto antibacteriano de las NPs-SSB se estudió utilizando muestras de biopelículas subgingivales de pacientes con enfermedad periodontal, las cuales fueron cultivadas en condiciones anaeróbicas en placas de agar enriquecido adicionadas con las NPs-SSB. La capacidad de las NPs de inhibir el crecimiento de las bacterias provenientes de las muestras clínicas, se evaluó mediante el conteo de las UFCs y la medición del DNA bacteriano presente en los cultivos expuestos a las NPs. Los resultados mostraron que el número de UFCs fue directamente proporcional a la cantidad de DNA cuantificado en cada muestra, es decir, a menor número de UFCs y cantidad de DNA, menor crecimiento bacteriano.

En el área médica se ha propuesto que una de las principales ventajas del

trabajo interdisciplinario con la nanotecnología, es que al usar materiales con propiedades terapéuticas en tamaño nanométrico en vez del material el bulto, se requiere de una menor concentración de éste para lograr el efecto terapéutico deseado (Hofmann-Antenbrink et al., 2015). Por ejemplo, se ha reportado que para inhibir el crecimiento *in vitro* de especies como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*, se requiere de al menos 10 mM (3,600 µg/mL) a 50 mM (18,100 µg/mL) de SSB en bulto, (Manhart, 1990). De la misma manera, en un estudio previo se evaluó el efecto antibacteriano del SSB en bulto contra especies como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, demostrando que la capacidad inhibitoria de este compuesto en bulto se obtiene a partir de concentraciones equivalentes a 1,700 µg/mL (Vega-Jiménez A et al., 2012). Mientras que en otra investigación donde se evaluaron las mismas especies bacterianas, pero usando NPs de SSB, se reportó una inhibición del 80 % utilizando una concentración de 193 µg/mL (Flores-Castañeda et al., 2015). Y más aún, en otro estudio donde se evaluaron las mismas NPs-SSB en contra de bacterias presentes en la cavidad oral como *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis*, *P. gingivalis*, se alcanzaron porcentajes de inhibición entre 70 y 90 % con una concentración de 21.7 µg/mL (Vega-Jimenez et al., 2017). En el presente estudio, el efecto antibacteriano de las NPs-SSB mostró que con una concentración relativamente baja de NPs de SSB (16.6 µg/mL) se logró inhibir el crecimiento del 32.2 % de los microorganismos cultivados a partir de muestras de biopelícula dental de pacientes con enfermedad periodontal. El hecho de haber encontrado un menor efecto inhibitorio en aislados clínicos que el encontrado previamente en estudios *in vitro*, es consistente con lo reportado en la literatura donde se ha demostrado que la inhibición de cepas tipo

(ej. ATCC), requiere de una menor concentración del compuesto antimicrobiano, comparado con la concentración requerida para inhibir el crecimiento de cepas provenientes de muestras clínicas (Badireddy et al., 2014, Modaresi, 2017, Espinosa-Cristóbal et al., 2019). Diversos estudios demuestran que esto también es cierto para las NPs con efecto antibacteriano, un estudio reportó que la concentración requerida de NPs de Bi dimercaptopropanol (BisBAL) para inhibir cepas de *S. mutans* y *Streptococcus gordonii* en estado planctónico era de 5 μM , mientras que para inhibir su crecimiento en biopelícula era necesaria una concentración de 100 μM (Badireddy et al., 2014). También se encuentra reportado en la literatura que la concentración de NPs de Ag requerida para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias orales como *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *S. mitis*, *S. mutans* y *S. sanguis* es de 25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Lu et al., 2013), mientras que otro estudio reportó que para inhibir el crecimiento de especies similares obtenidas de biopelículas orales aisladas clínicamente de pacientes con caries dental y enfermedad periodontal, fue requerida una concentración de 1070 $\mu\text{g/mL}$ de NPs de Ag (Espinosa-Cristóbal et al., 2019). En otra investigación donde también se utilizaron NPs de Ag, se reportó que bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* aisladas a partir de biopelículas, eran en promedio 25 veces más resistentes que cuando se analizaron en estado planctónico (Radzig et al., 2013). De manera similar, Modaresi y cols. evaluaron el efecto inhibitorio de NPs de Cu y Zn en contra de especies bacterianas como *S. mutans* y *S. sanguinis*, reportando que la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue de 0.039 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en bacterias obtenidas a partir de aislados clínicos de biopelícula y caries dental, la MIC fue de 10 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (Modaresi, 2017). En un estudio se reportó la inhibición

del crecimiento bacteriano de aislados clínicos utilizando 10 µg/mL de NPs de ZnO y CuO; sin embargo, para evitar la formación de biopelículas de dichas muestras, se requirieron concentraciones de 50 a 100 µg/mL de las NPs (Khan et al., 2013).

Es importante mencionar que en la literatura se encuentra reportado una gran variedad de NPs con efecto antibacteriano, en su mayoría sintetizadas a partir de materiales metálicos y óxidos metálicos (Stankic et al., 2016, Parham et al., 2016, Hoseinzadeh et al., 2017, Pareek et al., 2017, Sánchez-López et al., 2020). Además, algo que destaca en las diversas investigaciones, es que la mejor inhibición bacteriana ha sido en las NPs de menor tamaño (Martínez-Castañón et al., 2008, Lu et al., 2013, Raza et al., 2016).

Los resultados de la presente investigación demostraron que las NPs-SSB con un tamaño de 4.5 ± 0.18 nm, inhibieron el crecimiento bacteriano a partir de muestras clínicas. Mientras que en la literatura se ha descrito que las NPs de Ag con un tamaño de ~10 nm fueron más efectivas contra *Streptococcus* sp., *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *P. intermedia* que con un tamaño de partícula de ~30 nm (Espinosa-Cristóbal et al., 2019). En otro estudio donde también evaluaron NPs de Ag con diferentes tamaños (7, 29 y 89 nm), se observó un mejor efecto inhibitorio de *S. aureus* y *E. coli* cuando estuvieron en presencia de las NPs de menor tamaño (Martínez-Castañón et al., 2008). Éstas mismas especies mostraron mayor sensibilidad al estar en contacto con NPs de Ag recubiertas con Ti con un tamaño de ~10 nm, que las NPs con un tamaño de ~100 nm (Juan et al., 2010).

