



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología, DEPeI
Laboratorio de Genética Molecular

**Efecto antimicrobiano de nanopartículas de Bismuto
sobre especies bacterianas de la cavidad oral**

TESIS
Que para obtener el grado en

Maestría en Ciencias

PRESENTA

M. E. Verónica Campos Ibarra

Tutoras: Dra. Argelia Almaguer Flores y Dra. Sandra E. Rodil Posada
Asesor: Dr. David Díaz

México D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Revisores:

Dr. Federico H. Barceló Santana

Dra. Ana María Fernández Presas

Dra. Sandra E. Rodil Posada

Dr. Ricardo Jasso Chávez

Dr. Stephen Muhl Saunders

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México
por la valiosa oportunidad de crecimiento profesional y personal.

Agradezco a Sandra Rodil
por su entrega y gran compromiso
con sus alumnos y el conocimiento científico.

Agradezco a David Díaz y Donaji V. Arias
por su disposición y orientación metódica y personal
durante la maestría.

Y especialmente, agradezco a Argelia Almaguer
por su paciencia, dedicación y calidad
con que me instruyó.

Dedico el fruto de este trabajo a mi amada familia

Mis Padres: José y Patricia

Mis Hermanos: David y Deniss

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1	Antecedentes.....	10
	Materiales con propiedades antimicrobianas.....	10
	Bismuto.....	11
	Características generales.....	11
	Usos terapéuticos.....	15
	Plata.....	17
	Características generales.....	17
	Usos terapéuticos.....	19
	Nanomateriales.....	21
	Clasificación de nanopartículas.....	25
	Nanopartículas de Bismuto.....	27
	Nanopartículas de Plata.....	28
	Ecología microbiana.....	22
	Placa dentobacteriana (formación y composición).....	29
	Especies bacterianas de la placa dental subgingival.....	34
	Especies bacterianas de importancia médica.....	39
1.2	Planteamiento del Problema.....	42
	Pregunta de Investigación.....	43
1.3	Objetivo.....	43

CAPITULO 2. EXPERIMENTACIÓN

2.1	Diseño experimental.....	44
2.2	Materiales y Métodos.....	47
	Síntesis de Nanopartículas.....	47
	Evaluaciones Microbiológicas.....	48
	Determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (A).....	48
	Ensayo microbiológico por dispersión en agar (B).....	54
	Ensayo microbiológico por difusión en agar (C).....	56

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1	Resultados.....	57
3.2	Discusión.....	72

3.3	Conclusiones.....	78
3.4	Perspectiva.....	79
3.5	Referencias Bibliográficas y de sitios Web.....	81
3.6	Anexos.....	95

Resumen

Introducción: Desde la antigüedad, diversos compuestos de Bismuto (Bi) se han utilizado en materiales antisépticos y cosméticos. También se han empleado para el tratamiento de infecciones gastrointestinales debido a su capacidad bactericida contra *Helicobacter pylori* y especies de *Pseudomonas*. Por otra parte, el desarrollo de materiales nanométricos se basa en los cambios radicales de las propiedades físicas y químicas de un material en bulto cuando es utilizado en dimensiones nanométricas.

Objetivo: Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de dispersiones coloidales de nanopartículas (NPs) de Bi metálico, óxido de Bi, sulfuro de Bi, comparándolas con NPs de Plata (Ag), sobre bacterias orales y en patógenos implicados en infecciones nosocomiales.

Metodología: Las NPs fueron sintetizadas por reducción química y fueron dispersadas en Dimetil sulfóxido (DMSO). Se utilizaron las especies orales: *Actinomyces israelii*, *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Streptococcus sanguinis*, así como en tres especies de importancia médica: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* para determinar las CMI de las dispersiones coloidales de Bi y Ag.

Resultados: Los compuestos de Bi que fueron sintetizados tuvieron un tamaño promedio de 3 a 10 nm. Estos compuestos mostraron un efecto antimicrobiano sobre las especies bacterianas que fueron analizadas. Las CMI obtenidas de los diferentes coloides de NPs de Bi estuvieron en intervalos de 1.02×10^{-4} a 1.28×10^{-3} M. Sin embargo, las NPs de Ag (4 nm) mostraron mayor efecto antimicrobiano, ya que las CMI obtenidas fueron de 1.25×10^{-6} a 6.40×10^{-4} M.

Conclusiones: Los diferen-

tes nanocompuestos de Bi mostraron un efecto antimicrobiano en todas las especies que fueron probadas en este estudio, aunque con una potencia más baja que las NPs de Ag.

Abstract

Introduction: Bismuth (Bi) has been used as an antimicrobial agent, for treating gastrointestinal disorders, especially in the eradication of *Helicobacter pylori* and *Pseudomonas* sp. On the other hand, the development of nanometric materials is based on the change in the physical and chemical properties of the bulk material when in used in a nanometric scale. **Objective:** The aim of the present study was to evaluate the minimum inhibitory concentrations (MICs) of different Bi nanoparticles (NPs) compounds (Bismuth oxide, Bismuth sulfide and Zero-valent bismuth) in comparison with colloidal silver (Ag) NPs, on bacterial species belonging to the normal flora of the oral cavity and nosocomial pathogens. **Methods:** Nanoparticles were synthesized by chemical reduction and dissolved on dimetil sulfoxide (DMSO). The following oral bacterial strains: *Actinomyces israelii*, *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Streptococcus sanguinis*, as well as three species of medical importance: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were used to determined the MICs of the Bi and Ag NPs. **Results:** The mean average size of the Bi NPs were 3 to 10 nm. These compounds were able to inhibit bacterial growth at 1.02×10^{-4} to 1.28×10^{-3} M. However, Ag NPs (average size 4 nm) were effective at 1.25×10^{-6} to 6.40×10^{-4} M, showing a higher

bactericidal effect. **Conclusions:** The Bi nano-compounds were effective in the inhibition of bacterial growth on all the species tested. Nevertheless, Ag NPs were more effective at lower concentrations.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Materiales de uso odontológico con propiedades antimicrobianas

En el área odontológica se utilizan una gran variedad de biomateriales que, al entrar en contacto con las aproximadamente 700 especies bacterianas presentes en la cavidad oral (Paster et al., 2001), proporcionan un sustrato adecuado para formar estructuras complejas llamadas biopelículas. Una biopelícula puede ser descrita como un agregado de microorganismos en el que las células se adhieren entre sí a una superficie ya sea natural o artificial (Marsh & Bradshaw, 1995; Costerton et al., 1999). La formación de biopelículas es una forma de crecimiento natural para muchas especies bacterianas, la cual tiene como principal ventaja la protección contra el ambiente y de otros microorganismos, debido a que las microcolonias están organizadas dentro de una matriz de exopolisacáridos compuesta por secreciones bacterianas que incluyen las sustancias poliméricas extracelulares (proteínas, poca cantidad de ácidos nucleicos y fosfolípidos) y productos de la lisis bacteriana. Ésta matriz, actúa como mecanismo de defensa, y facilita la transformación y absorción de nutrientes, así como la eliminación de productos metabólicos potencialmente perjudiciales, proporcionándoles un entorno físico adecuado (Socransky & Haffajee, 2002).

En la actualidad, existen materiales dentales con propiedades antimicrobianas, como son los cementos a base de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) (Mohammadi & Abbott, 2009; Delgado et al., 2010), de óxido de zinc y eugenol y el ionómero de vidrio (Boeckh et al., 2002) y materiales que reducen la formación de placa dentobacteriana;

por ejemplo, resinas con liberación de fluoruros (Saku et al., 2010). A su vez, algunos estudios han integrado nuevas tecnologías para la modificación de superficies, utilizando las propiedades biocidas de la plata (Ag) a escala nanométrica, obteniendo buena resistencia a la colonización sobre aleaciones de Titanio (Ti) (Flores et al., 2010), el cual es un metal ampliamente utilizado en implantes médicos y dentales.

Bismuto

Características Generales

El Bismuto fue descrito en 1753 como elemento químico por el científico francés Claude Geoffroy. El nombre del elemento es mencionado alrededor del año 1400 como “Bismutum”, proveniente de la palabra alemana “Weissmuth” que significa material blanco (Hampel, 1973)(<http://www.mindat.org>).

Es un metal blancuzco, frágil con un ligero tinte rosa debido al óxido de la superficie. Su número atómico es el 83 y es miembro del grupo del arsénico: V-A de la tabla periódica. Al igual que el agua, se expande cuando se enfría por su estructura ordenada de cristales romboédricos (Lewis, 2007) (**Figura 1**). Este elemento produce vapores verdosos y es poco conductor del calor y la electricidad, aunque el compuesto trióxido de bismuto (Bi_2O_3) ha sido reportado con alta conductividad (Harwig & Gerards, 1978). El bismuto metálico (Bi^0) es el material más diamagnético que existe (difícil de magnetizar) (Taylor, 1950), ya que cambia su configuración electrónica, desviando en ángulo recto los campos magnéticos cuando se acerca a un imán.



Figura 1. Bismuto, Mina Silverfields (Alexandra Shaft), municipio Coleman, región Cobalt-Gowganda, Distrito Timiskaming, Ontario, Canadá

© 2002 John H. Betts.

En su estado natural representa aproximadamente el 2×10^{-5} % de la corteza terrestre, siendo el elemento número 69 en orden de abundancia. Se encuentra en forma de óxidos y sulfuros y se obtiene como subproducto de la refinación del oro (Au), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), tungsteno (W) y otros minerales metálicos.

En el 2010, la producción mineral y reservas de Bi se encontraron distribuidas principalmente en México, Bolivia, Canadá, China, Kazakhstán y Perú. En México, se obtienen anualmente 1,054 toneladas en promedio (2004-2009 INEGI), ocupando el segundo lugar en producción mundial. Sin embargo, sus aplicaciones son reducidas a nivel nacional y solo se le da cierto valor comercial por medio de su exportación. En Estados Unidos, alrededor del 60% del Bi disponible se utiliza en productos farmacéuticos y químicos, el 36% en aditivos metalúrgicos y el 4% en metales para soldadura y

cartuchos de munición. También se ha utilizado en la fabricación de esmaltes cerámicos, artículos de cristal, pigmentos y como reemplazo no tóxico para el plomo (<http://minerals.usgs.gov>).

Los elementos del grupo V de la tabla periódica son compuestos semiconductores, por lo que Bi es un material técnicamente importante por su fotosensibilidad, fotoconductividad y poder termoeléctrico (Killedar et al., 1996). Debido a estas características, algunos compuestos como el Sulfuro de bismuto (Bi_2S_3), que se encuentra en la naturaleza en su fase cristalina ortorrómbica conocida como Bismutinita (Hofmann, 1935, Vega-Gonzalez & Bokhimi, 2007), se ha utilizado para el desarrollo de dispositivos para la conversión de la energía solar, así como fotocatalizador (Case, 1917). El Bi_2S_3 se encuentra de forma natural como metal color gris plomo a blanco estaño; es frágil, opaco y de forma prismática (**Figura 2**) (<http://www.mindat.org>).



Figura 2. Bismutinita. Cerro Tazna, Distrito Atocha-Quechisla, Provincia Nor Chichas, Potosí Bolivia © Saul Krotki 2003.

Por otra parte, el Bi_2O_3 es un compuesto importante en la industria del Bismuto (Rohr, 2002). Se encuentra en la naturaleza en forma cristalina como Bismite, de color amarillo verdoso (Sharpe & Williams, 2004) (**Figura 3**). Se emplea en la construcción

de condensadores, catéteres, materiales cerámicos, vidrios especiales, materiales superconductores, desinfectantes, fabricación de imanes, vulcanizado de caucho, anti-llamas y antihumo de polímeros y aplicaciones en ingeniería nuclear, entre otros (Lewis, 2007). Se conocen dos variables cristalinas de Bi_2O_3 que son estables: la α -monoclínica (semiconductor), que se encuentra a temperatura ambiente y la δ -cúbica (conductor) (Boivin & Mairesse, 1998) estructura que se obtiene cuando se calienta por encima de 727°C .



Figura 3. Bismite. Valle Cobre Mesopotamia, Khorixas, Distrito Damaraland, Kunene, Namibia

© Brent Thorne.

Otros compuestos como Subcarbonato de bismuto ($(\text{BiO})_2\text{CO}_3$) y Subnitrito de bismuto ($\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$) son usados con propósitos médicos. El Oxiclورو de bismuto (BiOCl) es usado como un ingrediente nacarado en cosméticos. El Fosfomolibdato de bismuto ($\text{BiPMo}_{12}\text{O}_{40}$) se utiliza como catalizador en la producción de fibras de acrilonitrilo (Hampel, 1973), que se emplea en la fabricación de fibras acrílicas, plásticos y pinturas.

Usos Terapéuticos

Las aplicaciones cosméticas y farmacéuticas de compuestos de Bi tienen unos 250 años en uso, las cuales han sido discutidas en varios artículos de revisión (Wagstaff et al., 1988; Rokkas & Sladen, 1988; Lambert, 1991; Briand & Burford, 1999; Sadler et al., 1999).

Exceptuando el Bismutato de sodio (NaBiO_3) en el que el Bi actúa como anión con estado de oxidación +5, los compuestos de Bi de importancia comercial corresponden a la variedad Bi^{+3} (Briand & Burford, 1999).

El Bi se ha utilizado como agente antimicrobiano, por su alta efectividad y baja toxicidad en tratamientos para infecciones microbianas, que incluyen diarrea, gastritis y colitis. En el tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por *Helicobacter pylori*, se usan compuestos como el Subsalicilato de bismuto ($\text{C}_7\text{H}_5\text{BiO}_4$) (Pepto-Bismol®), Subcitrato de bismuto coloidal ($\text{BiC}_{12}\text{H}_{14}\text{K}_5\text{O}_{17}$) (CBS, De-Nol®) y Citrato de bismuto ranitidina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{BiO}_7$) (RBC, Tritec® y Pylorid®, GSK) con buenos resultados (Yang & Sun, 2007).

Más aún, se ha señalado su efectividad inhibitoria tanto en biopelículas de especies de *Staphylococcus* y en *Pseudomonas aeruginosa* (Huang & Stewart, 1999; Domenico et al., 2001), como en bacterias individuales, principalmente contra *H. pylori* (Nakao et al., 1995; Cheng & Hu, 2009; Severi et al., 2009). Demostrando su efecto antimicrobiano en dispersiones coloidales e incluso proveyendo de protección antimicrobiana en la superficie de dispositivos biomédicos (Schindler et al., 2010).

Las sales básicas de Bi, como el $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$, Subgalato de bismuto ($\text{C}_7\text{H}_5\text{BiO}_6$) y Subnitrato de bismuto ($\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$), se emplean por sus propiedades astrin-

gentes, germicidas y antiácidas. El $\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$, $\text{C}_7\text{H}_5\text{BiO}_6$ y la leche de Bi se encuentran incluidos oficialmente en la USP (United States Pharmacopoeia). La leche de Bi posee propiedades antiácidas en presencia de iones oxhidrilo (OH^-) y carbonato (CO_3), y proporciona acción protectora por sus propiedades adherentes. También se ha descrito que una pequeña cantidad de ión bismutilo (BiO^+) disuelto ejerce un suave efecto antiséptico (Genaro, 1998).

Por ser un elemento metálico de baja solubilidad y buena biocompatibilidad (Kricheldorf, 2009), se han incorporado compuestos de Bi en materiales odontológicos y médicos; por ejemplo Bi_2O_3 en cementos endodónticos (Seven et al., 1989; Camilleri, 2008; Coutinho-Filho et al., 2008; Bueno et al., 2009) y Trifenil-bismuto ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Bi}$) en resinas dentales (Rawls et al., 1992; Lang et al., 2000) y cementos óseos (Deb et al., 2002); exponiendo su actividad antimicrobiana, propiedades radiopacas y efectos hemostáticos (Puia et al., 2003).

En el organismo, el BiO^+ reacciona con el Sulfuro de hidrógeno (H_2S), que se forma por la degradación de las proteínas en el intestino, y produce Bi_2S_3 , insoluble y de color pardo oscuro (Genaro, 1998). En consecuencia, las heces aparecen negras siendo su principal vía de excreción. Otros efectos de su consumo y metabolismo incluyen pigmentación por Bi en el colon, vagina y piel (Friberg, 1986).

Los reportes de captación de Bi en varios tipos celulares incluyen células renales (Stoltenberg & Danscher, 2000), neuronas motoras (Pamphlett et al., 2000a, Pamphlett et al., 2000b), células ganglionares (Stoltenberg et al., 2001) y células Leyding (células productoras de testosterona) (Stoltenberg et al., 2000). En estos casos el Bismuto fue localizado en los lisosomas, donde induce la ruptura del lisosoma. Estos

organélos realizan un papel vital en el metabolismo de metales pesados (Stoltenberg et al., 2002).

Por otra parte, los efectos adversos son evidentes en los compuestos solubles de Bi (Genaro, 1998). Se ha reportado que la administración de Bi cuando existe gingivitis puede evolucionar a estomatitis ulcerosa (Robert, 1950). Por lo que se considera que los niveles sanguíneos de 100 µg/L de Bi inorgánico pueden mostrar efectos de sobredosis (Phillips et al., 2001; Islek et al., 2001), y mayores dosis a éstas pueden ser mortales. Como lo definió el científico suizo Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541) mejor conocido como Paracelso: “Dosis sola facit venemem” que puede traducirse como “la dosis por si sola hace el veneno”. La cantidad y concentración consumida y captada de este elemento, es decisiva para una adecuada comprensión del riesgo a la salud que pueda ocasionar (Briand & Burford, 1999).

Plata

Características Generales

La Plata (Ag, procedente del latín: *Argentum*) es un metal blanco, brillante, blando, dúctil, maleable, de número atómico 47, situado en el grupo I-B de la tabla periódica de los elementos (**Figura 4**). Posee alta conductividad térmica y eléctrica y gran índice de reflexión; resiste la oxidación, sin embargo se empaña al reaccionar con los componentes de sulfuro atmosférico (Lewis, 2007). Ag se conoce y se valora desde la antigüedad, como metal ornamental y de acuñación. Es considerado un metal noble, entre los que también encontramos al oro (Au) y los seis metales del grupo del platino (Pt) y que en conjunto forman el grupo de los metales preciosos (Hampel, 1973) (<http://www.mindat.org>).

La Plata ocupa el lugar 66 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. Los sedimentos más notables de Ag pura están en México siendo el mayor productor (2,491,487 toneladas de producción, 2004-2009, INEGI) seguido por Perú, Australia y los Estados Unidos. Alrededor del 25% de Ag extraída procede de minerales de Ag, 15% a partir de minerales de Au y el 60%, a partir de Cu, Pb y minerales de Zn (<http://minerals.usgs.gov>). Ocasionalmente se ha detectado su presencia en aguas subterráneas y superficiales, por lo que las concentraciones de consumo en agua, se estiman mayores a 5µg/L (OMS).

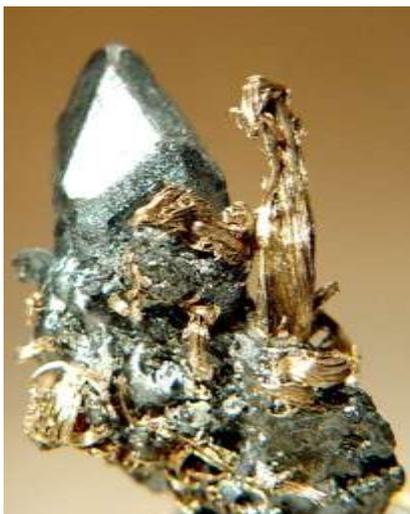


Figura 4. Plata y oro. Minas de Uchucchacua, provincia de Oyón, Lima, Perú

© Rob Lavinsky.

Este mineral se encuentra formando principalmente óxidos muy solubles o sulfuros conocidos como Argentita (Ag_2S) o cloruros conocidos como Kerargita (AgCl) (<http://minerals.usgs.gov>). El Nitrato de plata (AgNO_3) y el Bromuro de Plata (AgBr) son compuestos usados en la fabricación de productos químicos fotográficos, tanques y otros equipos con revestimiento para reacción química, destilación de agua, etc. Tam-

bién se utiliza en espejos, conductores eléctricos, purificación de agua, cementos quirúrgicos, baterías especiales, celdas solares, reflectores; en aleaciones para soldadura de baja temperatura, cubiertos de mesa, equipos odontológicos, médicos y científicos, así como agente antimicrobiano para reducir la propagación de bacterias en diferentes sustratos (Lewis, 2007). En general, es uno de los minerales de mayor importancia en la actualidad, debido a sus múltiples aplicaciones en la industria química, metalúrgica, farmacéutica, etc. (<http://minerals.usgs.gov>).

Usos Terapéuticos

La Plata es un conocido agente antimicrobiano que data de por lo menos 2000 años, desde la antigua Grecia y Roma (Klasen, 2000). Sus usos comunes incluían la desinfección del agua y limpieza de heridas. Diferentes estudios han reportado los efectos antimicrobianos de la Plata metálica (Ag^0) y sus compuestos, que incluyen esterilidad del agua destilada durante períodos prolongados (Vonberg et al., 2008, Silvestry-Rodriguez et al., 2007), y su acción como agente antimicrobiano de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con menos posibilidades de desarrollar resistencia bacteriana (Percival et al., 2005; Landsdown & Williams, 2007). Debido a la capacidad del ión plata (Ag^+) para precipitar proteínas y cloruros en los tejidos afectados, algunos compuestos, por ejemplo AgNO_3 , se emplea como desinfectante local para bacterias no esporuladas y virus (Genaro, 1998, Thurman & Gerba, 1988). Por lo que en áreas médicas y de la salud se exploran mayores usos considerando estas propiedades, aunado a su baja toxicidad (Hetrick & Schoenfisch, 2006).

Las sales comunes de Ag en estado de oxidación +1 son insolubles o muy poco solubles en agua, exceptuando el AgNO_3 y el Fluoruro de plata (AgF) (Genaro, 1998). El AgNO_3 y la Sulfadiazina de plata (SSD), que contiene AgNO_3 y un antibiótico de sulfonamida, se utilizan en el tratamiento y profilaxis de infecciones de úlceras de decúbito, varicosas, úlceras del diabético, heridas quirúrgicas, quemaduras y como coadyuvante en la cicatrización (Klasen, 2000, Spann et al., 2003), así como en el recubrimiento de catéteres principalmente para prevenir infecciones en el tracto urinario (Darouiche, 1999), y en vendajes para heridas y suturas (Genaro, 1998). En odontología, se utiliza Ag como componente de la amalgama dental y algunos estudios le atribuyen propiedades inhibitorias de caries recurrente en esta aleación (Morrier et al., 1998; Beyth et al., 2007).

En cuanto a su interacción con los organismos, se reconoce a Ag como un metal oligodinámico (capacidad de los metales pesados para inactivar las enzimas) (Collart et al., 2006). Por lo que sus iones se unen en sitios específicos del ADN, ARN, enzimas respiratorias, proteínas celulares y cloruros causando daño y muerte celular (Hambidge, 2001). También se ha reportado que Ag puede causar la inactivación bacteriana uniéndose tanto al ADN y evitando su replicación, así como a los grupos sulfhidrilo (-SH) de las enzimas metabólicas, en la cadena de transporte de electrones bacteriana (Darouiche, 1999).

Aunque la absorción de Ag es baja y las tasas de retención en personas y en animales de laboratorio se encuentran entre 0% y el 10%, sus efectos tóxicos conocidos incluyen problemas estéticos por coloración anómala debido a la fotosensibilidad del Ag^+ (Genaro, 1998), siendo su principal manifestación la Argiria y la Argiriosis,

enfermedades asociadas con el depósito de precipitados de Ag insoluble en la piel y córnea/conjuntiva, donde se ha estimado de 90 a 100g del elemento en el cuerpo de los pacientes que la manifiestan (Lansdown, 2010).

Nanomateriales

Los nanomateriales han sido utilizados durante siglos por culturas antiguas como la Maya, Egipcia y China; principalmente en la decoración de cerámicas, muros y textiles, demostrado gran estabilidad durante el tiempo (Del Rio et al., 2006, Berke, 2007, Adlakha-Hutcheon et al., 2009). Por ejemplo usaban estructuras de aluminosilicato con sulfuros y partículas nanométricas de Au y Cu para obtener los pigmentos azul, índigo y ultramarino, entre otros (**Figura 5 y 6**).



Figura 5. Mural maya de Bonampak (790 d. C.). Ciudad arqueológica, Chiapas, México © Arturo Andrade.



Figura 6. Busto de Nefertiti (1330 a. C.). Museo Egyptian and Papyrus Collection Berlin.

En la actualidad, encontramos nanopartículas (NPs) de forma incidental en el medio ambiente, con las que estamos en contacto continuo, por ejemplo los coloides del suelo, nanocristales de sales marinas transportadas en el aire, fullerenos, nanotubos de carbono y magnetita biogénica (Fe_3O_4) (Nowack & Bucheli, 2007).

Los avances obtenidos en las técnicas de medición, diseño y desarrollo de nuevos materiales, en el campo de los materiales nanométricos, tiene desde hace décadas la atención, imaginación y estrecho escrutinio de científicos e ingenieros, por la prometedora obtención de nanocompuestos multifuncionales. Ya que usando bloques de materiales a escala nanométrica, se han descrito cambios radicales en sus propiedades físicas ópticas, químicas y bioquímicas dependientes de su dimensionalidad y forma (Bonnemann & Richards, 2001, Lu & Lieber, 2007, Fang et al., 2009) (Williams & Adams, 2007); lo que posibilita realizar combinaciones con las propiedades

únicas de estos materiales, que resultan inalcanzables por los materiales tradicionales (Murphy, 2002).

La Nanotecnología considera la investigación y desarrollo tecnológico en un intervalo entre 1 y 100 nm, que incluye la creación y uso de estructuras con nobles propiedades debido a su pequeño tamaño. En marzo de 2011, el inventario de productos consumibles en el mercado mundial, reporto 1,317 productos o líneas de producción que utilizan nanotecnología (<http://www.nanotechproject.org/>). Los productos de mayor relevancia se agrupan en múltiples categorías como: salud y deportes, casa y jardín, automotriz, así como electrónica y computación, entre otros. El elemento más utilizado en las descripciones de estos productos es Ag (313 productos) seguido de los fullerenos, (91 productos), Ti (59 productos, incluido el dióxido de titanio), Sílice (SiO₂) (43 productos), Zn (31 productos, incluyendo el óxido de zinc), y Au (28 productos) (**Figura 7**).

Algunas investigaciones han estimado en 15.7 mil millones de dólares la producción en la industria de nanotecnología en 2010, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR por sus siglas en inglés) del 11.1% (www.bccresearch.com). México es uno de los diez principales países con patentes de aplicación en nanotecnología, con 471 patentes de entre 1991 a 2008, de una lista que encabeza Estados Unidos y la República Popular China (Dang et al., 2010).

En cuanto a los propósitos médicos, la nanotecnología se está desarrollando de manera importante en áreas de diagnóstico y estrategias de tratamiento, como medicamentos con efecto antibacterial (Koper et al., 2002), drogas de liberación controlada (Cal et al., 2008), detección patógena (Edelstein et al., 2000), detección de tumores

(Jin et al., 2008), y como auxiliares en el diagnóstico de cardiopatías coronarias (Pan et al., 2010), etc.

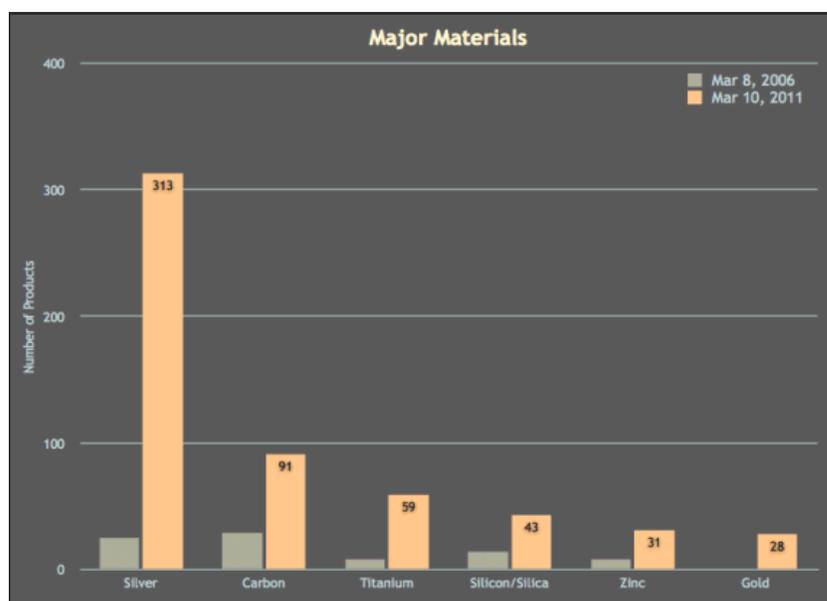


Figura 7. Número de productos asociados con materiales específicos.
(http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/).

La actividad biológica de las nanopartículas depende de muchos factores, entre los que se han incluido el tamaño, la forma y sus propiedades superficiales (Oberdorster et al., 2005). Las dimensiones nanométricas facilitan su captación celular y su alta proporción volumen-superficie permite la asociación con otras moléculas que se pueden transportar a las células, por lo tanto, el incremento del área superficial junto con el aumento de grupos reactivos sobre la superficie de las partículas han sido consideradas como factores importantes para aumentar su toxicidad y a la vez, sus propiedades antimicrobianas (Klein, 2007).

En odontología, se encuentran disponibles en el mercado productos con nanorellenos (SiO_2 , aleaciones metálicas o porcelana vítrea) para obtener adhesivos refor-

zados (Primer&Bond NT, Dentsply) y composites con menor desgaste y mayor fluidez (Filtek Supreme, 3M-ESPE, USA) (GrandiO, Voco, Germany) (Kim et al., 2007a). También, se utilizan en cementos de ionómero de vidrio para reducir la porosidad y aumentar las propiedades físicas del material (Ketac TM Nano 3M-ESPE, USA) (Nomoto et al., 2004). Por otro lado, se ha reportado la aplicación de nanofibras de hidroxapatita sintética y NPs de carbonato de hidroxapatita, que semejan en tamaño y composición química a los cristales del esmalte dentario natural, para reparar defectos micrométricos sobre la superficie dentaria (Roveri et al., 2009), las cuales se han incorporado a pastas dentales y enjuagues bucales (biopreparación de Laboratorios Coswell Italia y Dr. Wolff, Alemania) (Lv et al., 2007). Otra propuesta es el uso de NPs de materiales bioactivos o nanoporos, en la superficie de implantes dentales para mejorar su osteointegración (Tomsia et al., 2011).

Clasificación de nanopartículas

Las Nanopartículas pueden ser clasificadas en naturales o incidentales y antropogénicas o ingenieriles como son los quantum dots y dendrímeros, que son partículas diseñadas para explotar sus propiedades inherentes relacionadas al tamaño, por ejemplo: conductividad, propiedades espectrales y biodistribución (**Figura 8**). Por otro lado, las nanopartículas incidentales, se pueden encontrar libres en la atmósfera y son producidas en la combustión como son las emisiones de partículas del diesel o en incendios forestales. Mientras que otras partículas como los fullerenos y nanotubos de carbono son tanto materiales ingenieriles como componentes incidentales de la contaminación ambiental (Nowack & Bucheli, 2007; Stern & McNeil, 2008).

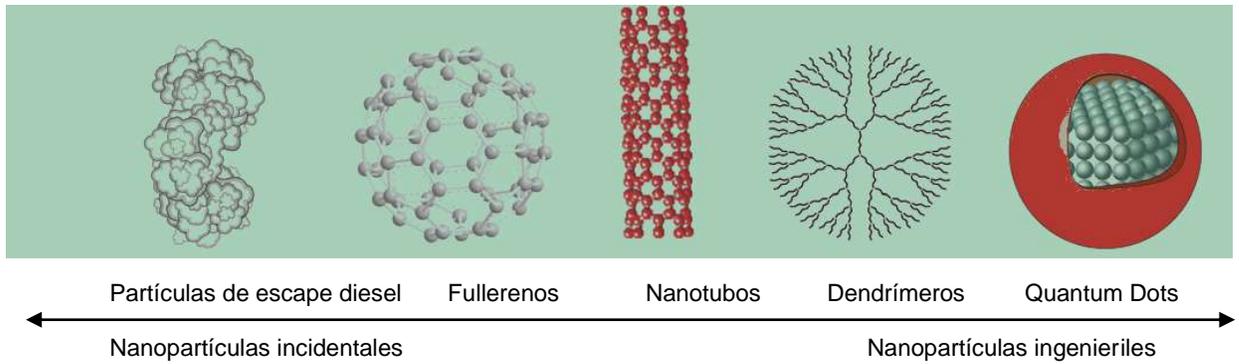


Figura 8. Clasificación de nanopartículas en incidentales e ingenieriles. (Stern & McNeil, 2008).

Un material a nanoescala, es definido por la agencia de protección ambiental (EPA, por sus siglas en ingles) como “un ingrediente que contiene partículas intencionalmente producidas, con por lo menos una dimensión que mide entre aproximadamente 1 a 100 nm” (**Figura 9**) (<http://www.nanotechproject.org/>)

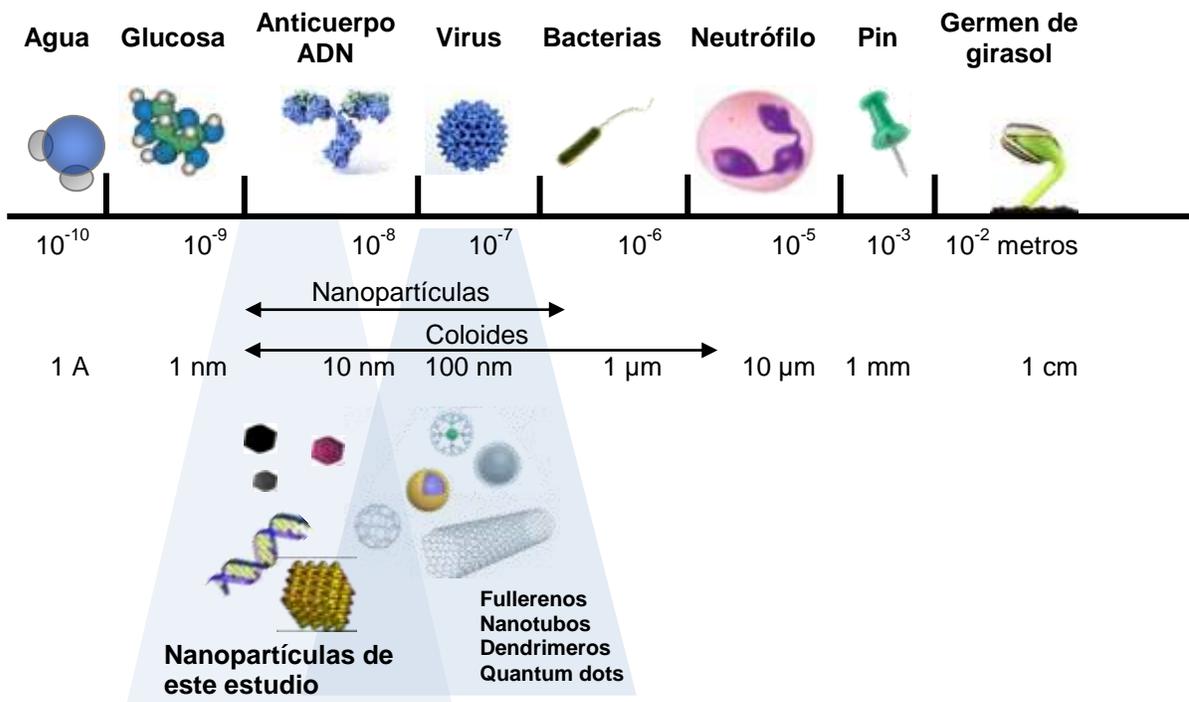


Figura 9. Escala comparativa de partículas nanométricas.