Respecto al papel que juega la composición química de las NPs-SSB en su efectividad antimicrobiana, el efecto antibacteriano de NPs sintetizadas a partir de compuestos de Bi ha sido poco investigado. En los últimos 20 años, de

aproximadamente 300 estudios de NPs de compuestos de Bi publicados, únicamente 12 se relacionan con el análisis de su actividad antimicrobiana (Vazquez-Munoz et al., 2020). Una de las bacterias bucales más estudiada utilizando nanocompuestos de Bi ha sido *S. mutans*, en un estudio se reportó que NPs de Bi cerivalente (NPs-BiZV) tuvieron un efecto inhibitorio del 69% a una concentración de 2,000 μM (Hernandez-Delgadillo et al., 2012), mientras que las NPs de bismuto dimercaptopropanol (NPs-BisBAL) tuvieron un efecto antibacteriano del 70% a una concentración de 0.1 μM en la misma especie bacteriana (Badireddy et al., 2014). Otra investigación evaluó que las NPs-SSB inhibieron el 71 % del crecimiento bacteriano de *S. mutans* a una concentración de 21.7 $\mu\text{g/mL}$ (Vega-Jimenez et al., 2017). Existen otros estudios que han analizado el efecto inhibitorio de nanocompuestos basados en Bi, un estudio reportó que la MIC para inhibir a *H. pylori* utilizando NPs de Bi (NPs-Bi) con un tamaño de 100 era de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Nazari et al., 2014), de la misma manera, NPs de subcarbonato de Bi ($(\text{BiO})_2\text{CO}_3$) con un tamaño de 10 nm tuvieron una actividad antimicrobiana inhibiendo el 85 % con una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ con la misma especie bacteriana (Chen et al., 2010).

Aunque actualmente no se conoce con exactitud el mecanismo de acción del SSB, se ha reportado que este compuesto tiene la capacidad de reducir la producción de polisacáridos capsulares en bacterias Gram negativas (Domenico et al., 1991) y que su mecanismo de acción en contra de bacterias como *E. coli* puede estar relacionado con la interrupción de la síntesis de ATP o la pérdida de integridad de la membrana bacteriana, además de ser más efectiva su capacidad antimicrobiana en pH ácido (Sox et al., 1989).

Se ha reportado que las sales de Bi pueden afectar la pared celular, el citoplasma bacteriano (Dodge et al., 2005) y las moléculas del glucocálix de la superficie celular bacteriana (Stratton et al., 1999). El Bi también pueden causar la inhibición de enzimas como ureasa, catalasa (Lambert et al., 1997), e incluso, se ha mencionado que el efecto antibacteriano del Bi podría estar relacionado a la limitación del hierro (Bland et al., 2004), ocasionando con ello la reducción en los niveles intracelulares de ATP (Sox et al., 1989) y la reducción en la producción de polisacáridos capsulares (Domenico et al., 1991). En el caso de las NPs de Bi, se sabe que pueden alterar el metabolismo del ciclo de Krebs, así como la producción de nucleótidos y aminoácidos de *H. pylori* (Nazari et al., 2014).

En este estudio se observó un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de especies provenientes de muestras de biopelícula tomadas del espacio subgingival de pacientes con enfermedad periodontal, cuando estuvieron en contacto con las NPs-SSB. Este efecto inhibitorio podría ser atribuible a la perturbación de algunas enzimas y biomoléculas que participan en el metabolismo bacteriano similar al mecanismo de acción reportados de las sales de Bi y SSB en *H. pylori* y *E. coli*. Considerando lo anterior, las NPs-SSB podrían tener un efecto bacteriostático y bactericida, sin embargo, se necesitan más estudios para poder profundizar en este respecto.

Finalmente, el efecto antibacteriano observado en contra de los aislados clínicos de muestras de biopelícula subgingival, se podría mejorar o potencializar aumentando la concentración de las NPs, ya que la concentración utilizada (16.6 µg/mL) está muy por debajo de una concentración que podría considerarse citotóxica (60 µg/mL) (Vega-Jimenez et al., 2017). Cabe destacar que se utilizó

esta esta concentración de NPs-SSB por el efecto inhibitorio que mostraron en los experimentos piloto a este estudio que se realizaron con bacterias ATCC. Sin embargo, ahora sabemos que las bacterias presentes en las muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal son más resistentes que las bacterias que han sido cultivadas *in vitro*.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Con los resultados del presente proyecto de investigación, podemos concluir lo siguiente:

- La utilización de la técnica de ablación láser de un material sólido inmerso en un medio líquido (ALSL) permitió la obtención de nanopartículas de subsalicilato de bismuto (NPs-SSB) suspendidas en agua, las cuales presentaron una morfología cuasiesférica y un tamaño promedio de ~4 nm, además de mantenerse estables hasta por 170 días.
- Mediante diferentes técnicas de caracterización físico-química, se comprobó que las nanopartículas sintetizadas mantuvieron la estructura correspondiente al SSB.
- Las NPs-SSB fueron capaces de inhibir el ~30% del crecimiento de bacterias anaerobias cultivables, provenientes de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con enfermedad periodontal.

Es importante continuar con la identificación de los microorganismos subgingivales provenientes de pacientes con enfermedad periodontal que

mostraron susceptibilidad al efecto de las NPs-SSB. Cabe destacar que es posible optimizar el efecto antibacteriano de estas NPs aumentando la concentración de las mismas, ya que el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano obtenido en este estudio se logró utilizando una concentración muy baja de NPs-SSB. Por lo que proponemos continuar profundizando en estudio de las propiedades antibacterianas de las NPs-SSB realizando ensayos que permitan entender el mecanismo de acción de las NPs-SSB contra las especies bacterianas, para optimizar su enfoque terapéutico y potencial uso clínico en el área odontológica, considerando aspectos como la citotoxicidad en las células humanas para evitar efectos secundarios indeseados.

A pesar de que no fue posible concluir con los experimentos de identificación de las especies bacterianas que fueron sensibles o resistentes al efecto antibacteriano de las NPs-SSB, con los resultados obtenidos concluimos que éstas NPs tienen el potencial para ser utilizadas como agentes antimicrobianos alternativos al tratamiento de las enfermedades periodontales, evitando el uso indiscriminado y/o excesivo de antibióticos y por ende el aumento de la resistencia bacteriana.