Nanopartículas de Bismuto

Las estructuras a nanoescala de Bi, incluyen nanotubos, nanopartículas, nanofibras, (Liu et al., 2003; Chen et al., 2006; Bisrat et al., 2007) y nanoplacas entre otros (Yu et al., 2004).

Las NPs de Bi_2O_3 ofrecen un gran potencial para diversas aplicaciones prácticas en electrónica, fotónica, sensores bioquímicos, magnetismo, incluyendo sus aplicaciones biológicas (Stern et al., 2007). Como semiconductor, puede cambiar las propiedades de materiales fotosensibles y electrocrómicos (Argun et al., 2004, Li et al., 2009), ya que se caracteriza por tener una brecha energética amplia.

Los nanomateriales de Bi_2S_3 incluyen tubos, varillas, cables y partículas, que tienen aplicación en dispositivos electroquímicos de almacenamiento de hidrógeno (H) y en sensores de H a temperatura ambiente (Wang et al., 2002, Zhang et al., 2006, Yao et al., 2008). Son utilizados como fotodetectores ya que actúan como transductor de la luz (Case, 1917, Konstantatos et al., 2008). Tomando en cuenta esta propiedad, también se utilizan en matrices de fotodiodos, en celdas solares (Hodes et al., 1976; Miller & Heller, 1976; Pramanik & Bhattacharya, 1980) y en el área biomédica como medio de contraste de imagen para Tomografía Computarizada con rayos X (Rabin et al., 2006). Además las NPs de Bi_2S_3 poseen actividad antimicrobiana, por lo que está siendo empleado en la superficie de catéteres para la prevención de infecciones (FCC, GamCath Dolphin® Protect, Gambro) (Schindler et al., 2010).

Los nanocompuestos de triyoduro de Bismuto (BiI_3) y nylon-11 se utilizan en radiografías digitales como fotoconductores (Wang & Herron, 1996). Por otra parte, los

nanotubos de $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$ han exhibido efectividad antibacteriana contra *H. pylori* (Chen et al., 2006).

Aunque se conoce la efectividad antimicrobiana de diferentes compuestos de Bi, tanto para bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Domenico et al., 2001), la interacción del Bi y sus equivalentes nanométricos con los organismos no han sido claramente definidos. Se ha sugerido que el efecto letal de las sales de Bi pueden estar relacionadas con su naturaleza catiónica, debido a que cuando se adiciona Fetuin (AHSG o Fetuin-A), que es una glicoproteína (aniónica), en cultivos de *H. pylori*, se ha observado bloqueo en la actividad antimicrobiana de $\text{BiC}_{12}\text{H}_{14}\text{K}_5\text{O}_{17}$ (CBS por sus siglas en inglés) (Coudron & Stratton, 1995). Estudios posteriores observaron la acción del CBS como agente policatiónico, perturbando el glicocáliz de la pared celular de bacilos Gram-negativos (Stratton et al., 1999). Mientras que en *Escherichia coli*, el efecto del Bi involucra la inhibición del factor de transcripción rho y transporte de hierro (Fe) (Domenico et al., 1996; Brogan et al., 2005).

Nanopartículas de Plata

Las NPs de Ag^0 son partículas insolubles de un tamaño menor a 100 nm (Weir et al., 2008). Se ha explotado su uso en fotografía, catálisis, fotónica, optoelectrónica, almacenamiento de información y en la formación de ferrofluidos magnéticos (Sun & Xia, 2002). A su vez, diversos estudios se han enfocado en la actividad antimicrobiana de las NPs de Ag^0 , donde muestran que estas partículas son eficaces en la inhibición de formación de biopelículas, así como en patógenos tipo *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (Sondi & Salopek-Sondi, 2004; Fabrega et al., 2009) y en parásitos como *Leishmania infantum* (Baiocco et al., 2011). Las partículas más pequeñas y con una

mayor razón área superficial-volumen, poseen gran superficie efectiva con actividad antimicrobiana y citotóxica utilizando menores concentraciones que la utilizada con las partículas más grandes, lo que incrementa el interés en su estudio (Baker et al., 2005; Panacek et al., 2006). Además, se ha observado que la forma de los nanometales puede interferir con su efecto. Pal y colaboradores (Pal et al., 2007) encontraron que las NPs de Ag triangulares muestran mayor acción biocida con *E. coli* que las nanopartículas esféricas o de barra.

En relación con los organismos, se ha informado que la Ag nanométrica tiene gran afinidad por grupos cargados negativamente, que componen las moléculas biológicas, tales como los grupos -SH, carboxilo, fosfato y otros grupos distribuidos en las células microbianas (Rai et al., 2009). Ag ataca varios sitios intracelulares para inactivar las funciones fisiológicas esenciales, tales como la síntesis de la pared celular, transporte de membrana, síntesis y traducción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Ahamed et al., 2008), el plegamiento de proteínas, función y transporte de electrones. Para ciertas bacterias se requiere 1 ppm de plata para ser efectiva en la prevención del crecimiento celular (Gibbins, 2003).

Ecología microbiana

Placa dentobacteriana (formación y composición)

Como fue mencionado con anterioridad, una biopelícula se define como una comunidad de microorganismos sésil en el que las células se adhieren entre sí y a una superficie o sustrato, y se encuentran embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, producidas por las bacterias (Marsh & Bradshaw, 1995; Costerton et al., 1999). Estas comunidades inician su formación cuando las bacterias planctóni-

cas se adhieren a las superficies, después continúa con estadíos de crecimiento y maduración que implican: estructuración de la biopelícula, estabilidad de la comunidad, y por último dispersión de células hijas para adherirse nuevamente al sustrato y completar el ciclo (**Figura 10**) (Donlan, 2002).

En contraste, las bacterias planctónicas presentan tres fases diferentes de crecimiento, que son la fase Lag o de adaptación, donde las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento. Es un período de maduración en el que la bacteria aún no puede dividirse y su actividad consiste en la síntesis de ARN y producción de enzimas y otras moléculas. La fase Log o exponencial, es un período caracterizado por la duplicación celular, y está limitada por el medio en el que se encuentren, el agotamiento de nutrientes y el aumento de desechos. La estacionaria se observa como una fase de meseta en la curva de crecimiento bacteriano; es un valor constante donde la tasa de crecimiento es igual a la tasa de mortalidad. Por último, en la fase de muerte las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren (**Figura 11**) (Novick, 1955, Huang, 2011). Las distintas fases varían en cuanto su duración, dependiendo de condiciones externas como los nutrientes, atmósfera y temperatura, y propias de cada bacteria como ciclo celular, metabolismo y producción de desechos.

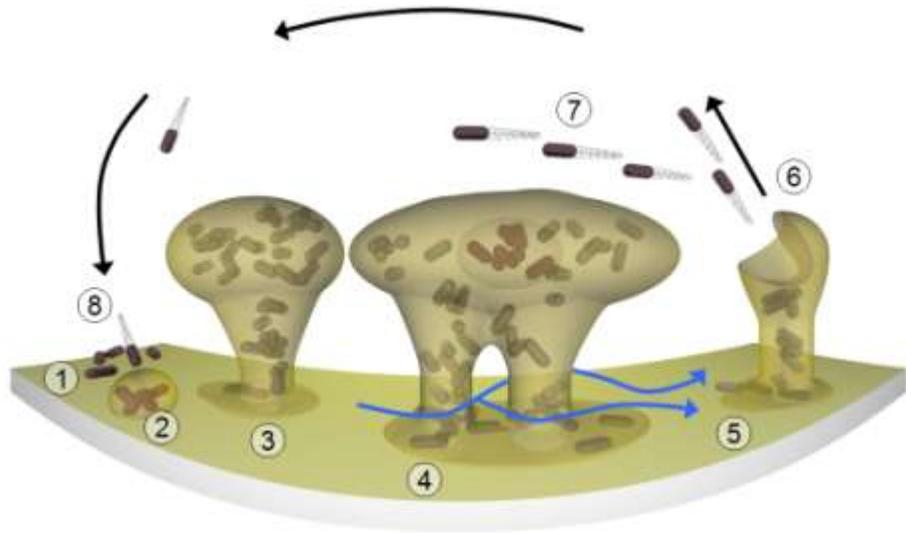


Figura 10. Estadios de Formación de una Biopelícula. Estas comunidades inician su formación cuando las bacterias planctónicas se adhieren a las superficies (Etapa 1 y 2), continúa con estadios de crecimiento (Etapa 3) y maduración (Etapa 4 y 5) que implican: estructuración de la biopelícula, estabilidad de la comunidad, y por último dispersión de células hijas (Etapa 6 - 8) para adherirse nuevamente al sustrato y completar el ciclo.

(http://cronodon.com/BioTech/Bacterial_Society.html)

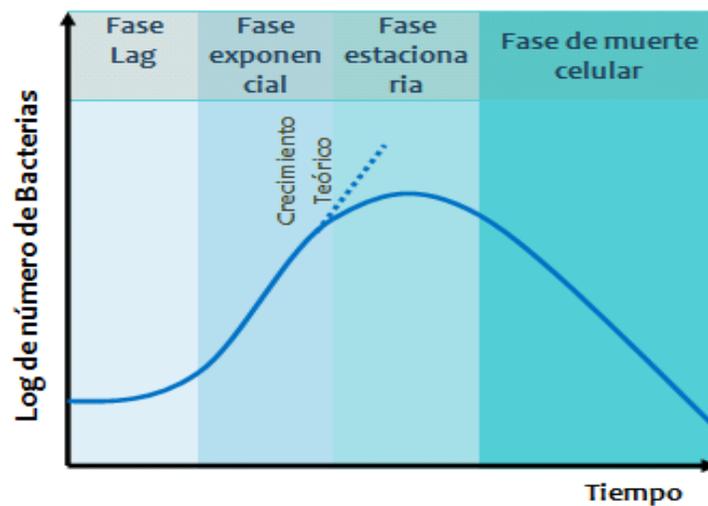


Figura 11. Curva de Crecimiento Bacteriano para bacterias en estado planctónico. Fase de latencia (Lag), fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular.

En muchos casos, la compleja comunidad de microorganismos sobre el diente es relativamente benigna y los procesos protectores normales del huésped son suficientes para preservar la integridad de los tejidos (Socransky & Haffajee, 2005). Sin embargo, se ha observado que estos agregados de bacterias orales pueden ocasionar severas enfermedades localizadas como caries dental (Gibbons, 1989; Gonzalez-Cabezas, 2010), enfermedad periodontal (Preshaw et al., 2004), peri-implantitis (Grossner-Schreiber et al., 2009; Casado et al., 2011) así como el fracaso en tratamientos endodónticos (Chavez de Paz, 2007, Guo & Wang, 2009), ortodónticos (Atack et al., 1996; Fournier et al., 1998; Naranjo et al., 2006; Ahn et al., 2007), quirúrgicos ortopédicos (Costerton, 2005; Jenkinson & Lamont, 2005; Esteban & Cordero-Ampuero, 2011) o incluso tener implicaciones sistémicas (Beikler & Flemmig, 2011) y afectar otros órganos como corazón, meninges, hígado y pulmón (Wagner et al., 2006; Mueller et al., 2009; Parahitiyawa et al., 2009).

La formación y maduración de la placa dental es un proceso altamente ordenado (Xie et al., 2000), relacionado con los estadios de formación de la biopelícula que muestra las asociaciones entre especies bacterianas. Por esto, observamos que a los pocos minutos después de realizar una limpieza dental profesional, se inicia la colonización de las superficies orales, principalmente con cocos y bacilos Gram-positivos predominando los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*. Las bacterias se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana (Saxton, 1973; Theilade et al., 1982; Jenkinson & Lamont, 1997; Scannapieco, 1994), las cuales interactúan con moléculas adheridas a la superficie dental derivadas de componentes salivales y del fluido crevicular (Gibbons et al., 1988; Gibbons et al., 1991;

Kolenbrander et al., 1999). Estos primeros colonizadores también poseen receptores específicos para diferentes especies bacterianas (llamados colonizadores puente o secundarios) que posteriormente se coagregarán, a la estructura inicialmente formada (Cook et al., 1998; Gibbons & Nygaard, 1970).

Los segundos colonizadores, están formados principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Prevotella* entre otros (Kolenbrander et al., 1999). Sus mecanismos de adhesión les sirven de unión tanto con los primeros colonizadores como con las especies de microorganismos que se coagregarán de forma tardía a la placa bacteriana, si la secuencia de colonización de la placa bacteriana no se ve interrumpida. Por lo tanto, un tercer grupo, llamados colonizadores tardíos, son bacterias anaerobias Gram-negativas como especies de los géneros *Treponema* y *Porphyromonas* (Kolenbrander et al., 1999; Listgarten, 1999), que se unen a la biopelícula dental. Las asociaciones específicas de los diferentes grupos de colonizadores, fueron organizadas en seis complejos representativos de la placa dentobacteriana subgingival, dividiéndolos en colores para fines prácticos (**Tabla 1**). Así tenemos que los complejos amarillo, morado, verde y azul son especies consideradas “colonizadoras primarias” caracterizadas por una coagregación intragenérica. El complejo naranja está compuesto principalmente por “colonizadores puente” que exhiben una coagregación intergenérica. Y el complejo rojo por “colonizadores tardíos” donde se incluyen las bacterias consideradas periodonto- patógenos (Socransky & Haffajee, 2005).

Tabla 1. Bacterias de los diferentes complejos que forman la placa dentobacteriana subgingival.

Complejo azul	Especies de <i>Actinomyces</i>
Complejo amarillo	<i>Streptococcus gordonii</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. sanguinis</i>
Complejo morado	<i>Actinomyces odontolyticus</i> y <i>Veillonella parvula</i>
Complejo verde	<i>Eikenella corrodens</i> , <i>Capnocytophaga sputigena</i> , <i>Corynebacterium matruchotii</i>
Complejo naranja	<i>Campylobacter showae</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium periodonticum</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella nigrescens</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Eubacterium nodatum</i> .
Complejo rojo	<i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Especies no agrupadas	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Selenomonas noxia</i> y <i>Actinomyces viscosus</i>

Especies bacterianas de la placa dental subgingival

A continuación se mencionan algunas características de bacterias que forman parte de la microbiota oral normal y que fueron usados en este estudio. Resumen en la **Tabla 2**.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Anteriormente llamada *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Son bacterias pleomorficas, Gram-negativas, de aerotolerancia capnofílico (5 % CO₂). Poseen un tamaño entre 0.4 - 0.5 µm de ancho, por 1.0 - 1.5 µm de largo. Han sido implicados como un microorganismo periodonto-patógeno mayor, asociado a enfermedad periodontal agresiva localizada y en menor proporción

a la variante crónica (Mandell et al., 1986; Socransky and Haffajee, 2005). Las colonias de *A. actinomycetemcomitans* se caracterizan por una firme adherencia a la superficie del medio. Las especies pueden ser divididas en distintos serotipos, de acuerdo a su inmunodifusión y sus propiedades inmunofluorescentes indirectas. Entre sus factores de virulencia se encuentra la producción de colagenasa y productos citotóxicos capaces de lisar leucocitos polimorfonucleares humanos *in vitro* (Kiley & Holt, 1980; Zambon et al., 1983).

Actinomyces israelii. Llamada anteriormente *Streptothrix israelii*. Son bacilos Gram-positivos, anaerobios facultativos que requieren CO₂ para un óptimo crecimiento. Son pleomorficos, de un diámetro variable de 0.5 a 1µm y un largo de 1.5 - 5 µm. Las colonias son de color blanco o gris crema que se observan fuertemente adheridas al medio de agar. Los principales sitios de colonización de los *Actinomyces* son la cavidad bucal en el hombre y ciertos animales, las tonsilas y el aparato genital femenino. Algunos *Actinomyces* han sido asociados con enfermedad gingival y es capaz de establecerse en tejidos traumatizados y ocasionar infección supurativa. *A. israelii* es el mayor patógeno causal de actinomicosis humana, conjuntivitis y endometritis, condición relacionada al uso de dispositivo intrauterino. Algunas especies poseen fimbrias, que son importantes para la adherencia y coagregación con otras bacterias. Los productos principales de la fermentación de la glucosa por *Actinomyces* son el ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico y ácido succínico. En la cavidad oral predominan en la superficie dental y la interacción entre ellas y su sustrato ayuda a estabilizar la biopelícula. Dichas especies son consideradas periodonto-benéficas debido a que suelen

encontrarse en proporciones elevadas bajo condiciones de salud periodontal (Slots & Taubman, 1992, Kolenbrander, 2000; Winn et al., 2005).