X. REFERENCIAS.

1. Abdelkader, H., Patel, D. V., McGhee, C. N., & Alany, R. G. (2011) New therapeutic approaches in the treatment of diabetic keratopathy: A review. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 39, 259–270.
2. Addy, M. & Moran, J. M. (1997) Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000* 15, 52-54.
3. Alharbi, S. A., Mashat, B. H., Al-Harbi, N. A., Wainwright, M., Aloufi, A. S. & Alnaimat, S. (2012) Bismuth-inhibitory effects on bacteria and stimulation of fungal growth in vitro. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 147-150.
4. Almaguer-Flores, A., Moreno-Borjas, J. Y., Salgado-Martinez, A., Sanchez-Reyes, M. A., Alcantara-Maruri, E. & Ximenez-Fyvie, L. A. (2006) Proportion of antibiotic resistance in subgingival plaque samples from Mexican subjects. *J Clin Periodontol* 33, 743-748.
5. Allaker, R. P. & Ren, G. (2008) Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102, 1-2.
6. Ameh, E. S. (2019) A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 105, 3289-3302.
7. Bachmatiuk, A., Borrnert, F., Grobosch, M., Schäffel, F., Wolff, U., Scott, A., Zaka, M., Warner, J. H., Klingeler, R. & Knupfer, M. (2009) Investigating the graphitization mechanism of SiO₂ nanoparticles in chemical vapor deposition. *Acs Nano* 3, 4098-4104.
8. Badireddy, A. R., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Chellam, S. & Cabral-Romero, C. (2014) Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *Journal of nanoparticle research* 16, 2456.
9. Bagchi, D., Carryl, O. R., Tran, M. X., Krohn, R. L., Bagchi, D. J., Garg, A., Bagchi, M., Mitra, S. & Stohs, S. J. (1998) Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *J Appl Toxicol* 18, 3-13.
10. Bagchi, D., McGinn, T. R., Ye, X., Balmoori, J., Bagchi, M., Stohs, S. J., Kuszynski, C. A., Carryl, O. R. & Mitra, S. (1999) Mechanism of gastroprotection by bismuth subsalicylate against chemically induced oxidative stress in cultured human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 44, 2419-2428.
11. Barbero, N., Delfino, M., Palmisano, C. & Zosi, G. (2014) Fundamentals of X-Ray Diffraction and X-Ray Interferometry. In: *Pathways Through Applied and Computational Physics*, pp. 7-107. Milano: Springer Milan.
12. Basith, N. M., Vijaya, J. J., Kennedy, L. J., Bououdina, M., Jenefar, S. & Kaviyaran, V. (2014) Co-doped ZnO nanoparticles: structural, morphological, optical, magnetic and antibacterial studies. *Journal of Materials Science & Technology* 30, 1108-1117.
13. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. (2019) The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25, 112.
14. Behzadi, S., Ghasemi, F., Ghalkhani, M., Ashkarran, A. A., Akbari, S. M., Pakpour, S., Hormozi-Nezhad, M. R., Jamshidi, Z., Mirsadeghi, S., Dinarvand, R., Atyabi, F. & Mahmoudi, M. (2015) Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. *Nanoscale* 7, 5134-5139.
15. Belstrom, D., Grande, M. A., Sembler-Moller, M. L., Kirkby, N., Cotton, S. L., Paster, B. J. & Holmstrup, P. (2018) Influence of periodontal treatment on subgingival and salivary microbiotas. *Journal of Periodontology* 89, 531-539.

16. Bierer, D. W. (1990) Bismuth subsalicylate: history, chemistry, and safety. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 1, S3-8.
17. Binney, A., Addy, M., Owens, J. & Faulkner, J. (1997) A comparison of triclosan and stannous fluoride toothpastes for inhibition of plaque regrowth. A crossover study designed to assess carry over. *J Clin Periodontol* 24, 166-170.
18. Bland, M. V., Ismail, S., Heinemann, J. A. & Keenan, J. I. (2004) The action of bismuth against *Helicobacter pylori* mimics but is not caused by intracellular iron deprivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1983-1988.
19. Borisov, S. V. & Podberezskaya, N. V. (2012) X-ray diffraction analysis: A brief history and achievements of the first century. *Journal of Structural Chemistry* 53, 1-3.
20. Bradley, B., Singleton, M. & Lin Wan Po, A. (1989) Bismuth toxicity--a reassessment. *J Clin Pharm Ther* 14, 423-441.
21. Brauer, D. S., Saeki, K., Hilton, J. F., Marshall, G. W. & Marshall, S. J. (2008) Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. *Dental Materials* 24, 1137-1140.
22. Brewster, D. (1833) On the action of crystallized surfaces upon light. *Abstracts of the Papers Printed in the Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 2, 111.
23. Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M. & Tonetti, M. S. (2018) A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 45, S1-S8.
24. Citeau, A., Guicheux, J., Vinatier, C., Layrolle, P., Nguyen, T. P., Pilet, P. & Daculsi, G. (2005) In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* 26, 157-165.
25. Cornick, N. A., Silva, M. & Gorbach, S. L. (1990) In vitro antibacterial activity of bismuth subsalicylate. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 1, S9-10.
26. Correard, F., Maximova, K., Estève, M. A., Villard, C., Roy, M., Al-Kattan, A., Sentis, M., Gingras, M., Kabashin, A. V. & Braguer, D. (2014) Gold nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous biocompatible solutions: assessment of safety and biological identity for nanomedicine applications. *Int J Nanomedicine* 9, 5415-5430.
27. Costalonga, M. & Herzberg, M. C. (2014) The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters* 162, 22-38.
28. Cowen, T., Karim, K. & Piletsky, S. A. (2018) Solubility and size of polymer nanoparticles. *Polymer Chemistry* 9, 4566-4573.
29. Chapple, I. L. C. & Genco, R. (2013) Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 40, S106-S112.
30. Chaudhari, V., Shirsath, S. E., Mane, M. L., Kadam, R. H., Shelke, S. B. & Mane, D. R. (2013) Crystallographic, magnetic and electrical properties of Ni_{0.5}Cu_{0.25}Zn_{0.25}La_xFe_{2-x}O₄ nanoparticles fabricated by sol-gel method. *Journal of Alloys and Compounds* 549, 213-220.
31. Chen, R., Cheng, G., So, M. H., Wu, J., Lu, Z., Che, C.-M. & Sun, H. (2010) Bismuth subcarbonate nanoparticles fabricated by water-in-oil microemulsion-assisted hydrothermal process exhibit anti-*Helicobacter pylori* properties. *Materials Research Bulletin* 45, 654-658.
32. Chen, W. C., Hsu, S. M., Ko, J. H., Lin, C. C. & Lin, D. J. (2014) Effects of Bismuth Subgallate on Properties of Calcium Phosphate Bone Cement in Vitro. *Journal of Medical and Biological Engineering* 34, 8-13.

33. Cheng, Y. & Zhang, H. (2018) Novel Bismuth-Based Nanomaterials Used for Cancer Diagnosis and Therapy. *Chemistry* 24, 17405-17418.
34. Chowdhury, H. R., Yunus, M., Zaman, K., Rahman, A., Faruque, S. M., Lescano, A. G. & Sack, R. B. (2001) The efficacy of bismuth subsalicylate in the treatment of acute diarrhoea and the prevention of persistent diarrhoea. *Acta Paediatr* 90, 605-610.
35. da Fonseca, M. A. (2000) Adverse reaction to amoxicillin: a case report. *Pediatr Dent* 22, 401-404.
36. Dagli, N., Dagli, R., Mahmoud, R. S. & Baroudi, K. (2015) Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 5, 335-340.
37. de la Cruz, F. & Gadd, G. M. (2012) Nanobiotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 23, 501-502.
38. Degos, R. (1977) Bismuth in the treatment of syphilis. *Int J Dermatol* 16, 391-392.
39. Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Lakshmanan, A. & Wade, W. G. (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192, 5002-5017.
40. Díaz, M. S., Freile, M. L. & Gutiérrez, M. I. (2009) Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8, 970-974.
41. Dodge, A. G. & Wackett, L. P. (2005) Metabolism of bismuth subsalicylate and intracellular accumulation of bismuth by *Fusarium* sp. strain Bl. *Appl Environ Microbiol* 71, 876-882.
42. Domenico, P., Landolphi, D. R. & Cunha, B. A. (1991) Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of aminoglycoside inhibition in gram-negative bacteria by bismuth subsalicylate. *J Antimicrob Chemother* 28, 801-810.
43. Duggar, B. M. (1948) Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 177-181.
44. Durig, J. R. (1996) Molecular dipole moment derivatives as infrared intensity parameters. In: *Vibrational Spectra and Structure*, (eds.) B. S. Galabov & T. Dudev, pp. 77-140. Elsevier.
45. Eckert, M. (2012) Max von Laue and the discovery of X-ray diffraction in 1912. *Annalen der Physik* 524, A83-A85.
46. Escapa, I. F., Chen, T., Huang, Y., Gajare, P., Dewhirst, F. E. & Lemon, K. P. (2018) New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract.
47. Espinosa-Cristóbal, L. F., Holguín-Meráz, C., Zaragoza-Contreras, E. A., Martínez-Martínez, R. E., Donohue-Cornejo, A., Loyola-Rodríguez, J. P., Cuevas-González, J. C. & Reyes-López, S. Y. (2019) Antimicrobial and Substantivity Properties of Silver Nanoparticles against Oral Microbiomes Clinically Isolated from Young and Young-Adult Patients. *Journal of Nanomaterials* 2019, 2-14.
48. Fardai, O. & Turnbull, R. S. (1986) A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *The Journal of the American Dental Association* 112, 863-869.
49. Filoche, S., Wong, L. & Sissons, C. H. (2010) Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. 89, 8-18.
50. Flores-Castañeda, M., Vega-Jiménez, A. L., Almaguer-Flores, A., Camps, E., Pérez, M., Silva-Bermudez, P., Berea, E. & Rodil, S. E. (2015) Antibacterial effect of bismuth subsalicylate nanoparticles synthesized by laser ablation. *Journal of nanoparticle research* 17, 431.
51. Flores-Castañeda, M. M., González, E. C., Ruiz-Aguilar, I., Camps, E., Cruces, M. P., Pimentel, E. & López, M. A. C. (2019) Insecticide activity of bifenthrin nanoparticles synthesized by laser ablation of solids in liquids. *Superficies y Vacío* 32, 27-30.

52. Fourier, J. B. J. (1822) *Théorie analytique de la chaleur*. University of Lausanne: F. Didot.
53. Freedman, A. N. (1953) Syphilis; its origin, evolution and therapy in former times. *McGill Med J* 22, 153-160.
54. Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y. & Chen, F. (2018) Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein & Cell* 9, 488-500.
55. Goenka, S., Balu, R. & Kumar, T. S. (2012) Effects of nanocrystalline calcium deficient hydroxyapatite incorporation in glass ionomer cements. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 7, 69-76.
56. Gordon, J., Walker, C., Hovliaras, C. & Socransky, S. (1990) Efficacy of clindamycin hydrochloride in refractory periodontitis: 24-month results. *J Periodontol* 61, 686-691.
57. Gordon, J. M. & Walker, C. B. (1993) Current Status of Systemic Antibiotic Usage in Destructive Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* 64, 760-771.
58. Gordon, J. M., Walker, C. B., Murphy, J. C., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (1981) Concentration of tetracycline in human gingival fluid after single doses. *J Clin Periodontol* 8, 117-121.
59. Guarino, A. & Bruzzese, E. (2001) Which place for bismuth subsalicylate in the treatment of enteric infections? *Acta Paediatr* 90, 601-604.
60. Guzmán, M. G., Dille, J. & Godet, S. (2009) Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Chem Biomol Eng* 2, 104-111.
61. Habashi, F. (2013) Bismuth, Physical and Chemical Properties. In: *Encyclopedia of Metalloproteins*, (eds.) R. H. Kretsinger, V. N. Uversky & E. A. Permyakov, pp. 283-284. New York, NY: Springer New York.
62. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. (1983) Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 10, 257-265.
63. Hart, M. (1981) Bragg angle measurement and mapping. *Journal of Crystal Growth* 55, 409-427.
64. He, S., Wei, Y., Fan, X., Hu, D. & Sreenivasan, P. K. (2011) A clinical study to assess the 12-hour antimicrobial effects of cetylpyridinium chloride mouthwashes on supragingival plaque bacteria. *J Clin Dent* 22, 195-199.
65. Heath, R. J., White, S. W. & Rock, C. O. (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in Lipid Research* 40, 467-497.
66. Hernandez-Delgadillo, R., Velasco-Arias, D., Diaz, D., Arevalo-Nino, K., Garza-Enriquez, M., De la Garza-Ramos, M. A. & Cabral-Romero, C. (2012) Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int J Nanomedicine* 7, 2109-2113.
67. Hernandez, L., Vazquez, B., Lopez-Bravo, A., Parra, J., Goni, I. & Gurruchaga, M. (2007) Acrylic bone cements with bismuth salicylate: Behavior in simulated physiological conditions. *J Biomed Mater Res A* 80, 321-332.
68. Hofmann-Antenbrink, M., Grainger, D. W. & Hofmann, H. (2015) Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations. *Nanomedicine* 11, 1689-1694.
69. Hopper, K. D., King, S. H., Lobell, M. E., TenHave, T. R. & Weaver, J. S. (1997) The breast: in-plane x-ray protection during diagnostic thoracic CT--shielding with bismuth radioprotective garments. *Radiology* 205, 853-858.
70. Hoseinzadeh, E., Makhdoumi, P., Taha, P., Hossini, H., Stelling, J., Amjad Kamal, M. & Md. Ashraf, G. (2017) A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. *Current Drug Metabolism* 18, 120-128.