Eikenella corrodens. Anteriormente fue llamada y clasificada como *Bacteroides corrodens* (Holm, 1950; Eiken, 1958; Brenner et al., 2005). Son bacilos Gram-negativos, anaerobios, con un diámetro de 0.3 a 0.4 por 1.5 a 4 μm de longitud. Sus colonias parecen “corroer” o picar la superficie del agar, produciendo crecimiento en depresión rugosa, con bordes circulares o irregulares, de color gris translúcido y no hemolítico y de 0.5 mm de diámetro. El crecimiento en medio líquido es usualmente pobre. Es descrito como un organismo de crecimiento lento. Se encuentra como habitante normal de la cavidad oral, del aparato respiratorio superior y de la superficie de la mucosa de los sistemas intestinal y genital. *E. corrodens* presenta una coagregación con especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Capnocytophaga*, *Actinobacillus* y *Streptococcus* en la placa dental. Se considera un patógeno oportunista ureasa positivo. Algunos estudios *in vitro* sobre susceptibilidad antimicrobiana indican que infecciones por *E. corrodens* pueden ser tratadas con penicilina, ampicilina, cefalosporinas de primera generación, imipenem y tetraciclinas, pero es resistente a la clindamicina (Balows, 1992; Slots, 1992).

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

minantes en las cavidades de humanos y otros animales, así como de la flora mixta en infecciones de tejidos blandos causados por contaminación de la flora oral. No tienen movilidad, no forman esporas, son no fermentativos y produce ácido butírico como producto del metabolismo final, así como la enzima glutamato deshidrogenasa. Su patogenicidad está asociada a la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos y la producción de factores solubles inhibidores de la quimiotaxis de los polimorfonucleares y la elaboración de metabolitos que se comportan como compuestos tóxicos tisulares. (Ba-lows, 1992; Slots & Taubman, 1992; Winn et al., 2005).

Porphyromonas gingivalis. Antes conocidas como *Bacteroides*. Son bacilos Gram-negativos, anaerobios. Las células pueden ser pleomórficas, alargadas o cocos, de 0.5 x 1 a 2 μm . Sus colonias son típicamente pigmentadas negras, especialmente sobre medio agar que contiene sangre lisada. Esta pigmentación se debe a la presencia de hemina y protoporfirina. *P. gingivalis* no fermenta carbohidratos, por lo que son llamadas asacarolíticas; utilizan substratos nitrogenados como fuente de energía. El principal sitio de colonización de *P. gingivalis* es el surco subgingival de la cavidad oral y es considerado un microorganismo patógeno importante en el desarrollo de las enfermedades periodontales. Se han observado en esta bacteria, elementos estructurales que favorecen su virulencia como los lipopolisacáridos y otros elementos como son las fimbrias, la hemaglutinina, residuos protéicos, glucídicos que actúan en los procesos de adhesión a las células epiteliales de los tejidos del hospedero y en la coagregación bacteriana (Slots & Taubman, 1992; Winn et al., 2005).

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

Parvimonas micra. Llamada anteriormente *Peptostreptococcus micros*. Son cocos Gram-positivos, anaerobios. Las células esféricas, son pequeñas y pueden medir de 0.3 a 0.7 μm de diámetro. Se encuentran no móviles y no forman esporas. Sus colonias usualmente son pequeñas de 1 a 2 mm o menos de diámetro, circular, entera, convexa, suave, gris translúcida a blanca y no hemolítica. *P. micra* no fermenta carbohidratos y produce fosfatasa alcalina. Su habitat principal es la placa subgingival de bolsas peridontales humanas, aunque también se encuentra en intestino, tracto uro-

genital y participa en numerosas infecciones humanas que incluyen cerebro, pulmón y mandíbula (Slots & Taubman, 1992; Winn et al., 2005).

Streptococcus sanguinis. La palabra *sanguinis* significa sangre. Son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos. Las células pueden ser ovales y en ocasiones en forma de barra, de 0.8 a 1.2 μm de diámetro. Sus colonias en agar sangre son gris-blancuzco o verdes. Las colonias crecidas en un medio con sacarosa producen un polímero fuertemente resiliente que caracteriza su gran adherencia al agar. *S. sanguinis* hidroliza arginina y esculina, produce peróxido de hidrógeno y forma glucano de sacarosa, pero es acetoin negativo. Representan el mayor componente de la placa dental supragingival y es considerado un colonizador primario por su capacidad de unirse directamente a las superficies orales. Esta asociado a la etiología de la caries dental la enfermedad peridontal y endocarditis bacteriana subaguda. Sin embargo, también jugar un papel protector en enfermedad periodontal por inhibir la colonización de patógenos periodontales Gram negativos (Slots & Taubman, 1992; Winn et al., 2005).

Especies bacterianas de importancia médica

Estas tres especies aeróbicas son conocidos patógenos comunes de infecciones de piel y tejidos blandos.

Escherichia coli. Theodor Escherich describió por primera vez a este organismo como *Bacterium coli commune* en 1885. Es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facul-

tativo, de 1.1 a 1.5 μm de ancho y de largo 2 a 6 μm . Ha sido considerada como una bacteria extremadamente bien adaptada, ya que es capaz de sobrevivir en medios poco nutritivos. Puede ser móvil por la presencia de flagelos (Brenner et al., 2005). La fermentación de productos de D-glucosa y otros carbohidratos incluyen ácidos y gases visibles. Diversas especies de *E. coli* son consideradas habitantes del tracto intestinal por lo que puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía (Balows, 1992; Slots & Taubman, 1992; Winn et al., 2005).

Staphylococcus aureus. Es un coco Gram-positivo, anaerobio facultativo, de dimensiones de entre 0.5 y 1.5 μm . Se agrupan en racimos, formando colonias amarillas y no presenta movilidad (Brenner et al., 2005). *S. aureus* resistente a metilicilina (MRSA), está relacionado a infecciones nosocomiales principalmente por su adherencia a dispositivos biomédicos, ocasionando neumonia, endocarditis, abscesos, etc. (Ehrlich G.D., 2004; Köck R, 2010).

Pseudomonas aeruginosa. Son bacilos Gram negativos, aerobios con motilidad rápida por contracción. Su tamaño varía de 0.5-0.7 μm de ancho y 1.5 a 3 μm de largo. En cultivos *in vitro* se reconocen por sus colonias color perla. Son patógenos oportunistas en humanos y también en plantas. Puede causar neumonía, dermatitis y shock séptico, etc (Brenner et al., 2005).

Tabla 2. Características individuales de las especies microbianas utilizadas en este estudio.

Especie Bacteriana	Morfología	Tamaño	Aerotolerancia	Tinción de Gram
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b	Bacilo corto	0.4 - 0.5 µm por 1.0 - 1.5 µm	Capnófilico	negativa
<i>Actinomyces israelii</i>	Bacilo pleomórfico	0.5 - 1 µm por 1.5 - 5 µm	Anaerobio facultativo	positiva
<i>Eikenella corrodens</i>	Bacilo corto	0.3 - 0.4 por 1.5 - 4 µm	Anaerobio	negativa
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	Bacilo	0.4 - 0.7 por 3 - 10 µm	Anaerobio	negativa
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo pleomórfico	0.5 µm por 1.0 - 2.0 µm	Anaerobio	negativa
<i>Prevotella intermedia</i>	Bacilo	0.4 - 0.7 µm por 1.5 - 2.0 µm	Anaerobio	negativa
<i>Parvimonas micra</i>	Coco	0.3 - 0.7 µm	Anaerobio	positiva
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Coco	0.8 - 1.2 µm	Anaerobio facultativo	positivo
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo	1.1 - 1.5 µm por 2-6 µm	Anaerobio facultativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco	0.5 - 1.5 µm	Anaerobio facultativo	positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo	0.5 - 0.7 µm por 1.5 - 3 µm	Aerobio	negativo

1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad los sistemas de polímeros, resinas acrílicas y diversas aleaciones implantares y protésicas, no contienen en su fabricación componentes que inhiban el crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas en sus superficies. La presencia de estas biopelículas daña las prótesis dentales e irrita a los tejidos circundantes.

Se sabe que numerosos factores influyen en el crecimiento de las biopelículas y adhesión bacteriana y aún estamos en un campo poco explorado para controlar la proliferación bacteriana sobre prótesis o materiales de restauración. Por lo que es necesario, incorporar materiales que inhiban el crecimiento bacteriano con técnicas que permitan la distribución homogénea de estos materiales, utilizando elementos de fácil obtención.

El propósito de inhibir el crecimiento microbiano en los diversos materiales dentales, está enfocado en prevenir infecciones asociadas al material de restauración o rehabilitación, así como aumentar la vida útil de los mismos disminuyendo su corrosión, degradación u oxidación.

En el presente estudio evaluamos el efecto antimicrobiano de nanopartículas de Bismuto metálico (NanoBi^0), óxido de Bismuto ($\text{NanoBi}_2\text{O}_3$), sulfuro de Bismuto ($\text{NanoBi}_2\text{S}_3$) y Plata metálica (NanoAg^0), sintetizadas por reducción química a partir de una sal metálica, con la finalidad de identificar propiedades antimicrobianas de diferentes nanometales y compararlas con los efectos de sus sales de partida, y así proponer posibles aplicaciones en materiales dentales y dispositivos biomédicos.

Pregunta de Investigación

¿Los compuestos nanométricos de Bismuto tienen efecto antimicrobiano y es comparable al efecto antimicrobiano de nanocompuestos de plata?

1.3 Objetivo

Evaluar el efecto antimicrobiano “*in vitro*” de tres nanocompuestos de Bismuto: NanoBi⁰, NanoBi₂O₃, NanoBi₂S₃, y uno de plata: NanoAg⁰, en diversas especies bacterianas de la cavidad oral y en tres bacterias de importancia médica.

Objetivos específicos

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las nanopartículas de Bismuto y Plata sobre especies bacterianas individuales, representativas de la placa dentobacteriana.

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las nanopartículas de Bismuto y Plata sobre tres especies bacterianas de importancia médica.

CAPITULO 2. EXPERIMENTACIÓN

2.1 Diseño experimental

El diseño experimental se dividió en la síntesis de nanopartículas y en tres evaluaciones microbiológicas que son ordenados de manera cronologica (A, B, C) (**Figura 12**).

El primer ensayo (A) se realizó de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, antes llamado NCCLS por sus siglas en inglés) en el documento llamado “Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria” (NCCLS, 2001), que consistió en tres experimentos diferentes. El primer experimento (**Exp. 1.**) incluyó la evaluación del efecto inhibitorio de la sal de síntesis de Bismuto y Plata y tres nanopartículas: NanoBi⁰, NanoBi₂O₃, y NanoAg⁰, sintetizadas por la Q.F.B. Donaji Velasco, en ocho especies bacterianas de la cavidad oral. En la segunda prueba (**Exp. 2**) incluimos cuatro NPs: NanoBi⁰, NanoBi₂O₃, NanoBi₂O₃, y NanoAg⁰, de mi propia síntesis (V.C.), las sales de partida y el agente reductor y modificador de superficie por separado para descartar su efecto antimicrobiano. En base a la información obtenida en los dos experimentos anteriores, decidimos incluir una tercera prueba (**Exp. 3**) para la evaluación de la sal de Bismuto en diferentes vehículos, y nuevamente los cuatro nanocompuestos recién preparados (V.C.) así como el DMSO puro.

Los siguientes dos ensayos (B y C) se realizarón con en base a los resultados obtenidos en la determinación de CMIs. Los cuales mostraron una clara intervención del vehículo utilizado para la síntesis de NPs en el efecto antimicrobiano tanto de las NPs como de las sales disueltas, por lo que se continuó con pruebas en agar, para

reducir el efecto del vehículo y evaluar el efecto del Bismuto en contacto con las bacterias.

En el segundo ensayo (B) se realizó una prueba (**Exp. 4**), que incluyó la dispersión en agar de un nanocompuesto: NanoBi⁰, en una cepa bacteriana (*S. aureus*).

Por último, un tercer ensayo (C) (**Exp. 5.**) consistió en la evaluación del efecto inhibitorio de bismuto, aluminio, magnesio, zinc y plata en bloque, al estar en contacto con dos distintas especies bacterianas (*P. aeruginosa* y *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*).

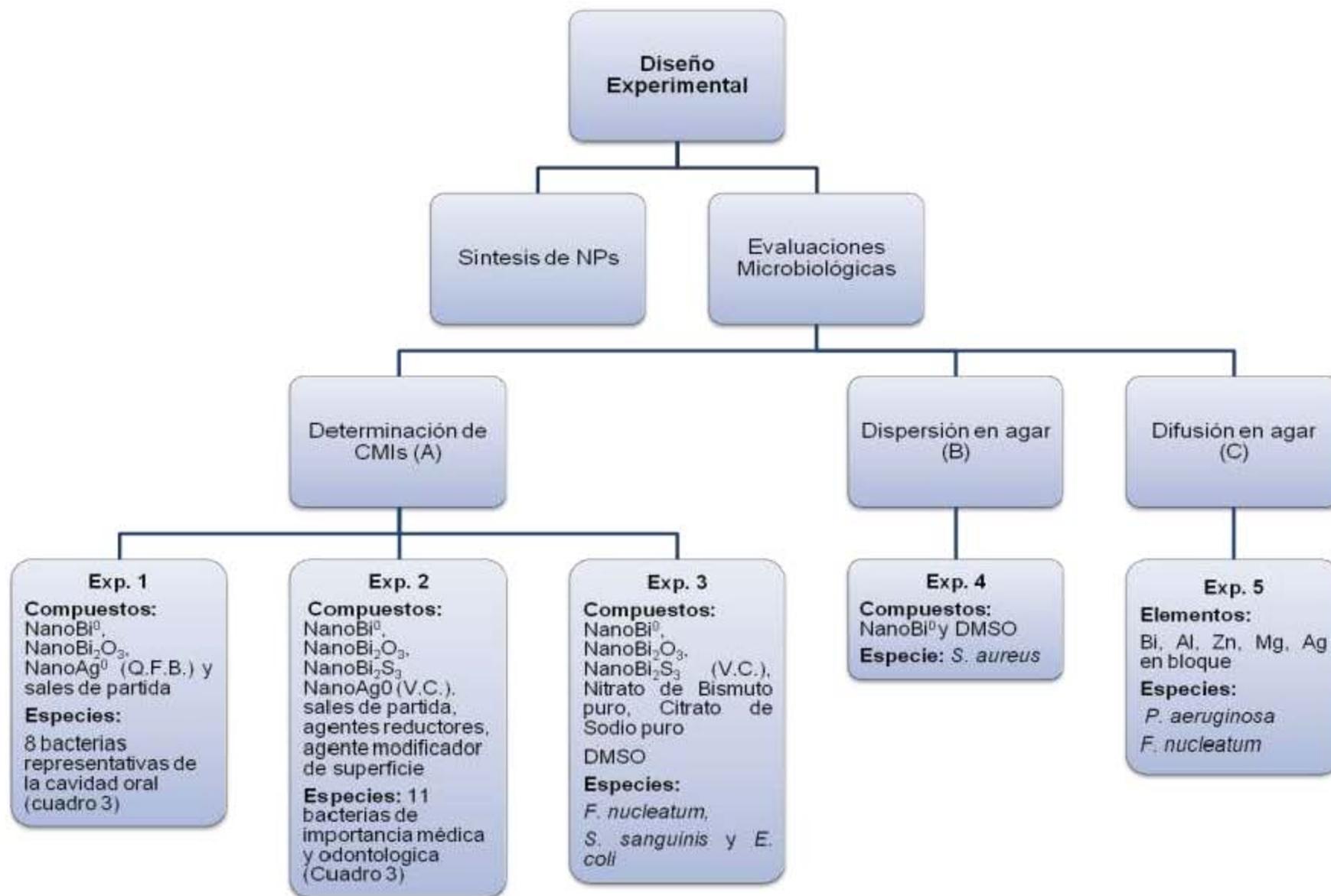


Figura 12. Diseño Experimental.

2.2 Materiales y Métodos

Síntesis de Nanopartículas

Todas las muestras fueron preparadas en el Posgrado de la facultad de Química, UNAM. La síntesis y caracterización de las nanopartículas se obtuvieron por métodos optimizados de reducción química, descritos en la tesis doctoral de Donaji Velasco Arias, por lo que su elaboración y resultados de caracterización no son incluidos en esta tesis (Díaz & Geonel, 2002; Velasco, et. al., en revisión).

En la síntesis de las muestras nanométricas de Bismuto se utilizó como sal de partida el Nitrato de bismuto pentahidratado ($(\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, 99.99%, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México); y como agentes reductores se emplean: Borohidruro de sodio ((NaBH_4) , 96%, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., México, D.F.) Hidróxido de potasio (KOH) y Sulfuro de sodio (Na_2S), dependiendo de la muestra. Para obtener una estabilidad monodispersa de la suspensión coloidal, se determinó el uso de agentes modificadores de superficie o de tensoactivos, como son el Citrato de Sodio ($(\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7)$, 99%, J.T. Backer) y el Dimetil sulfóxido (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, 99.5% J.T Baker S.A. de C.V., Edo. de México), que a su vez ayudan a obtener tamaños ultra finos de cúmulos atómicos y dispersiones coloidales estables en el tiempo.

En la síntesis de las muestras nanométricas de Plata se utilizó como sal de partida 2-etilhexanoato de plata ($(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{AgO}_2)$, Aldrich 99.9%) y DMSO como agente tensoactivo, bajo temperatura controlada.

En los diversos experimentos realizados, también se evaluó el efecto individual de cada compuesto empleado para la síntesis de nanopartículas, incluyendo las sales de partida ($2 \times 10^{-3}\text{M}$ para Bismuto y $1 \times 10^{-3}\text{M}$ para Plata), los agentes reductores

(NaBH₄, KOH y Na₂S), el agente modificador de superficie (C₆H₅Na₃O₇), así como el tensoactivo (DMSO). Estos compuestos fueron evaluados, con el fin de diferenciar el efecto inhibitorio de cada compuesto con el de las partículas nanométricas sintetizadas a partir de ellos (<http://depa.fquim.unam.mx/david/index.htm>).