71. Hoyos-Palacio, L. M., Castro, D. P. C., Ortiz-Trujillo, I. C., Palacio, L. E. B., Upegui, B. J. G., Mora, N. J. E. & Cornelio, J. A. C. (2019) Compounds of carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles via in-situ by chemical vapor deposition (CVD). *Journal of Materials Research and Technology* 8, 5893-5898.
72. Huang, R., Li, M. & Gregory, R. L. (2011) Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2, 435-444.
73. Ibrahimkutty, S., Wagener, P., dos Santos Rolo, T., Karpov, D., Menzel, A., Baumbach, T., Barcikowski, S. & Plech, A. (2015) A hierarchical view on material formation during pulsed-laser synthesis of nanoparticles in liquid. *Sci Rep* 5, 16313.
74. Jayaprakash, N., Vijaya, J. J., Kaviyarasu, K., Kombaiyah, K., Kennedy, L. J., Ramalingam, R. J., Munusamy, M. A. & Al-Lohedan, H. A. (2017) Green synthesis of Ag nanoparticles using Tamarind fruit extract for the antibacterial studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 169, 178-185.
75. Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P., Demirel, K., de Sanctis, M., Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N. C., Hughes, F. J., Jin, L., Kantarci, A., Lalla, E., Madianos, P. N., Matthews, D., McGuire, M. K., Mills, M. P., Preshaw, P. M., Reynolds, M. A., Sculean, A., Susin, C., West, N. X. & Yamazaki, K. (2018) Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 89 Suppl 1, S237-S248.
76. Jia, G., Zhi, A., Lai, P. F. H., Wang, G., Xia, Y., Xiong, Z., Zhang, H., Che, N. & Ai, L. (2018) The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. *British Dental Journal* 224, 447-455.
77. Juan, L., Zhimin, Z., Anchun, M., Lei, L. & Jingchao, Z. (2010) Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine* 5, 261.
78. Kafadar, I., Moustafa, F., Yalçın, K. & Kılıç, B. A. (2013) A rare adverse effect of metronidazole: nervous system symptoms. *Pediatric emergency care* 29, 751-752.
79. Kaizer, L., Ogliari, F., Collares, R. & Moraes, R. R. (2014) Investigation on the use of triphenyl bismuth as radiopacifier for (di)methacrylate dental adhesives. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 48, 80-84.
80. Kapoor, A., Malhotra, R., Grover, V. & Grover, D. (2012) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dental research journal* 9, 505-515.
81. Kappstein, I. & Engels, I. (1987) Antibacterial activity of sucralfate and bismuth subsalicylate in simulated gastric fluid. *Eur J Clin Microbiol* 6, 216-217.
82. Kasten, M. J. (1999) Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. In: *Mayo Clinic Proceedings*, pp. 825-833. Elsevier.
83. Kattan, P. (2011) Ratio of Surface Area to Volume in Nanotechnology and Nanoscience, Basic (ed.) Petra books, 63 pp. Nanomechanics Series.
84. Khan, S. T., Ahamed, M., Al-Khedhairi, A. & Musarrat, J. (2013) Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Materials Letters* 97, 67-70.
85. Kim, H. J., Bang, I. C. & Onoe, J. (2009) Characteristic stability of bare Au-water nanofluids fabricated by pulsed laser ablation in liquids. *Optics and Lasers in Engineering* 47, 532-538.
86. Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G. & Papapanou, P. N. (2017) Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers* 3, 17038.

87. Klepac-Ceraj, V., Patel, N., Song, X., Holewa, C., Patel, C., Kent, R., Amiji, M. M. & Soukos, N. S. (2011) Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers in Surgery and Medicine* 43, 600-606.
88. Knoll, M. & Ruska, E. (1932) Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik* 78, 318-339.
89. Koulinska, I., Riester, K., Chalkias, S. & Edwards, M. R. (2018) Effect of Bismuth Subsalicylate on Gastrointestinal Tolerability in Healthy Volunteers Receiving Oral Delayed-release Dimethyl Fumarate: PREVENT, a Randomized, Multicenter, Double-blind, Placebo-controlled Study. *Clin Ther* 40, 2021-2030.
90. Kraglund, F. (2014) Triclosan produces statistically significant reduction in plaque, gingivitis and caries but not clinically important benefit. *Evid Based Dent* 15, 6-7.
91. Labille, J. & Brant, J. (2010) Stability of nanoparticles in water. *Nanomedicine* 5, 985-998.
92. Lambert, J. R. & Midolo, P. (1997) The actions of bismuth in the treatment of Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1, 27-33.
93. Laue, M. (1913) Eine quantitative Prüfung der Theorie für die Interferenzerscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Annalen der Physik* 346, 989-1002.
94. Leather, J. R. (2003) Atomic weights of the elements: review 2000. *Pure Appl. Chem* 75, 683-800.
95. Lederberg J, M. A. (2001) 'Ome sweet 'omics - A genealogical treasury of words. *Scientist* 7, 8.
96. Leszczyńska, A., Buczek, P., Buczek, W. & Pietruska, M. (2011) Periodontal pharmacotherapy – an updated review. *Advances in Medical Sciences* 56, 123-131.
97. Li, H. & Sun, H. (2012) Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. *Current opinion in chemical biology* 16, 74-83.
98. Liao, J., Jia, Y., Wu, Y., Shi, K., Yang, D., Li, P. & Qian, Z. (2020) Physical-, chemical-, and biological-responsive nanomedicine for cancer therapy. *12*, 1581.
99. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H. & Chen, R. (2013) Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24, 1465-1471.
100. Mafune F, Kohno J, Takeda Y & T, K. (2000) Formation and Size Control of Silver Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* 104, 9111-9117.
101. Mafuné, F., Kohno, J.-y., Takeda, Y. & Kondow, T. (2003) Formation of Stable Platinum Nanoparticles by Laser Ablation in Water. *The Journal of Physical Chemistry B* 107, 4218-4223.
102. Mafuné, F., Kohno, J.-y., Takeda, Y., Kondow, T. & Sawabe, H. (2000) Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation. *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 8333-8337.
103. Manhart, M. D. (1990) In Vitro Antimicrobial Activity of Bismuth Subsalicylate and Other Bismuth Salts. *Reviews of Infectious Diseases* 12, S11-S15.
104. Manion, C. R. & Widder, R. M. (2017) Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy* 74, 153-162.
105. Mäntele, W. & Deniz, E. (2017) UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 173, 965-968.
106. Marsh, P. D. (2004) Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Research* 38, 204-211.
107. Marsh, P. D. (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6, S14.