Evaluaciones Microbiológicas

Determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (A)

Todos los ensayos fueron realizados en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.

Cultivos Bacterianos

Las especies bacterianas empleadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se adquirieron como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Ocho especies bucales de referencia y tres especies de importancia médica se incluyeron en las evaluaciones microbianas (**Tabla 3**).

Las especies liofilizadas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA), y crecidos en agar enriquecido HK (agar base para *Mycoplasma*, Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona (C₁₁H₈O₂, (vitamina K, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México)), 5 µg/mL de hemina (Sigma) y 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México, D.F.) a 34° C en una cámara de anaerobiosis (Coy Laboratory Products Inc., Michigan USA) en condiciones atmosféricas de 80% N₂, 10%

CO₂, 10% H₂, durante 7 días. Las especies que se crecieron en condiciones aerobias, se cultivaron en agar enriquecido TSA (agar soya Trypticase, Bioxon, Becton Dickinson), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina, en una incubadora Felisa a 34° C, durante 24 a 48 horas. Cada una de las cepas fue propagada y transferida hasta obtener cultivos puros.

Tabla 3. Especies bacterianas de referencia utilizadas en las pruebas de susceptibilidad microbiana.

Especie	No. de ATCC
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b*	43718
<i>Actinomyces israelii</i> *	12102
<i>Eikenella corrodens</i> *	23834
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>Nucleatum</i> *	25586
<i>Porphyromonas gingivalis</i> *	33277
<i>Prevotella intermedia</i> *	25611
<i>Parvimonas micra</i> *	33270
<i>Streptococcus sanguinis</i> *	10556
<i>Escherichia coli</i> †	11775
<i>Staphylococcus aureus</i> †	25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> †	10752

* Especies crecidas bajo condiciones de anaerobiosis 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂.

† Especies crecidas en condiciones aerobias.

Determinación de las concentraciones finales utilizadas

Los valores en la determinación de CMI se expresan en unidades de concentración Molar (M) y en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$). La M se basa en el volumen de una solución y se define como el número de moles de soluto por litro de solución. La fórmula para la determinación de las concentraciones finales utilizadas parten de la fórmula de molaridad:

$$M = (n/V) = (\text{moles/L}) = C$$

En donde M es la molaridad, n es el número de moles de soluto y V es el volumen de solución expresado en litros.

Los moles se expresan como:

$$n = (g/MM) = (\text{gramos} / (\text{mw/mol}))$$

En donde g representa los gramos de soluto y MM la masa molecular del soluto que es igual a gramos (mw: peso molecular) en 1 mol (unidad molecular), de aquí que:

$$M = (\text{moles/Volumen}) = C$$

Por lo tanto, partiendo de una concentración Molar de la sal de partida, podemos determinar la concentración evaluada de cada solución.

Todas las concentraciones molares de nanopartículas, están de acuerdo a la concentración inicial de la sal de síntesis y las unidades en $\mu\text{g/mL}$ varían de acuerdo a la cantidad de moles obtenidos por la síntesis de diferentes moléculas y en base a sus correspondientes pesos moleculares.

Determinación de las CMI's (Exp 1 – 3)

De cada cepa, se recolectó el crecimiento de la superficie del agar el cual fue suspendido en un tubo con caldo enriquecido HK (*Mycoplasma* Broth, Becton Dickinson), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina o TSB enriquecido (caldo base para Trypticase Soya Broth (Becton Dickinson), 5 µg/ml de hemina), dependiendo de la cepa. La densidad óptica (D.O.) de cada tubo fue ajustada a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm para obtener 1×10^9 células/mL. Se transfirieron 20 µL de cada tubo ajustado a D.O. = 1 a microplacas de 96 pozos. Cada cepa fue evaluada en diez distintas concentraciones, que fueron de 2.50×10^{-6} a 1.28×10^{-3} M (concentración Molar) para las NanoBi⁰, NanoBi₂S₃, Nano Bi₂O₃ y de 1.25×10^{-6} a 6.40×10^{-4} , M para las NanoAg⁰. Las unidades para las dispersiones coloidales se expresan en concentración Molar, debido a la conveniencia en los procedimientos de laboratorio en donde la cantidad medida es el volumen de solución. Como control negativo se utilizó medio de cultivo sin compuesto y como control positivo se utilizó 10 µg/mL de Ciprofloxacino (C₁₇H₁₈FN₃O₃). También se evaluaron el DMSO y las soluciones de KOH, NaBH₄, Na₂S y C₆H₅Na₃O₇ en DMSO, en las concentraciones utilizadas para la síntesis de cada compuesto de Bismuto y Plata, y utilizando el mismo volumen evaluado (0.250 - 128µL) (**Tabla 4 y 5**). Cada especie bacteriana fue incubada a 34° C en ambiente anaerobio o aerobio, con agitación orbital a 160 rpm, durante 24 hrs.

Tabla 4. Concentraciones experimentales de las muestras nanométricas y las sales de síntesis.

No. Conc.	Volumen Agregado (μL)	Conc. Bi M	NanoBi ⁰ (μg/mL)	NanoBi ₂ O ₃ (μg/mL)	NanoBi ₂ S ₃ (μg/mL)	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O (μg/mL)	Conc. Ag M	NanoAg ⁰ (μg/mL)	C ₈ H ₁₅ AgO ₂ (μg/mL)
1	0.250	2.50 x 10 ⁻⁶	0.522	0.582	0.643	1.21	1.25 x 10 ⁻⁶	0.129	0.317
2	0.500	5.00 x 10 ⁻⁶	1.045	1.165	1.285	2.42	2.50 x 10 ⁻⁶	0.257	0.634
3	1	1.00 x 10 ⁻⁵	2.090	2.330	2.571	4.84	5.00 x 10 ⁻⁶	0.514	1.268
4	2	2.00 x 10 ⁻⁵	4.180	4.660	5.142	9.68	1.00 x 10 ⁻⁵	1.029	2.536
5	4	4.00 x 10 ⁻⁵	8.359	9.319	10.283	19.36	2.00 x 10 ⁻⁵	2.057	5.072
6	8	8.00 x 10 ⁻⁵	16.718	18.638	20.566	38.72	4.00 x 10 ⁻⁵	4.115	10.144
7	16	1.60 x 10 ⁻⁴	33.437	37.277	41.132	77.44	8.00 x 10 ⁻⁵	8.230	20.288
8	32	3.20 x 10 ⁻⁴	66.874	74.553	82.264	154.88	1.60 x 10 ⁻⁴	16.459	40.576
9	64	6.40 x 10 ⁻⁴	133.747	149.107	164.528	309.76	3.20 x 10 ⁻⁴	32.918	81.152
10	128	1.28 x 10 ⁻³	267.494	298.214	329.056	619.52	6.40 x 10 ⁻⁴	65.837	162.304

Conc. Bi. Concentración correspondiente a todas las muestras de Bismuto.

Conc. Ag. Concentración correspondiente a todas las muestras de Plata.

Tabla 5. Concentraciones experimentales de DMSO.

No. Conc.	Volumen agregado μL	DMSO	
		M	$\mu\text{g/mL}$
1	0.250	1.25×10^{-3}	0.097
2	0.500	2.50×10^{-3}	0.195
3	1	5.00×10^{-3}	0.390
4	2	1.00×10^{-2}	0.780
5	4	2.00×10^{-2}	1.560
6	8	4.00×10^{-2}	3.120
7	16	8.00×10^{-2}	6.240
8	32	1.60×10^{-1}	12.480
9	64	3.20×10^{-1}	24.960
10	128	6.40×10^{-1}	49.920

Transcurrido el tiempo de incubación, se replicó el crecimiento bacteriano con un replicador de 96 puntas (Nanlge Nunc International, Internacional de Equipos Científicos, S.A. de C.V.), previamente esterilizado, en cajas rectangulares con medio HK o TSA dependiendo de las cepas (**Figura 13**).

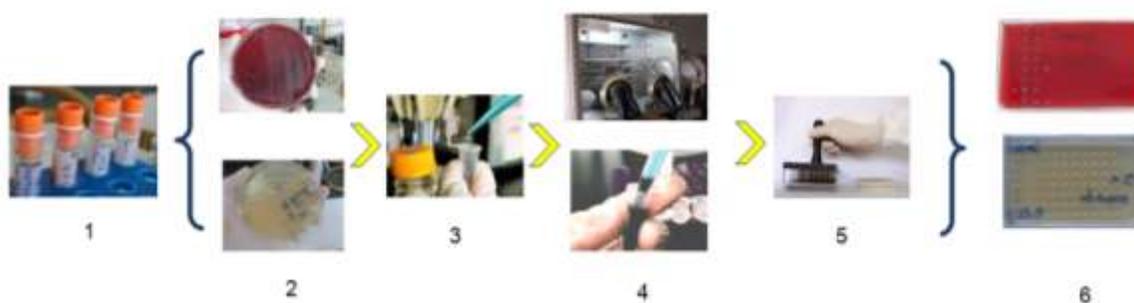


Figura 13. Ensayo microbiológico que incluye: 1) descongelado de las cepas, 2) obtención de cultivos puros, 3) ajuste de la D.O. =1, 4) incubación con las nanopartículas, 5). replicación y 6) Observación de CMIs.

Cada experimento se realizó por triplicado. Todas las placas fueron incubadas a 34°C durante 7 días en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) o 48 hs en atmósfera ambiental. Posteriormente al tiempo de incubación, se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de cada una de las muestras evaluadas (**Figura 14**).

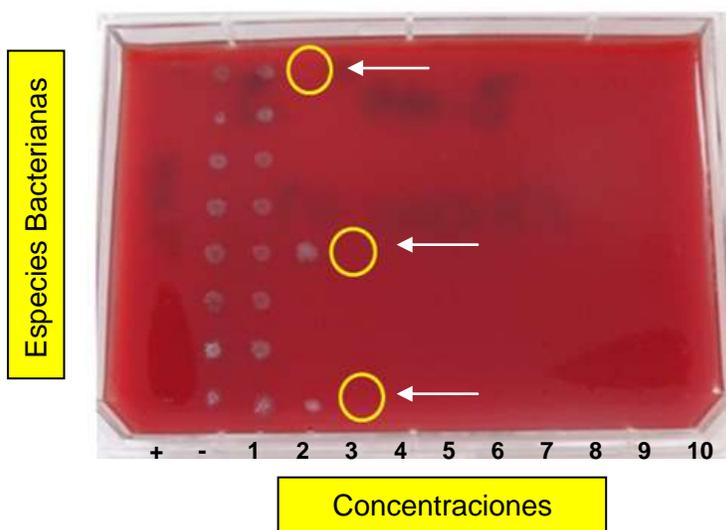


Figura 14. Observación de las CMI (Flecha), que se definen con la concentración a partir de la cual no hay crecimiento bacteriano visible, después de 24 hrs de incubación con los compuestos. Control positivo (+), control negativo (-).

Ensayo microbiológico por dispersión en agar (B)

En este ensayo se evaluaron las NanoBi⁰ y el DMSO puro. En matraces de 50 mL, se dispersaron las nanopartículas de Bismuto metálico en el medio de cultivo TSA, utilizando tres distintas concentraciones que incluían la CMI determinada en el experimento anterior para *S. aureus* y las dos concentraciones inmediatamente inferiores (64 %, 32 % y 16 %). Después de mezclar los compuestos y una vez transcurri-

do el tiempo de gelificación, se hicieron dos grupos de cajas de agar. En el primer grupo se hizo un sacabocado céntrico dentro de los platos de Petri para vaciar nuevo medio de cultivo sin compuesto agregado, rodeando la zona céntrica previamente preparada. Mientras que el segundo grupo permaneció integro el medio preparado con las NanoBi⁰ o con DMSO.

Se recolectó el crecimiento de la superficie del agar de la cepa bacteriana una vez transferida y purificada. Posteriormente fueron suspendidas, en un tubo con caldo TSB enriquecido, para obtener una D.O. = 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm, que equivale a 10^9 células/mL. En seguida, se realizaron diluciones 10^{-7} , 10^{-5} y 10^{-3} , para sembrar 100 μ L del último tubo, sobre la superficie preparada del medio TSA enriquecido y la dispersión coloidal. Las muestras fueron incubadas a 34° C durante 48 h. Posterior al tiempo de incubación se observó el crecimiento bacteriano en cada una de las superficies de agar (**Figura 15**).

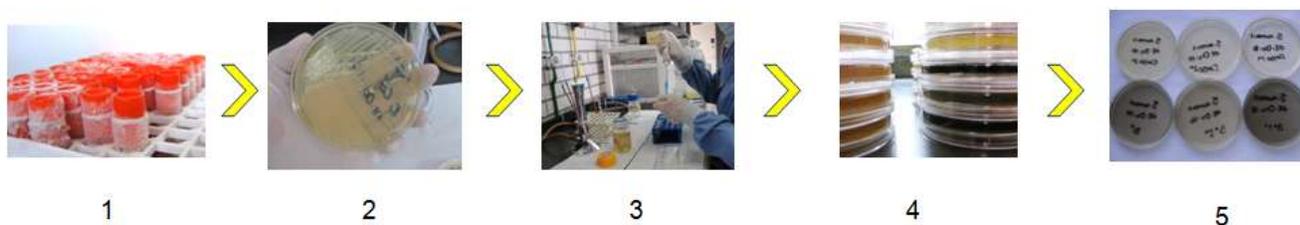


Figura 15. Ensayo de dispersión en agar. 1) Descongelado de la cepa bacteriana, 2) recolección de cultivos puros y obtención de D.O. = 1, 3) Dilución a 10^{-3} , 4) Placas de agar TSA con NanoBi⁰ y DMSO dispersos, 5) Observación de las placas después de ser inoculadas e incubadas durante 24hrs.

Ensayo microbiológico por difusión en Agar (C)

Para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar del bismuto en bloque y otros elementos metálicos, se utilizaron las cepas *P. aeruginosa* y *F. nucleatum*.

Se recolectó el crecimiento de la superficie del agar de cada una de las cepas, las cuales fueron suspendidas por separado, en un tubo con caldo TSB enriquecido para *P. aeruginosa*, y en caldo enriquecido HK para *F. nucleatum*. Para obtener una D. O. = 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm, que equivale a 10^9 células/mL. Posteriormente se realizaron diluciones 10^{-7} , 10^{-5} y 10^{-3} , para sembrar 100 μ L del último tubo, sobre una superficie de agar TSA y HK, los cuales fueron inoculados por completo con *P. aeruginosa*, y *F. nucleatum* respectivamente, para colocar sobre ellas los bloques de Bismuto metálico, Aluminio, Zinc, Magnesio y Plata. Como control positivo utilizamos un filtro impregnado con Ciprofloxacino. *P. aeruginosa* se incubó durante 48 hrs a 34° C en incubadora Felisa y *F. nucleatum* fue incubada a 34° C durante 7 días en condiciones de anaerobiosis (80% N₂, 10%CO₂, 10%H₂). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias a los compuestos probados.

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1 Resultados

Síntesis de Nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas (NPs), se realizó por parte del laboratorio de Química en donde fueron elaboradas. El tamaño y la forma de las NPs que se utilizaron en este estudio, se mencionan a continuación:

NanoBi⁰: En las dispersiones coloidales, se obtuvieron nanopartículas de forma romboidea, con un tamaño promedio de 3.33 nm de diámetro, y 930 átomos en este tamaño de partículas; en un intervalo que va de 2 a 7 nm.

NanoBi₂O₃: En las dispersiones coloidales de óxido de bismuto, se obtuvo nanopartículas cristalinas α - Bi₂O₃, con un tamaño promedio de 6 nm.

NanoBi₂S₃: En las dispersiones coloidales de sulfuro de bismuto, se obtuvo cristales cúbicos con un tamaño promedio de 10 nm.

NanoAg⁰: Los coloides de plata tuvieron un tamaño promedio de 4.4 nm.

(Diaz & Geonel, 2002)(Velasco, et. al., en revisión)

Evaluaciones Microbiológicas

Determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (A)

Exp. 1. Los resultados del efecto inhibitorio de tres NPs (NanoBi⁰, NanoBi₂O₃ y NanoAg⁰) y su sal de síntesis en ocho especies bacterianas de importancia odontológica, se muestran en la **Tabla 6**. Las NanoBi⁰ tuvieron efecto inhibitorio sobre todas las especies evaluadas, en concentraciones de 6.40×10^{-4} a 3.20×10^{-4} M. En tanto las NanoBi₂O₃, fueron efectivas en concentraciones de 1.02×10^{-4} y 2.05×10^{-4} M, lo que mostró mayor susceptibilidad a NanoBi₂O₃ que a NanoBi⁰ en seis especies eva-

luadas. No se observó una clara diferencia, en la susceptibilidad antimicrobiana entre especies Gram-negativas y Gram-positivas. Al comparar estos resultados con NanoAg⁰, es evidente el mayor efecto inhibitorio de los nanocompuestos de Plata, especialmente sobre las especies *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. gingivalis* y *P. micra*, que no tuvieron crecimiento bacteriano en ninguna concentración evaluada, indicando que las CMI se encontraban por debajo a la mínima concentración evaluada (1.25×10^{-6} M). Mientras que las especies *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* y *S. sanguinis*, fueron susceptibles a concentración 1.60×10^{-4} M, equivalente a 16 µg/mL de NanoAg⁰. Por otra parte, las sales ($C_8H_{15}AgO_2$ y $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$) disueltas en DMSO, tuvieron efecto bactericida en concentraciones de entre 2.00×10^{-5} y 3.20×10^{-4} M para las diferentes cepas bacterianas.

Resultados Comparativos

En esta evaluación se pudo demostrar que las NPs de Bismuto y Plata tuvieron efecto antimicrobiano y además con CMI menores a las obtenidas con las respectivas sales disueltas. También se demostró que las NanoAg⁰ fueron más efectivas que NanoBi⁰ y NanoBi₂O₃.

Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias de compuestos de Bismuto y Plata.

Bacterias	NanoAg ⁰		NanoBi ⁰		NanoBi ₂ O ₃		C ₈ H ₁₅ AgO ₂		Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O	
	M	µg/mL	M	µg/mL	M	µg/mL	M	µg/mL	M	µg/mL
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	< 8.00 x 10 ⁻⁵	< 8	3.20 x 10 ⁻⁴	66	2.05 x 10 ⁻⁴	59	2.00 x 10 ⁻⁵	5	4.00 x 10 ⁻⁵	8
<i>A. israelii</i>	1.60 x 10 ⁻⁴	16	3.20 x 10 ⁻⁴	66	1.02 x 10 ⁻⁴	29	2.00 x 10 ⁻⁵	5	4.00 x 10 ⁻⁵	8
<i>E. corrodens</i>	< 8.00 x 10 ⁻⁵	< 8	3.20 x 10 ⁻⁴	66	1.02 x 10 ⁻⁴	29	2.00 x 10 ⁻⁵	5	< 2.00 x 10 ⁻⁵	< 4
<i>F. nucleatum</i>	1.60 x 10 ⁻⁴	16	3.20 x 10 ⁻⁴	66	2.05 x 10 ⁻⁴	59	2.00 x 10 ⁻⁵	5	2.00 x 10 ⁻⁵	4
<i>P. gingivalis</i>	< 8.00 x 10 ⁻⁵	< 8	6.40 x 10 ⁻⁴	133	1.02 x 10 ⁻⁴	29	4.00 x 10 ⁻⁵	10	4.00 x 10 ⁻⁵	8
<i>P. intermedia</i>	1.60 x 10 ⁻⁴	16	3.20 x 10 ⁻⁴	66	1.02 x 10 ⁻⁴	29	4.00 x 10 ⁻⁵	10	4.00 x 10 ⁻⁵	8
<i>P. micra</i>	< 8.00 x 10 ⁻⁵	< 8	6.40 x 10 ⁻⁴	133	1.02 x 10 ⁻⁴	29	2.00 x 10 ⁻⁵	5	2.00 x 10 ⁻⁵	4
<i>S. sanguinis</i>	1.60 x 10 ⁻⁴	16	6.40 x 10 ⁻⁴	133	2.05 x 10 ⁻⁴	59	4.00 x 10 ⁻⁵	10	3.20 x 10 ⁻⁴	66

NanoBi⁰, nanopartículas de bismuto metálico (~ 3.3 nm).

NanoBi₂O₃, nanopartículas de óxido de bismuto (~ 6 nm).

NanoAg⁰, nanopartículas de plata (~ 4 nm).

(<) Concentración inhibitoria por debajo de la mínima utilizada.

Exp. 2. En este experimento se incluyeron tres bacterias asociadas a infecciones por dispositivos biomédicos. Además, se evaluaron cuatro compuestos nanométricos recién preparados ($\text{NanoBi}_2\text{S}_3$, NanoBi^0 , $\text{NanoBi}_2\text{O}_3$ y NanoAg^0) y los agentes químicos utilizados para la síntesis de NPs, así como sus sales de partida (**Tabla 7 y 8**).

Los compuestos de Bismuto tuvieron CMI's mayores a los obtenidos por los compuestos de Plata, sobre las especies cultivadas en atmósfera aerobia (**Figura 16**). Las diferentes NPs de Bismuto tuvieron CMI's de entre 1.60×10^{-4} y 1.28×10^{-3} M; sin embargo las $\text{NanoBi}_2\text{S}_3$, mostraron mayor efecto inhibitorio, seguido por las $\text{NanoBi}_2\text{O}_3$ y NanoBi^0 . Las NanoBi^0 fueron efectivas en concentraciones de entre 3.20×10^{-4} y 1.28×10^{-3} M (66 y 267 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mientras que los coloides de Plata metálica fueron efectivos entre 1.60×10^{-4} y 6.40×10^{-4} M. Las especies que mostraron mayor susceptibilidad a los cuatro diferentes nanocompuestos, fueron las bacterias *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*.

En cuanto a los resultados obtenidos con las sales de partida, se comparó el $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ preparado a concentración 2×10^{-3} M, con el $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{AgO}_2$ preparado a concentración 1×10^{-3} M, (concentración de síntesis de NPs) en DMSO. Los resultados efectivos sobre bacterias orales, para $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fueron de entre 1.60×10^{-4} y 6.40×10^{-4} M (77 y 619 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y de 8.00×10^{-5} a 3.20×10^{-4} M (20-81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{AgO}_2$. Mientras que para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fue efectivo a 1.28×10^{-3} M y entre 1.60×10^{-4} a 3.20×10^{-4} M para $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{AgO}_2$. Todos los agentes químicos utilizados en la síntesis de NPs, se evaluaron en el mismo vehículo

(DMSO). Tanto KOH, NaBH₄, Na₂S como C₆H₅Na₃O₇, tuvieron efecto antimicrobiano comparable con el DMSO.

Resultados Comparativos

Los resultados obtenidos en esta evaluación fueron reproducibles únicamente para NanoBi⁰ con las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra*, *S. sanguini*, al compararlos con las CMI's determinadas en **Exp. 1**. Las NPs de Bi₂O₃ y Ag⁰ y las sales de Bi y Ag, tuvieron un incremento variable de las concentraciones inhibitorias, sobre las ocho especies inicialmente evaluadas. Por lo que se redujo el efecto antimicrobiano de estos compuestos.

Por otro lado, las NanoBi₂S₃ fueron evaluada por primera vez mostrando un mayor efecto sobre las bacterias *F. nucleatum* y *E. coli*, comparado con las NanoBi⁰ y NanoBi₂O₃. Sin embargo, NanoBi₂O₃ es el compuesto de bismuto con mejor efecto sobre diversas especies. Aunque en ambas evaluaciones, los compuestos de plata mostraron mayor efecto bactericida que los compuestos de bismuto.

En este experimento, no hubo diferencia entre muestras nanométricas de Bi y Bi(NO₃)₃.5H₂O, en las especies *A.actinomycetemcomitans*, *A.israelii*, *E.corrodens*, *S.sanguinis* y *S.aureus*. Mientras que para las especies *P.aeruginosa*, *E.coli*, *P.micra* y *F.nucleatum*, fueron más efectivos los compuestos nanométricos que la sal de síntesis.

Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias de nanocompuestos de Bismuto y Plata.

Bacterias	NanoBi ₂ S ₃		NanoBi ⁰		NanoBi ₂ O ₃		NanoAg ⁰	
	M	µg/mL	M	µg/mL	M	µg/mL	M	µg/mL
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ¹	3.20 x 10 ⁻⁴	82	3.20 x 10 ⁻⁴	66	3.20 x 10 ⁻⁴	74	1.60 x 10 ⁻⁴	16
<i>A. israelii</i> ¹	6.40 x 10 ⁻⁴	164	6.40 x 10 ⁻⁴	133	3.20 x 10 ⁻⁴	74	3.20 x 10 ⁻⁴	32
<i>E. corrodens</i> ¹	1.60 x 10 ⁻⁴	41	3.20 x 10 ⁻⁴	66	1.60 x 10 ⁻⁴	37	1.60 x 10 ⁻⁴	16
<i>F.nucleatum</i> ¹	1.60 x 10 ⁻⁴	41	6.40 x 10 ⁻⁴	133	6.40 x 10 ⁻⁴	149	3.20 x 10 ⁻⁴	32
<i>P.gingivalis</i> ¹	6.40 x 10 ⁻⁴	164	6.40 x 10 ⁻⁴	133	3.20 x 10 ⁻⁴	74	3.20 x 10 ⁻⁴	32
<i>P.intermedia</i> ¹	3.20 x 10 ⁻⁴	82	3.20 x 10 ⁻⁴	66	1.60 x 10 ⁻⁴	37	3.20 x 10 ⁻⁴	32
<i>P.micra</i> ¹	3.20 x 10 ⁻⁴	82	6.40 x 10 ⁻⁴	133	3.20 x 10 ⁻⁴	74	3.20 x 10 ⁻⁴	32
<i>S.sanguinis</i> ¹	6.40 x 10 ⁻⁴	164	6.40 x 10 ⁻⁴	133	6.40 x 10 ⁻⁴	149	3.20 x 10 ⁻⁴	32
<i>E.coli</i> ²	6.40 x 10 ⁻⁴	164	1.28 x 10 ⁻³	267	1.28 x 10 ⁻³	267	6.40 x 10 ⁻⁴	65
<i>S.aureus</i> ²	1.28 x 10 ⁻³	329	1.28 x 10 ⁻³	267	1.28 x 10 ⁻³	267	6.40 x 10 ⁻⁴	65
<i>P.aeruginosa</i> ²	6.40 x 10 ⁻⁴	164	1.28 x 10 ⁻³	267	6.40 x 10 ⁻⁴	149	3.20 x 10 ⁻⁴	32

¹ Especies cultivadas en ambiente anaerobio.

² Especies cultivadas en atmósfera aerobia.

NanoBi⁰, nanopartículas de Bismuto metálico (~ 3.3 nm).

NanoBi₂O₃, nanopartículas de óxido de Bismuto (~ 6 nm).

Nano Bi₂S₃, nanopartículas de sulfuro de Bismuto (~ 10 nm).

NanoAg⁰, nanopartículas de Plata (~ 4 nm).

Tabla 8. Concentraciones mínimas inhibitorias de nitrato de Bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 2-etilhexanoato de plata ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{AgO}$) y agentes químicos utilizados para la síntesis de nanopartículas de Bismuto y Plata.

Bacterias	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{AgO}_2$		DMSO	NaBH_4	KOH	Na_2S	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$
	M	$\mu\text{g/mL}$	M	$\mu\text{g/mL}$	M	M	M	M	M
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	3.20×10^{-4}	154	8.00×10^{-5}	20	1.60×10^{-1}	6.40×10^{-4}	6.40×10^{-4}	6.40×10^{-4}	9.60×10^{-4}
<i>A.israelii</i>	6.40×10^{-4}	309	8.00×10^{-5}	20	3.20×10^{-1}	1.28×10^{-3}	1.28×10^{-3}	6.40×10^{-4}	9.60×10^{-4}
<i>E.corrodens</i>	1.60×10^{-4}	77	8.00×10^{-5}	20	3.20×10^{-1}	6.40×10^{-4}	1.28×10^{-3}	6.40×10^{-4}	9.60×10^{-4}
<i>F.nucleatum</i>	3.20×10^{-4}	154	1.60×10^{-4}	40	3.20×10^{-1}	1.28×10^{-3}	3.20×10^{-4}	6.40×10^{-4}	9.60×10^{-4}
<i>P.gingivalis</i>	3.20×10^{-4}	154	1.60×10^{-4}	40	3.20×10^{-1}	6.40×10^{-4}	6.40×10^{-4}	8.00×10^{-2}	1.92×10^{-3}
<i>P.intermedia</i>	1.60×10^{-4}	77	8.00×10^{-5}	20	8.00×10^{-2}	3.20×10^{-4}	3.20×10^{-4}	6.40×10^{-4}	9.60×10^{-4}
<i>P.micra</i>	6.40×10^{-4}	309	8.00×10^{-5}	20	3.20×10^{-1}	6.40×10^{-4}	6.40×10^{-4}	6.40×10^{-4}	9.60×10^{-4}
<i>S.sanguinis</i>	6.40×10^{-4}	309	1.60×10^{-4}	40	3.20×10^{-1}	1.28×10^{-3}	1.28×10^{-3}	1.28×10^{-3}	1.92×10^{-3}
<i>E.coli</i>	1.28×10^{-3}	619	1.60×10^{-4}	40	6.40×10^{-1}	2.56×10^{-3}	2.56×10^{-3}	2.56×10^{-3}	3.84×10^{-3}
<i>S.aureus</i>	1.28×10^{-3}	619	3.20×10^{-4}	81	6.40×10^{-1}	2.56×10^{-3}	2.56×10^{-3}	2.56×10^{-3}	3.84×10^{-3}
<i>P.aeruginosa</i>	1.28×10^{-3}	619	1.60×10^{-4}	40	6.40×10^{-1}	2.56×10^{-3}	2.56×10^{-3}	2.56×10^{-3}	3.84×10^{-3}

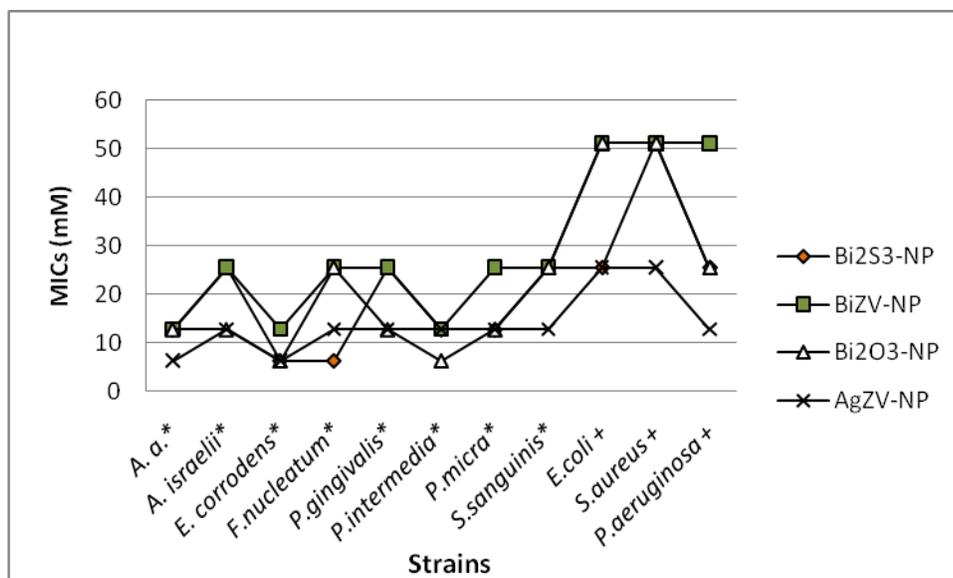


Figura 16. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs ($\mu\text{g/mL}$)) de nanopartículas de sulfuro de Bismuto ($\text{NanoBi}_2\text{S}_3$), Bismuto metálico (NanoBiCV), óxido de Bismuto ($\text{NanoBi}_2\text{O}_3$) y plata (NanoAgCV). (*) Especies bacterianas de importancia odontológica, (+) especies bacterianas de importancia médica.

Exp. 3. Con base en estos resultados, se planeó evaluar el efecto de la sal de Bismuto en agua y en DMSO, a concentraciones 2×10^{-3} M y 2×10^{-1} M, incluyendo DMSO puro y una nueva síntesis de NanoBi^0 , $\text{NanoBi}_2\text{S}_3$, y $\text{NanoBi}_2\text{O}_3$, sobre *F. nucleatum*, *S. sanguinis* y *E. coli*. Las CMIs obtenidas se describen en la **Tabla 9**.

El $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua, en concentración inicial de 2×10^{-3} M (concentración utilizada en la síntesis de NPs de Bismuto) no tuvo efecto antimicrobiano en dos de las especies bacterianas con las diferentes concentraciones evaluadas. Mientras que a la misma concentración inicial de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disuelto en DMSO, se observaron CMIs de 1.60×10^{-4} , 6.40×10^{-4} y 1.28×10^{-3} M para *F. nucleatum*, *S. sanguinis* y *E. coli* respectivamente. Es evidente que con stocks más concentrados (2×10^{-1} M) hay mayor efecto antimicrobiano, aunque esto solo ocurrió cuando se utilizó agua como vehículo. En cambio con DMSO variaron los resultados. También se observó que el

$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fue más efectivo en DMSO, principalmente en las bacterias *F. nucleatum* y *E. coli*, mientras *S. sanguinis* mostró inhibición en el mismo volumen utilizado, independientemente del vehículo.

Por otro lado, los tres nanocompuestos de Bismuto fueron efectivos en concentraciones de entre 4.00×10^{-5} y 9.60×10^{-4} M. Mientras que el DMSO tuvo CMI de 3.20×10^{-1} y 6.40×10^{-1} M. Se observó que el citrato de sodio, utilizado como agente modificador de superficie durante la síntesis de nanocompuestos de Bismuto, no tiene efecto antimicrobiano cuando se disuelve en agua.

Resultados Comparativos

Las CMI de los nanocompuestos de Bismuto, fueron reproducibles sobre la especie bacteriana *S. sanguinis*, en los **Exp. 2** y **Exp. 3**. Mientras que *E. coli* fue consistente solo con $\text{NanoBi}_2\text{S}_3$ en ambos experimentos y *F. nucleatum* vario sus resultados con todas las muestras, en los tres ensayos.

En los tres ensayos, NanoBi^0 tuvo CMI constantes para *S. sanguinis*, demostrando mayor reproducibilidad que los otros compuestos y a su vez, mejor estabilidad de la bacteria al método experimental, en comparación con otras especies.

En esta evaluación no hubo diferencia notable entre $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en DMSO a concentración de síntesis y los nanomateriales, sobre las tres bacterias.

Tabla 9. Concentraciones mínimas inhibitorias de tres distintas nanopartículas de Bismuto y de nitrato de Bismuto.