108. Martín, R., Miquel, S., Langella, P. & Bermúdez-Humarán, L. G. (2014) The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *5*, 413-423.
109. Martínez-Castañón, G.-A., Nino-Martinez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. & Ruiz, F. (2008) Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of nanoparticle research* *10*, 1343-1348.
110. Michelson, A. A. (1891) Visibility of interference-fringes in the focus of a telescope. *Astron Soc Pac* *31*, 256-259.
111. Millet, Y., Jouglard, J., Steinmetz, M. D., Tognetti, P., Joanny, P. & Arditti, J. (1981) Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clin Toxicol* *18*, 1485-1498.
112. Mitra, S. B., Wu, D. & Holmes, B. N. (2003) An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc* *134*, 1382-1390.
113. Modaresi, F. (2017) The Use of Synergistically Antiplaque Nanoparticles In Treating Dental Caries. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy* *6*, 4869-4875.
114. Muller, M. (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* *93*, 165-171.
115. Nazari, P., Dowlatbadi-Bazaz, R., Mofid, M. R., Pourmand, M. R., Daryani, N. E., Faramarzi, M. A., Sepehrizadeh, Z. & Shahverdi, A. R. (2014) The Antimicrobial Effects and Metabolomic Footprinting of Carboxyl-Capped Bismuth Nanoparticles Against *Helicobacter pylori*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* *172*, 570-579.
116. Noguez, C. (2013) Física a la escala nanométrica. In: *Fronteras de la Física en el Siglo XXI*, (ed.) Coplt-arXives. 403 pp. México, D.F. UNAM.
117. Ortiz-Quiñonez, J.-L., Zumeta-Dubé, I., Díaz, D., Nava-Etzana, N., Cruz-Zaragoza, E. & Santiago-Jacinto, P. (2017) Bismuth Oxide Nanoparticles Partially Substituted with EuIII, MnIV, and SiIV: Structural, Spectroscopic, and Optical Findings. *Inorganic Chemistry* *56*, 3394-3403.
118. Owen (2000) *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna. Conceptos básicos* (ed.) Agilent Technologies. 130 pp. Alemania.
119. Ozaki, Y. (2012) Near-Infrared Spectroscopy Its Versatility in Analytical Chemistry. *Analytical Sciences* *28*, 545-563.
120. Parashar, A., Parashar, S., Zingade, A., Gupta, S. & Sanikop, S. (2015) Interspecies communication in oral biofilm: An ocean of information. *Oral Science International* *12*, 37-42.
121. Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N. & Panwar, J. (2017) Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Advanced Science, Engineering and Medicine* *9*, 527-544.
122. Parham, S., Wicaksono, D. H., Bagherbaigi, S., Lee, S. L. & Nur, H. (2016) Antimicrobial treatment of different metal oxide nanoparticles: a critical review. *Journal of the Chinese Chemical Society* *63*, 385-393.
123. Parnell, R. J. (1924) Bismuth in the Treatment of Syphilis. *Proc R Soc Med* *17*, 19-26.
124. Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. E. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology* *183*, 3770-3783.
125. Patel, A., Nakhla, G. & Zhu, J. (2005) Detachment of multi species biofilm in circulating fluidized bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* *92*, 427-437.
126. Perkins, W. D. (1986) Fourier transform-infrared spectroscopy: Part I. Instrumentation. *Journal of Chemical Education* *63*, A5.

127. Perkins, W. D. (1987) Fourier transform infrared spectroscopy. Part III. Applications. *Journal of Chemical Education* 64, A296.
128. Petersen, P. (2003) The World Oral Health Report 2003 Continuous improvement of oral health in the 21st century. *WHO Global Oral Health Programme* 31, 2-23.
129. Petersen, P. E. & Baehni, P. C. (2012) Periodontal health and global public health. *Periodontol 2000* 60, 7-14.
130. Pitz, A. M., Park, G. W., Lee, D., Boissy, Y. L. & Vinje, J. (2015) Antimicrobial activity of bismuth subsalicylate on *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* O157:H7, norovirus, and other common enteric pathogens. *Gut Microbes* 6, 93-100.
131. Poulet, P. P., Duffaut, D. & Lodter, J. P. (1999) Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 26, 261-263.
132. Purvis, J. E. (1926) CV.—The absorption spectra of various derivatives of salicylic acid. *Journal of the Chemical Society* 129, 775-778.
133. Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A. & Khmel, I. A. (2013) Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102, 300-306.
134. Rams, T. E., Degener, J. E. & van Winkelhoff, A. J. (2014) Antibiotic Resistance in Human Chronic Periodontitis Microbiota. *Journal of Periodontology* 85, 160-169.
135. Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B. & Tekade, R. K. (2019) Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In: *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, (ed.) R. K. Tekade, pp. 369-400. Academic Press.
136. Raza, M. A., Kanwal, Z., Rauf, A., Sabri, A. N., Riaz, S. & Naseem, S. (2016) Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes. *Nanomaterials (Basel)* 6, 74.
137. Reimer, L. (1989) Elements of a Transmission Electron Microscope. In: *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*, (ed.) L. Reimer, pp. 86-135. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
138. Reimer, L. & Kohl, H. (2008) *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*. Springer New York.
139. Rolla, G. & Melsen, B. (1975) On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 54 Spec No B, B57-62.
140. Salavati-Niasari, M., Behfard, Z. & Maddahfar, M. (2014) Controllable synthesis of Bi₂S₃ via a simple hydrothermal approach starting from an inorganic precursor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20, 4066-4075.
141. Saliba, E., Abbassi-Ghadi, S., Vowles, R., Camilleri, J., Hooper, S. & Camilleri, J. (2009) Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *Int Endod J* 42, 322-328.
142. Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D. & Araujo, R. (2016) Chapter Four - The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. In: *Advances in Applied Microbiology*, (eds.) S. Sariaslani & G. Michael Gadd, pp. 171-210. Academic Press.
143. Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M. L. & Souto, E. B. (2020) Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials (Basel)* 10, 292.

- 144.Sato, S., Fonseca, M. J. V., Ciampo, J. O. D., Jabor, J. R. & Pedrazzi, V. (2008) Metronidazole-containing gel for the treatment of periodontitis: an in vivo evaluation. *Brazilian Oral Research* 22, 145-150.
- 145.Schwartz E, G. B., Leitune V, Collares F, (2013) Bismuth Subcarbonate as Filler Particle for an Epoxy based Root Canal Sealer. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 23, 743-747, 2013.
- 146.Semaltianos, N. G., Hendry, E., Chang, H., Wears, M. L., Monteil, G., Assoul, M., Malkhasyan, V., Blondeau-Patissier, V., Gauthier-Manuel, B. & Moutarlier, V. (2016) ns or fs pulsed laser ablation of a bulk InSb target in liquids for nanoparticles synthesis. 469, 57-62.
- 147.Sharma, R., Bisen, D., Shukla, U. & Sharma, B. (2012) X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Research in Science and Technology* 4, 77-79.
- 148.Shinde, N., Mahajan, H., Kashid, L., Mokashi, S. & Kolhe, K. (2017) Assessment of Electro-analytical Behaviour and Method Validation of Bismuth Subsalicylate in Pharmaceutical Formulation by Differential Pulse Polarography.
- 149.Simonet, B. M. & Valcárcel, M. (2009) Monitoring nanoparticles in the environment. 393, 17-21.
- 150.Sistema Integral sobre Economía Minera (SINEM). (2018) Producción Minera de México Bismuto. (www.sgm.gob.mx/SINEMGobMx/produccion_minera.jsp)
- 151.Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales, S. (2015) Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales, SIVEPAB 2015. México. In: *México: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades*. Secretaría de Salud
- 152.Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38, 135-187.
- 153.Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144.
- 154.Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17, 788-792.
- 155.Sox, T. E. & Olson, C. A. (1989) Binding and killing of bacteria by bismuth subsalicylate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33, 2075-2082.
- 156.Stankic, S., Suman, S., Haque, F. & Vidic, J. (2016) Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of nanobiotechnology* 14, 73.
- 157.Stratton, C. W., Warner, R. R., Coudron, P. E. & Lilly, N. A. (1999) Bismuth-mediated disruption of the glycocalyx-cell wall of *Helicobacter pylori*: ultrastructural evidence for a mechanism of action for bismuth salts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43, 659-666.
- 158.Suarez, F. L., Furne, J., Stiehm, J., Garten, C. & Levitt, M. D. (2000) Site of bismuth absorption from bismuth subsalicylate: implications for treatment of colonic conditions. *Dig Dis Sci* 45, 1444-1446.
- 159.Sun, H. T., Zhou, J. J. & Qiu, J. R. (2014) Recent advances in bismuth activated photonic materials. *Progress in Materials Science* 64, 1-72.
- 160.Suzuki H, Komatsu N, Ogawa T, Murafuji, T., Ikegami T & M., Y. (2001) *Organobismuth Chemistry*, 73, 315 pp. Amsterdam. Elsevier.
- 161.Svedberg, T. & Nichols, J. B. (1923) Determination of size and distribution of size of particle by centrifugal methods. *Journal of the American Chemical Society* 45, 2910-2917.
- 162.Thosar, N., Basak, S., Bahadure, R. N. & Rajurkar, M. (2013) Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *European journal of dentistry* 7, S071-S077.