Bacterias	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O (M)				NanoBi ⁰	NanoBi ₂ S ₃	NanoBi ₂ O ₃	DMSO ^a	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ^b
	A	B	C	D	M	M	M	M	M
<i>F. nucleatum</i>	NA	8.00 x 10 ⁻³	1.60 x 10 ⁻⁴	< 2.50 x 10 ⁻⁴	4.00 x 10 ⁻⁵	3.20 x 10 ⁻⁴	3.20 x 10 ⁻⁴	< 1.25 x 10 ⁻³	> 3.84 x 10 ⁻³
<i>S. sanguinis</i>	> 1.28 x 10 ⁻³	6.40 x 10 ⁻²	6.40 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻²	6.40 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻⁴	3.20 x 10 ⁻¹	> 3.84 x 10 ⁻³
<i>E. coli</i>	> 1.28 x 10 ⁻³	1.28 x 10 ⁻¹	1.28 x 10 ⁻³	9.60 x 10 ⁻²	9.60 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻⁴	9.60 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻¹	> 3.84 x 10 ⁻³

A. Bi(NO₃)₃·5H₂O en agua, stock 2x10⁻³ M.

B. Bi(NO₃)₃·5H₂O en agua, stock 2x10⁻¹ M.

C. Bi(NO₃)₃·5H₂O en DMSO, stock 2x10⁻³ M.

D. Bi(NO₃)₃·5H₂O en DMSO, stock 2x10⁻¹ M.

^a DMSO puro.

^b Citrato de Sodio en agua, stock 6x10⁻³M.

(NA) No aplica.

(>)CMI mayor que la máxima utilizada.

(<) CMI menor que la mínima utilizada.

NanoBi⁰, nanopartículas de bismuto metálico (~ 3.3 nm).

NanoBi₂O₃, nanopartículas de óxido de bismuto (~ 6 nm).

Nano Bi₂S₃, nanopartículas de sulfuro de bismuto (~ 10 nm).

Resumen

En la **Tabla 10** se muestran los diferentes resultados obtenidos de cada compuesto analizado en los tres experimentos (**Exp 1 – 3**), sobre las especies bacterianas cultivadas en atmósfera anaerobia y aerobio.

Tabla 10. Intervalo de CMI de tres ensayos microbiológicos de compuestos de Bismuto y de Plata.

Bacterias/ Compuestos	Anaerobias	Aerobias
	M	M
NanoBi ⁰	3.20 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴ 3.20 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴ 6.40 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻⁴ - 1.28 x 10 ⁻³ 9.60 x 10 ⁻⁴
NanoBi ₂ S ₃	3.20 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴ 3.20 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴	6.40 x 10 ⁻⁴ - 1.28 x 10 ⁻³ 6.40 x 10 ⁻⁴
NanoBi ₂ O ₃	1.02 x 10 ⁻⁴ - 2.05 x 10 ⁻⁴ 1.60 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴ 3.20 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴	1.28 x 10 ⁻³ 9.60 x 10 ⁻⁴
NanoAg ⁰	1.25 x 10 ⁻⁶ - 1.60 x 10 ⁻⁴ 1.60 x 10 ⁻⁴ - 3.20 x 10 ⁻⁴	3.20 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴
Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O disuelto en DMSO	5.00 x 10 ⁻⁶ - 8.00 x 10 ⁻⁵ 1.60 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴ 1.60 x 10 ⁻⁴ - 6.40 x 10 ⁻⁴	1.28 x 10 ⁻³ 1.28 x 10 ⁻³
Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O disuelto en Agua	>1.28 x 10 ⁻³	>1.28 x 10 ⁻³
C ₈ H ₁₅ AgO ₂ disuelto en DMSO	2.50 x 10 ⁻⁶ - 5.0 x 10 ⁻⁶ 8.00 x 10 ⁻⁵ - 1.60 x 10 ⁻⁴	1.60 x 10 ⁻⁴ - 3.20 x 10 ⁻⁴

(>)CMI mayor que la máxima concentración utilizada.

Ensayo microbiológico por dispersión en agar (B)

Exp. 4. En los ensayos de dispersión en agar, no se observó ningún crecimiento microbiano con NanoBi⁰ o con DMSO puro, en ninguna de las concentraciones evaluadas para *S. aureus* (**Figura 17**). Es decir, por este método la CMI para las NanoBi⁰ y el solvente orgánico por separado, sobre *S. aureus* es menor a 3.20×10^{-4} M (equivalente a la 8^a concentración utilizada para ambos compuestos).

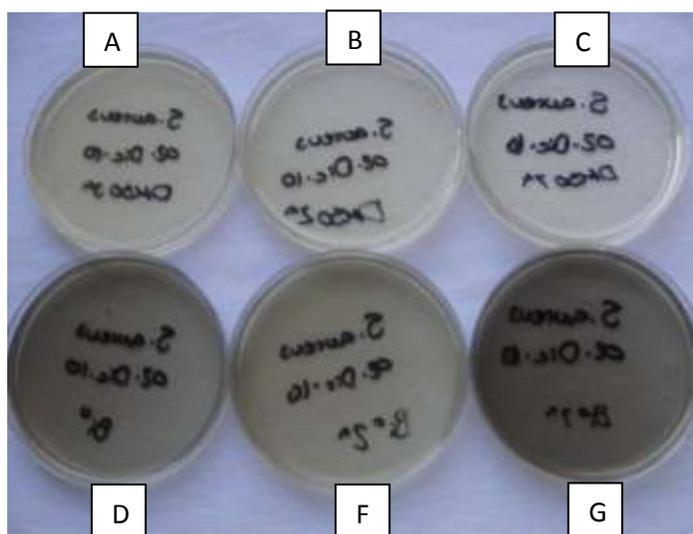


Figura 17. Ensayo de dispersión en agar con NanoBi⁰ (D-G) y DMSO (A-C) donde se utilizó la CMI de cada compuesto y tres concentraciones inferiores. No se observa ningún crecimiento bacteriano.

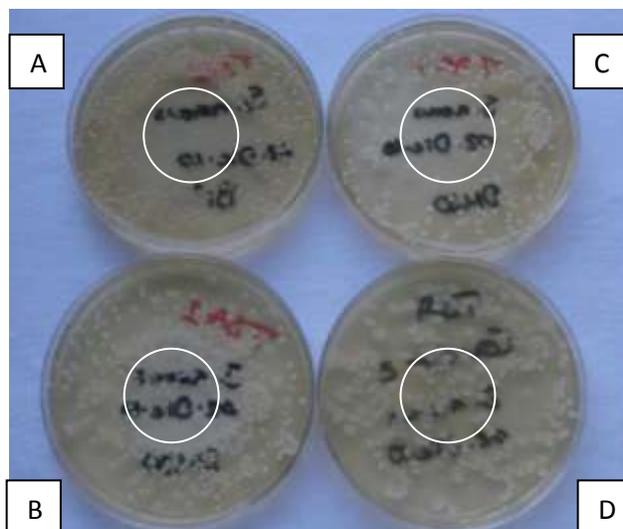


Figura 18. Ensayo de dispersión centrado en agar con NanoBi⁰ (A y B) y DMSO (C y D) donde se utilizó el compuesto localizado únicamente en el centro del agar (círculo céntrico).

En los ensayos de dispersión en agar con los compuestos centrados, se pudo observar una clara inhibición con ambos compuestos (NanoBi⁰ y DMSO), así como crecimiento microbiano rodeando el halo inhibitorio (**Figura 18**).

Ensayo microbiológico por difusión en agar (C)

Exp 5. En el ensayo microbiológico con los metales en bloque, no se observó susceptibilidad antimicrobiana con ningún elemento utilizado, para ambas cepas bacterianas. En la **Figura 19** se observa un clavo de Bismuto metálico y un bloque de aluminio, los cuales no muestran halo de inhibición a su alrededor. Mientras que el disco con ciprofloxacino mostró una clara inhibición microbiana.

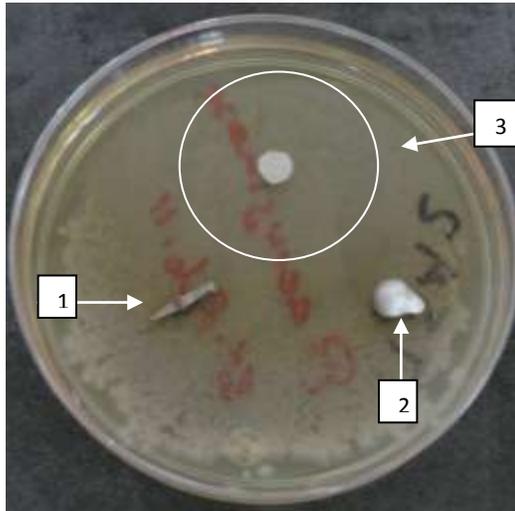


Figura 19. Ensayo de sensibilidad de *P. aeruginosa* a dos elementos metálicos y un antibiótico. Las flechas indican las muestras usadas y el círculo indica la inhibición microbiana.

Clavo de Bismuto (1), bloque de aluminio (2), ciprofloxacino (3).

3.2 Discusión

La actividad antimicrobiana es una propiedad biológica de gran utilidad en los materiales dentales y biomédicos, ya que tiene la capacidad de favorecer la biocompatibilidad entre el material y el organismo, previniendo la formación de depósitos bacterianos asociados a infecciones por contacto con dispositivos biomédicos. Esta propiedad, a su vez aumenta el buen pronóstico en el tratamiento dental y hospitalario. Para reducir el crecimiento microbiano en distintos materiales, se ha optado por estudiar nuevas tecnologías, utilizando diseños a nano escala de elementos o compuestos conocidos con buen efecto antimicrobiano, como son el Bismuto y la Plata (Cao & Liu, 2010).

En el caso de las NPs, no es claro definir el efecto antimicrobiano por si mismo del nanocompuesto, ya que existen otros factores que afectan la respuesta biológica, como la dispersión homogénea en el medio en que se encuentren (surfactante), su tamaño promedio, forma y las propiedades superficiales de los nanomateriales (Omelia, 1980; Stark et al., 2005). Por ejemplo, diversos reportes han mostrado el efecto que ocasiona el estado de dispersión, en las propiedades antimicrobianas de algunas nanopartículas metálicas y fullerenos, observando que su actividad bactericida disminuye e incluso desaparece, cuando hay formación de cúmulos mayores que dificultan su captación intracelular (Yamakoshi et al., 1999; Stark et al., 2005; Lyon et al., 2005).

Además, se ha reportado que las bacterias, pueden protegerse en contra de la absorción de muchos tipos de nanopartículas, debido a que no cuentan con mecanismos para el transporte de partículas coloidales a través de su pared celular (Moore, 2006) como ocurre en células eucariontes (Lynch et al., 2006; Martin et al., 2006; Rot-

hen-Rutishauser et al., 2006). También refieren que la internalización de NPs de óxido metales está asociada al daño de la pared celular bacteriana (Klabunde et al., 2002, Brayner et al., 2006).

Con la finalidad de obtener información sobre el efecto antimicrobiano de las NPs de Bi, evaluamos en este estudio tres compuestos de Bi nanométricos y uno de Ag (NanoBi⁰, NanoBi₂S₃ y NanoBi₂O₃, NanoAg⁰) sobre ocho especies bacterianas representativas de la flora subgingival de la cavidad oral y en tres cepas asociadas a infecciones nosocomiales.

Efecto antimicrobiano de Bismuto y Nanopartículas de Bismuto

Existe muy poca o nula información respecto al efecto antimicrobiano del Bismuto sobre especies de la cavidad bucal, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos en éste estudio (**Tabla 10**). Sin embargo, las CMI's de los tres nanocompuestos de Bi (de entre 1.02×10^{-4} y 1.28×10^{-3} M), pueden compararse con reportes previos de compuestos tioles (-SH) de Bi (BisBAL), en donde se evaluaron bacterias como *E.coli* y *S. aureus*, bacterias que también fueron utilizadas en nuestro estudio, así como a *H. pylori*, organismo asociado a ulcera péptica (Badireddy et al., 2008; Domenico et al., 1997). Sus resultados muestran CMI's entre 2 y 17×10^{-6} M para éstas especies, demostrando un mayor efecto antimicrobiano con compuestos de Bi disueltos en -SH, que con las NPs de Bi probadas en este estudio para las especies *E. coli* y *S. aureus* ($\sim 6.40 \times 10^{-4}$). Mientras que el Bi(NO₃)₃·5H₂O disuelto en propilenglicol, se obtuvieron concentraciones bactericidas de 3×10^{-3} M para *E.coli*, lo que es

similar al resultado obtenido en este trabajo, cuando evaluamos $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disuelto en DMSO, sobre esta especie bacteriana (1.28×10^{-3} M).

En diversos experimentos de este estudio, fue reproducible el efecto inhibitorio de NanoBi^0 (CMI de 3.20 y 6.40×10^{-4} M) contra bacterias como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*. Considerados patógenos relacionados con la enfermedad periodontal y asociados a infecciones por uso de implantes dentales e incluso, se ha reportado su presencia en depósitos bacterianos, sobre prótesis totales de pacientes edentulos (Socransky & Haffajee, 2005; Sachdeo A, et. al, 2008). También se demostró el efecto bactericida de NanoBi^0 contra *A. israelii*, organismo causante de endometriosis, infección asociada al uso de dispositivos intrauterinos (DIU). Por lo que aún, se puede explorar distintas alternativas de depósito de NanoBi^0 en la superficie de prótesis bucales y dispositivos biomédicos.

Considerando que hasta la fecha, no existe un método microbiológico ideal para la evaluación de NPs, en este trabajo se incluyeron tanto la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por dispersión en agar, como por dispersión en caldo. La CMI obtenida por dispersión en agar de las NanoBi^0 fue $< 3.20 \times 10^{-4}$ M y por dispersión en caldo fue de 1.28×10^{-3} M sobre *S. aureus*, mostrando que en un medio gelificado las NanoBi^0 tienen mayor efectividad bactericida comparado con el método de dispersión en caldo enriquecido (electrolitos y proteínas disueltas). Esto posiblemente es debido a una mayor estabilidad y distribución de la dispersión coloidal en el medio de agar, o posiblemente como se ha reportado con anterioridad, en medios líquidos sufre “neutralización” de su superficie activa por asociación de las NPs con otras moléculas, sin ocasionar daño evidente a las células (Brown et al., 2000; Lead et al., 2009).

Por otro lado el método por difusión en agar del Bi en bulto, cuando fue colocado en contacto con *P. aeruginosa*, no tuvo efecto inhibitorio sobre la especie, ya que no mostró halo de inhibición. Este resultado reafirma la importancia de la solubilidad del compuesto en el efecto antimicrobiano

Se ha reportado la acción biológica que posee el Bi y el citrato de Bismuto con arqueas metanogénicas, como *Methanosarcina barkeri* y en especies intestinales, ya que estos compuestos son biotransformados por su gran afinidad a los grupos -SH, sin ocasionar daño celular. Por otra parte, el efecto bactericida de las sales de Bismuto se ha asociado principalmente a su naturaleza catiónica (Coudron & Stratton, 1995, Michalke et al., 2002). Considerando lo anterior, las variaciones en los resultados obtenidos en este estudio nos refieren que el efecto letal de los materiales nanométricos de Bi sobre las bacterias expuestas, implica, además de las propiedades físicas de las NPs antes mencionadas y del compuesto sulfurado en el que se dispersan, su interacción con el metabolismo bacteriano, que explicaría la diferencia en la susceptibilidad entre las diferentes especies que fueron evaluadas.

Efecto antimicrobiano de Nanopartículas de Plata

Los informes sobre las propiedades bactericidas de NPs de Ag⁰, se han enfocado principalmente en la especie *E. coli*. Un estudio reporta la sensibilidad de la Plata nanométrica en concentraciones de entre 50 y 60 µg/mL (~ 1.28 x 10⁻³ M) por método de dispersión en agar, utilizando NPs con tamaño promedio de ~ 12 nm (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). Lo que coincide con los resultados que obtuvimos para esta especie bacteriana (~ 1.28 x 10⁻³ M) por método de dispersión en caldo, utilizando NPs de

~ 4 nm. Por otra parte, todas las demás especies aquí evaluadas, tuvieron CMI's con NanoAg⁰ de entre 1.25×10^{-6} y 6.40×10^{-4} M, que equivalen a 0.129 y 65.8 µg/mL. Estos resultados nos dan mayor referencia del efecto bactericida que puede tener las NanoAg⁰, entre especies bacterianas de distintos ecosistemas. Otros autores reportan CMI's de NPs de Ag, también en dispersión en agar, de entre 3.3 y 6.6×10^{-9} M para *E.coli* y CMI's $> 33 \times 10^{-9}$ M para *S. aureus* (Kim et al., 2007b). Lo que nos vuelve a sugerir la importancia en la metodología empleada, por las variaciones encontradas entre estos estudios y el nuestro.

Las especies de importancia médica fueron más sensibles a la sal de partida (C₈H₁₅AgO₂) que a las NanoAg⁰. Esta diferencia, confirma la importancia de la presencia de iones metálicos disueltos para obtener un mejor efecto antimicrobiano (Vonberg et al., 2008, Silvestry-Rodriguez et al., 2007). Además del efecto bactericida, también se debe considerar la bioactividad de la Ag en la respuesta bacteriana, ya que se ha reportado biosíntesis bacteriana de partículas nanométricas con este elemento, en especies como *Pseudomonas stutzeri* (Klaus et al., 1999). Esto es tomado en cuenta, por que hemos observado mayor efecto antimicrobiano con la sal de partida que con los compuestos nanométricos. Lo que nos sugiere, al igual que con el Bi, que puede existir alguna interacción biológica que no afecta a las bacterias, así como menor solubilidad y toxicidad de los cúmulos nanométricos, que la sal disuelta.

Finalmente con base en estos resultados, confirmamos que los tres nanocompuestos de Bi, el Bi(NO₃)₃.5H₂O y el Bi en bloque poseen menor efecto inhibitorio si los comparamos con los resultados obtenidos de las NPs de Ag o C₈H₁₅AgO₂.