163. Tilaki, R. M., Irajizad, A. & Mahdavi, S. M. (2007) Size, composition and optical properties of copper nanoparticles prepared by laser ablation in liquids. *Applied Physics A* 88, 415-419.
164. Timakova, E. V., Udalova, T. A. & Yukhin, Y. M. (2008) Synthesis of bismuth (III) salicylates in the precipitation reactions from solutions. In: *2008 Third International Forum on Strategic Technologies*, pp. 127-130.
165. Tipper, D. J. & Strominger, J. L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54, 1133.
166. Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., Szmaja, W. & Grobelny, J. (2013) Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids. *Journal of Nanomaterials* 2013, 1-10.
167. Tripathi, K. (2013) *Essentials of medical pharmacology*. New Delhi, India JP Medical Ltd. Jaypee Brothers Medical Publishers. 975 pp. New Delhi, India.
168. Valentina, V., Maria Jose, M., Eyleen, A. & Marcelo, J. K. (2017) Metal Nanoparticles for the Treatment and Diagnosis of Neurodegenerative Brain Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 23, 1916-1926.
169. Vatandost, E., Chekin, F. & Shahidi Yasaghi, S. A. (2016) Green synthesis of silver nanoparticles by pepper extracts reduction and its electrocatalytic and antibacterial activity. *Russian Journal of Electrochemistry* 52, 960-965.
170. Vazquez-Munoz, R., Arellano-Jimenez, M. J. & Lopez-Ribot, J. (2020) Bismuth nanoparticles obtained by a facile synthesis method exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *bioRxiv*, 1-17.
171. Vega-Jiménez A, Berea-Montes E & Almaguer-Flores, A. (2012) Susceptibility of *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *S. Aureus* and *S. Epidermidis* to different bismuth compounds. *MRS Proceedings* 1487.
172. Vega-Jimenez, A. L., Almaguer-Flores, A., Flores-Castaneda, M., Camps, E., Uribe-Ramirez, M., Aztatzi-Aguilar, O. G. & De Vizcaya-Ruiz, A. (2017) Bismuth subsalicylate nanoparticles with anaerobic antibacterial activity for dental applications. *Nanotechnology* 28, 435101.
173. Vesty, A., Biswas, K., Taylor, M. W., Gear, K. & Douglas, R. G. (2017) Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities. *PLoS one* 12, e0169877-e0169877.
174. Walker, C. B., Gordon, J. M., Cornwall, H. A., Murphy, J. C. & Socransky, S. S. (1981) Gingival crevicular fluid levels of clindamycin compared with its minimal inhibitory concentrations for periodontal bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 19, 867-871.
175. Walker, C. B., Gordon, J. M. & Socransky, S. S. (1983) Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 10, 422-432.
176. Weatherly, L. M. & Gosse, J. A. (2017) Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 20, 447-469.
177. Williams, D. B. & Carter, C. B. (2009) The Transmission Electron Microscope. In: *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, (eds.) D. B. Williams & C. B. Carter, pp. 3-22. Boston, MA: Springer US.
178. Wright, T. L., Ellen, R. P., Lacroix, J.-M., Sinnadurai, S. & Mittelman, M. W. (1997) Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Periodontal Research* 32, 473-477.
179. Wu, S.-H. & Chen, D.-H. (2004) Synthesis of high-concentration Cu nanoparticles in aqueous CTAB solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 273, 165-169.

- 180.Xie, H., Cook, G. S., Costerton, J. W., Bruce, G., Rose, T. M. & Lamont, R. J. (2000) Intergeneric Communication in Dental Plaque Biofilms. *182*, 7067-7069.
- 181.Yakoob, J., Abbas, Z., Usman, M. W., Awan, S., Naz, S., Jafri, F., Hamid, S. & Jafri, W. (2014) Comparison of antimicrobial activity of zinc chloride and bismuth subsalicylate against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Microb Drug Resist* 20, 305-309.
- 182.Yang, G. (2007) Laser ablation in liquids: Applications in the synthesis of nanocrystals. *Progress in Materials Science* 52, 648-698.
- 183.Yang, G. W. (2012) *Laser Ablation in Liquids Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials*. Stanford Publishing 1192, Boston.
- 184.Yang, N. & Sun, H. (2007) Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. *Coordination Chemistry Reviews* 251, 2354-2366.
- 185.Zhang, J., Chaker, M. & Ma, D. (2017) Pulsed laser ablation based synthesis of colloidal metal nanoparticles for catalytic applications. *Journal of Colloid and Interface Science* 489, 138-149.

ANEXOS.

Anexo I.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO: “Evaluación del efecto antibacteriano de nanopartículas de subsalicilato de bismuto sintetizadas por ablación láser sobre microorganismos subgingivales de pacientes con enfermedad periodontal”.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Argelia Almaguer Flores

INVESTIGADORES ASOCIADOS: C.D. Lorena Reyes Carmona
Mtra. Ximena Vidal Gutiérrez

CLÍNICO RESPONSABLE DE TOMAR LAS MUESTRAS: C.D. Velia M. Jacobo Soto

INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO: División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología, UNAM.

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en un estudio de investigación odontológica que analiza el efecto antibacteriano de nanopartículas de subsalicilato de bismuto sobre las bacterias que habitan en su boca y que tienen potencial de causar enfermedades como gingivitis y periodontitis.

Antes de decidir sobre su participación, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto y así ayudarlo aclarando sus dudas al respecto. Una vez que haya leído esta carta de consentimiento y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: La periodontitis, es una enfermedad infecciosa que afecta a las estructuras que soportan a los dientes (hueso, encía, entre otros). En México, la enfermedad periodontal, es la segunda enfermedad más frecuente de la boca después de la caries. Actualmente, el tratamiento más efectivo es la eliminación del sarro y la remoción de la placa dentobacteriana de los dientes (materia blanca que cubre los dientes cuando no se cepillan), aunada al uso de antibióticos y antisépticos. Sin embargo, el uso constante y excesivo de estos agentes antimicrobianos ha mostrado ciertas desventajas; ya sea por los efectos secundarios que ocasionan, o por el desarrollo de resistencia bacteriana (el antibiótico que antes le hacía efecto, ahora ya no funciona), ocasionando el tratamiento se vuelva más complicado. Por ello es importante la búsqueda de diferentes alternativas para el tratamiento de las enfermedades periodontales, las cuales sean efectivas y presenten pocos o nulos efectos secundarios.

En este proyecto utilizaremos dos muestras de placa dentobacteriana subgingival (bacterias que están debajo de la encía), de dos de sus molares, y evaluaremos el efecto antibacteriano de las nanopartículas de subsalicilato de bismuto. Los resultados de este proyecto de investigación podrían ofrecer una posible alternativa a los tratamientos convencionales de antibióticos y antisépticos, disminuyendo los efectos secundarios de éstos.

OBJETIVO DEL ESTUDIO: El objetivo principal del estudio es determinar el efecto de las nanopartículas de subsalicilato de bismuto en el crecimiento de bacterias provenientes de placa dentobacteriana subgingival en pacientes con Periodontitis. Estos datos proveerán información importante para el diseño de nuevas estrategias de tratamiento en pacientes que padecen enfermedades como la gingivitis y la periodontitis.

PROCEDIMIENTOS: En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará una evaluación clínica y periodontal para asegurarnos de que cuenta con los criterios de inclusión establecidos para participar en el estudio. Su participación en el estudio no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

Su participación en este estudio de investigación requiere uno o más de los siguientes procedimientos:

- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico responsable o alguno de los investigadores asociados.
- **La realización de una evaluación periodontal completa**, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas “bolsas” que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas “bolsas” en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas o si están enrojecidas. Este procedimiento lo llevará a cabo el clínico responsable.
- **La toma de al menos dos muestras de placa dentobacteriana**, lo cual se realizará con un instrumento dental llamado cureta. La muestra que se tomará es la película blanquecina que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana). Este procedimiento no es doloroso, aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo que será analizado posteriormente en el laboratorio.

Todos los procedimientos serán realizados en una sola visita que tendrá una duración máxima de 2 horas.

RIESGOS: De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en el Título Segundo (De los aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos) artículo 17, esta investigación se clasifica entre las Investigaciones con Riesgo Mínimo, ya que no se han reportado efectos adversos por realizar la toma de muestras de la placa dentobacteriana, es decir, no existe riesgo de infecciones, ya que todo el instrumental empleado estará totalmente estéril. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental.

Todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

BENEFICIOS: Su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información importante acerca de la susceptibilidad de los microorganismos que habitan en su boca y que le están causando periodontitis, lo cual podría ayudar en un futuro al mejor entendimiento de la enfermedad periodontal y a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para esta enfermedad.

COMPENSACIONES: No existe ninguna compensación monetaria por su participación pero tampoco incurrirá en ningún gasto adicional a su tratamiento en la clínica.

CONFIDENCIALIDAD: Toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

RENUNCIA/RETIRO: Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio

para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de este estudio decidieran no incluirle en la investigación, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

ACLARACIONES: La decisión de su partición en el estudio es completamente voluntaria.

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que hacer gasto alguno para participar en el estudio.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador principal.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores, por lo cual su nombre será reemplazado por un código alfanumérico
- Usted no desarrollará ningún efecto adverso secundario debido a la participación en este estudio.
- La participación en este proyecto no implica que se le otorgue servicio dental gratuito o ningún tipo de apoyo gratuito para el tratamiento dental.

*Tome en cuenta que la muestra que nos proporcione puede ser utilizada para otros estudios realizados por el grupo de investigación a cargo.

- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la **Carta de Consentimiento Informado** anexa a este documento.

En caso de tener cualquier duda relacionada con el procedimiento de este estudio, usted puede comunicarse con las investigadoras responsables del estudio.

POR FAVOR CONSERVE ESTA HOJA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibí una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y Firma del paciente participante **Fecha**

Domicilio: _____
Teléfono: _____

Nombre y Firma del Testigo 1 **Fecha**

Relación con el participante: _____ Teléfono _____
Domicilio: _____

Nombre y Firma del Testigo 2 **Fecha**

Relación con el participante: _____ Teléfono _____
Domicilio: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador:

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador **Fecha**

Hoja para el Investigador

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibí una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y Firma del paciente participante **Fecha**

Domicilio: _____
Teléfono: _____

Nombre y Firma del Testigo 1 **Fecha**

Relación con el participante: _____ Teléfono _____
Domicilio: _____

Nombre y Firma del Testigo 2 **Fecha**

Relación con el participante: _____ Teléfono _____
Domicilio: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador:

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador **Fecha**

Hoja para el paciente

Anexo II.

FICHA CLÍNICA PERIODONTAL

Fecha: _____
Nombre del clínico: _____
Nombre del apuntador: _____

DATOS DEL PACIENTE

Nombre del paciente: _____ No. Expediente: _____

Apellido Paterno _____ Apellido Materno _____ Nombre(s) _____
Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____ día/mes/año Sexo: ¹Masculino ²Femenino

Dirección: _____
Calle No. Exterior No. Interior Colonia

Delegación/Municipio Estado C.P.

Teléfonos: Casa: _____ Trabajo: _____ Celular: _____
Correo electrónico: _____

DATOS MÉDICOS

Padecimiento actual: _____

Medicamentos utilizados en los últimos 2 meses:

Nombre	Dosis	Frecuencia	Última toma

Intervenciones quirúrgicas: ¹Sí ²No

Cuales: _____

Alergias: ¹Sí ²No

Cuales: _____

Embarazo o lactancia: ¹Sí ²No

²No

Tabaquismo: ¹Sí ²No

²No

No. de cigarras al día: _____

día: _____

Si fue fumador ¿hace cuánto dejó de fumar?: _____

DATOS ODONTOLÓGICOS

Profilaxis: Sí No Fecha: _____

Tratamiento periodontal: Sí No Tipo de Tx: _____ Fecha: _____

Otro tipo de tratamiento: Sí No Tipo de Tx: _____ Fecha: _____

Tachar los dientes faltantes	Cuadrante derecho							Cuadrante izquierdo						
Superior	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
Inferior	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37