Además, las dosis efectivas bactericidas de los coloides de Bi, son mayores a las dosis críticas para el organismo (100 µg/L) (Phillips et al., 2001, Islek et al., 2001).

3.3 Conclusiones

En este estudio evaluamos por diferentes metodologías la susceptibilidad antimicrobiana de tres nanocompuestos de bismuto: NanoBi⁰, NanoBi₂O₃, NanoBi₂S₃ y uno de plata: NanoAg⁰, en diversas especies bacterianas de la cavidad oral y en tres bacterias de importancia médica. Con los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Los diferentes nanocompuestos de Bismuto tienen efecto antimicrobiano tanto para bacterias colonizadoras de la cavidad oral, piel, mucosas y aparato gastrointestinal, así como en patógenos oportunistas, en las concentraciones que fueron probadas.
- Las NanoBi₂O₃, fue el compuesto nanométrico de Bismuto más efectivo aquí evaluado, aunque con una potencia más baja cuando es comparado con las NPs de Ag⁰.
- No encontramos diferencias en el efecto antibacteriano de los nanocompuestos de Bismuto entre las bacterias Gram-negativas como Gram-positivas.
- Las bacterias crecidas en condiciones anaerobias fueron más susceptibles a todos los compuestos evaluados, comparándolos con las bacterias crecidas en medio aerobio.
- Utilizando el método de dispersión en agar se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias menores a las alcanzadas en dispersión por caldo.

3.4 Perspectiva

Lo que hasta aquí hemos podido analizar, nos sugiere que al observar mayor efecto antimicrobiano con las sales evaluadas que con las NPs, hay menor captación de nanocompuestos por parte de la bacteria, que de sales disueltas. De ser cierto, las NPs de Bismuto no estarían causando daño en la pared celular, lo que podría confirmarse en estudios posteriores con métodos de alta resolución como TEM-HR o AFM, para verificar la agregación de las NPs y la estabilidad o daño de la pared celular, así también incluir mediciones de análisis elemental, SEM o diferentes técnicas espectroscópicas, para evaluar el medio de cultivo con nanopartículas y sales, y obtener información sobre su interacción con el medio bacteriano. Sin perder de vista los alcances de este trabajo, los resultados muestran el efecto inhibitorio de los nanocompuestos tanto de Bismuto como de Plata en diversas especies bacterianas anaerobias y aerobias. A su vez, indican la importancia del agente dispersante que mantiene la homogeneidad de las nanopartículas y de la interacción que ejerce en el efecto antimicrobiano.

La búsqueda de aplicaciones de diversos nanomateriales, involucra un desafío en los métodos de síntesis, estándares de estudios biológicos y conocimiento profundo tanto de sus propiedades fisicoquímicas-biológicas en un ambiente controlado, así como en su exposición, transformación, desecho y acumulación en cualquier ecosistema donde se encuentren. Actualmente nos encontramos con un área rica en potenciales, que exige un análisis amplio de cada comportamiento, tanto de la materia inerte como su interacción con la materia viva. Por lo que, la dificultad con que nos encontramos durante la realización de esta tesis también ha sido expresada en otras áreas

de conocimiento (citotoxicidad, genotoxicidad y ecotoxicidad), lo que ha llevado a la conclusión de proponer nuevos métodos de síntesis o procesamiento de nanocompuestos, donde se pueda controlar por completo el tamaño, forma y volumen de partículas, usando un medio dispersante que evite la agregación o aglomeración del nanomaterial para que puedan interactuar oportunamente con los modelos biológicos experimentales, y obtener resultados claros y reproducibles a cualquier escala de producción. Así tenemos, que el uso clínico de las NanoBi, aún se encuentra en expectativa limitada y dependerá de posteriores estudios que demuestren las propiedades benéficas que estos materiales puedan aportar.

3.3 Referencias Bibliográficas y Electrónicas

- Adlakha-Hutcheon, G., Khaydarov, R., Korenstein, R., Varma, R., Vaseashta, A., Stamm, H. & Abdel-Mottaleb, M. (2009). Nanomaterials, Nanotechnology Applications, Consumer Products, and Benefits. *Nanomaterials: Risks and Benefits*, **3**, 195-207.
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J. & Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **233**, 404-410.
- Ahn, S. J., Lim, B. S. & Lee, S. J. (2007). Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **131**, 736-741.
- Argun, A. A., Aubert, P. H., Thompson, B. C., Schwendeman, I., Gaupp, C. L., Hwang, J., Pinto, N. J., Tanner, D. B., MacDiarmid, A. G. & Reynolds, J. R. (2004). Multicolored electrochromism polymers: Structures and devices. *Chemistry of Materials*, **16**, 4401-4412.
- Atack, N. E., Sandy, J. R. & Addy, M. (1996). Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. *Journal of Periodontology*, **67**, 78-85.
- Badireddy, A. R., Korpil, B. R., Chellam, S., Gassman, P. L., Engelhard, M. H., Lea, A. S. & Rosso, K. M. (2008). Spectroscopic Characterization of Extracellular Polymeric Substances from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*: Suppression Using Sub-Inhibitory Concentrations of Bismuth Thiols. *Biomacromolecules*, **9**, 3079-3089.
- Baiocco, P., Ilari, A., Ceci, P., Orsini, S., Gramiccia, M., Di Muccio, T. & Colotti, G. (2011). Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania infantum* Proliferation. *Acs Medicinal Chemistry Letters*, **2**, 230-233.
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J. & Shah, S. I. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **5**, 244-249.
- Balows, A. (1992) *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York: Springer.
- Beikler, T. & Flemmig, T. F. (2011). Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontology 2000*, **55**, 87-103.
- Berke, H. (2007). The invention of blue and purple pigments in ancient times. *Chemical Society Reviews*, **36**, 15-30.
- Beyth, N., Domb, A. J. & Weiss, E. I. (2007). An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *Journal of Dentistry*, **35**, 201-206.
- Bisrat, Y., Luo, Z. P., Davis, D. & Lagoudas, D. (2007). Highly ordered uniform single-crystal Bi nanowires: fabrication and characterization. *Nanotechnology*, **18**, 395601 (6pp)

- Boeckh, C., Schumacher, E., Podbielski, A. & Haller, B. (2002). Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. *Caries Research*, **36**, 101-107.
- Boivin, J. C. & Mairesse, G. (1998). Recent material developments in fast oxide ion conductors. *Chemistry of Materials* **10**, 2870-2888.
- Bonnemann, H. & Richards, R. M. (2001). Nanoscopic metal particles - Synthetic methods and potential applications. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2001**, 2455-2480.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F. & Fievet, F. (2006). Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters* **6**, 866-870.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R. & Staley, J. T. (2005) *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, **2**, .
- Briand, G. G. & Burford, N. (1999). Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chemical Reviews*, **99**, 2601-2658.
- Brogan, A. P., Verghese, J., Widger, W. R. & Kohn, H. (2005). Bismuth-dithiol inhibition of the Escherichia coli rho transcription termination factor. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**, 841-851.
- Brown, D. M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W. & Donaldson, K. (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occupational and Environmental Medicine*, **57**, 685-691.
- Bueno, C. E., Zeferino, E. G., Manhaes, L. R., Jr., Rocha, D. G., Cunha, R. S. & De Martin, A. S. (2009). Study of the bismuth oxide concentration required to provide Portland cement with adequate radiopacity for endodontic use. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **107**, 65-69.
- Cal, C. F., Bakowsky, U., Rytting, E., Schaper, A. K. & Kissel, T. (2008). Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **69**, 31-42.
- Camilleri, J. (2008). Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* **41**, 408-417.
- Cao, H. & Liu, X. (2010). Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **2**, 670-684.
- Casado, P. L., Otazu, I. B., Balduino, A., de Mello, W., Barboza, E. P. & Duarte, M. E. (2011). Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. *Implant Dentistry*, **20**, 226-235.
- Case, T. W. (1917). Notes on the change of resistance of certain substances in light. *Physical Review* **9**, 305-310.

- Chavez de Paz, L. E. (2007). Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of Endodontics*, **33**, 652-662.
- Chen, R., So, M. H., Yang, J., Deng, F., Che, C. M. & Sun, H. Z. (2006). Fabrication of bismuth subcarbonate nanotube arrays from bismuth citrate. *Chemical Communications*, 2265-2267
- Cheng, H. & Hu, F. L. (2009). Furazolidone, amoxicillin, bismuth and rabeprazole quadruple rescue therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, **15**, 860-864.
- Collart, D., Mehrabi, S., Robinson, L., Kepner, B. & Mintz, E. A. (2006). Efficacy of oligodynamic metals in the control of bacteria growth in humidifier water tanks and mist droplets. *Journal of Water and Health* **4**, 149-156.
- Cook, G. S., Costerton, J. W. & Lamont, R. J. (1998). Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of Periodontal Research* **33**, 323-327.
- Costerton, J. W. (2005). Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 7-11.
- Costerton, J. W., Cook, G. S. & Lamont, R. J. (1999) The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: *Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease*, (eds.) N. H. Newman & M. Wilson. London: Eastman Dental Institute, University College London, 5-14.
- Coudron, P. E. & Stratton, C. W. (1995). Factors Affecting Growth and Susceptibility Testing of *Helicobacter-Pylori* in Liquid-Media. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1028-1030.
- Coutinho-Filho, T., De-Deus, G., Klein, L., Manera, G., Peixoto, C. & Gurgel-Filho, E. D. (2008). Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **106**, 69-77.
- Dang, Y., Zhang, Y. L., Fan, L., Chen, H. C. & Roco, M. C. (2010). Trends in worldwide nanotechnology patent applications: 1991 to 2008. *Journal of Nanoparticle Research*, **12**, 687-706.
- Darouiche, R. O. (1999). Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses. *Clinical Infectious Diseases*, **29**, 1371-1377.
- Deb, S., Abdulghani, S. & Behiri, J. C. (2002). Radiopacity in bone cements using an organo-bismuth compound. *Biomaterials* **23**, 3387-3393.
- Del Rio, M. S., Martinetto, P., Reyes-Valerio, C., Dooryhee, E. & Suarez, M. (2006). Synthesis and acid resistance of maya blue pigment. *Archaeometry* **48**, 115-130.
- Delgado, R. J., Gasparoto, T. H., Sipert, C. R., Pinheiro, C. R., Moraes, I. G., Garcia, R. B., Bramante, C. M., Campanelli, A. P. & Bernardineli, N. (2010). Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, **36**, 1389-1393.

- Diaz, D. & Geonel, R. G. (2002). Metallic nanoparticles from spontaneous reduction of silver(I) in DMSO. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **224**, U352-U352.
- Domenico, P., Baldassarri, L., Schoch, P. E., Kaehler, K., Sasatsu, M. & Cunha, B. A. (2001). Activities of bismuth thiols against staphylococci and staphylococcal biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1417-1421.
- Domenico, P., Reich, J., Madonia, W. & Cunha, B. A. (1996). Resistance to bismuth among Gram-negative bacteria is dependent upon iron and its uptake. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **38**, 1031-1040.
- Domenico, P., Salo, R. J., Novick, S. G., Schoch, P. E., Van Horn, K. & Cunha, B. A. (1997). Enhancement of bismuth antibacterial activity with lipophilic thiol chelators. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1697-1703.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 881-890.
- Edelstein, R. L., Tamanaha, C. R., Sheehan, P. E., Miller, M. M., Baselt, D. R., Whitman, L. J. & Colton, R. J. (2000). The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 805-813.
- Ehrlich, G. D., Hu F. Z., Lin Q., Costerton J. W., Post, J. C. (2004). Intelligent implants to battle biofilms: self-diagnosing, self-treating, self-monitoring artificial joints could combat post-implant infections attributable to biofilms. *ASM News*, **70**, 127-133.
- Eiken, M. (1958). Studies on an anaerobic, rodshaped, gram-negative microorganism: *Bacteroides corrodens* n. sp. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **43**, 404-416.
- Esteban, J. & Cordero-Ampuero, J. (2011). Treatment of prosthetic osteoarticular infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **12**, 899-912.
- Fabrega, J., Renshaw, J. C. & Lead, J. R. (2009). Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environmental Science & Technology* **43**, 9004-9009.
- Fang, X. S., Bando, Y., Gautam, U. K., Zhai, T. Y., Gradecak, S. & Golberg, D. (2009). Heterostructures and superlattices in one-dimensional nanoscale semiconductors. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 5683-5689.
- Flores, C. Y., Diaz, C., Rubert, A., Benitez, G. A., Moreno, M. S., Fernandez Lorenzo de Mele, M. A., Salvarezza, R. C., Schilardi, P. L. & Vericat, C. (2010). Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO₂ surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Colloid and Interface Science*, **350**, 402-408.
- Fournier, A., Payant, L. & Bouclin, R. (1998). Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **114**, 414-417.
- Friberg, L. (1986) *Handbook of the Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

- Genaro, A. R. (1998) *Remington Farmacia*. Buenos Aires.
- Gibbins, B. (2003). The antimicrobial benefits of silver and the relevance of microlattice technology. *Ostomy Wound Management*, **49**, Suppl: 4-7.
- Gibbons, R. & Nygaard, M. (1970). Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Archives of Oral Biology*, **15**, 1397-1400.
- Gibbons, R. J. (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *Journal of Dental Research*, **68**, 750-760.
- Gibbons, R. J., Hay, D. I., Cisar, J. O. & Clark, W. B. (1988). Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infection and Immunity*, **56**, 2990-2993.
- Gibbons, R. J., Hay, D. I. & Schlesinger, D. H. (1991). Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infection and Immunity*, **59**, 2948-2954.
- Gonzalez-Cabezas, C. (2010) The chemistry of caries: remineralization and demineralization events with direct clinical relevance. *Dental Clinics of North America*, **54**, 469-478.
- Grossner-Schreiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Dorfer, C., Wenderoth, D. F. & Ott, S. J. (2009). Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 817-826.
- Guo, H. J. & Wang, J. D. (2009). Bacterial biofilm on the apical external root surfaces of human teeth associated with chronic periradicular lesions. *Beijing Da Xue Xue Bao* **41**, 571-574.
- Hambidge, A. (2001). Reviewing efficacy of alternative water treatment techniques. *Health Estate* **55**, 23-25.
- Hampel, C. A. (1973) *The Encyclopedia of Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Harwig, H. A. & Gerards, A. G. (1978). Electrical-Properties of Alpha, Beta, Gamma and Delta Phases of Bismuth Sesquioxide. *Journal of Solid State Chemistry* **26**, 265-274.
- Hetrick, E. M. & Schoenfisch, M. H. (2006). Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*, **35**, 780-789.
- Hodes, G., Manassen, J. & Cahen, D. (1976). Photoelectrochemical Energy-Conversion and Storage Using Polycrystalline Chalcogenide Electrodes. *Nature* **261**, 403-404.
- Hofmann, W. (1935). The structure of the minerals of the animonite group. *Zeitschrift Fur Kristallographie* **86**, 225-245.
- Holm, P. (1950). Studies on the Aetiology of Human Actinomycosis .1. The Other Microbes of Actinomycosis and Their Importance. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica* **27**, 736-751.

- Huang, C. T. & Stewart, P. S. (1999). Reduction of polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by bismuth dimercaprol (BisBAL) treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **44**, 601-605.
- Huang, L. (2011). A new mechanistic growth model for simultaneous determination of lag phase duration and exponential growth rate and a new Belehradek-type model for evaluating the effect of temperature on growth rate. *Food Microbiology*, **28**, 770-776.
- Islek, I., Uysal, S., Gok, F., Dundaroz, R. & Kucukoduk, S. (2001). Reversible nephrotoxicity after overdose of colloidal bismuth subcitrate. *Pediatric Nephrology*, **16**, 510-514.
- Jenkinson, H. & Lamont, R. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **8**, 175-200.
- Jenkinson, H. F. & Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, **13**, 589-595.
- Jin, H., Hong, B., Kakar, S. S. & Kang, K. A. (2008). Tumor-specific nano-entities for optical detection and hyperthermic treatment of breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **614**, 275-284.
- Kiley, P. & Holt, S. C. (1980). Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infection and Immunity*, **30**, 862-873.
- Killedar, V. V., Lokhande, C. D. & Bhosale, C. H. (1996). Preparation and characterization of Bi₂S₃ thin films spray deposited from non-aqueous media. *Thin Solid Films* **289**, 14-16.
- Kim, J. J., Moon, H. J., Lim, B. S., Lee, Y. K., Rhee, S. H. & Yang, H. C. (2007a). The effect of nanofiller on the opacity of experimental composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, **80**, 332-338.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H. & Cho, M. H. (2007b). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, **3**, 95-101.
- Klabunde, K. J., Stoimenov, P. K., Klinger, R. L. & Marchin, G. L. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, **18**, 6679-6686.
- Klasen, H. J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, **26**, 117-130.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E. & Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 13611-13614.
- Klein, J. (2007). Probing the interactions of proteins and nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 2029-2030.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich

- AW. (2010) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* **2010**,15 (41).
- Kolenbrander, P. E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual Review of Microbiology*, **54**, 413-437.
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Clemans, D., Whittaker, C. & Klier, C. (1999) Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: *Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease*, (eds.) N. H. Newman & M. Wilson,. London: Eastman Dental Institute, University College London. 171-186
- Konstantatos, G., Levina, L., Tang, J. & Sargent, E. H. (2008). Sensitive Solution-Processed Bi2S3 Nanocrystalline Photodetectors. *Nano Letters*, **8**, 4002-4006.
- Koper, O. B., Klabunde, J. S., Marchin, G. L., Klabunde, K. J., Stoimenov, P. & Bohra, L. (2002). Nanoscale powders and formulations with biocidal activity toward spores and vegetative cells of bacillus species, viruses, and toxins. *Current Microbiology*, **44**, 49-55.
- Kricheldorf, H. R. (2009). Syntheses of biodegradable and biocompatible polymers by means of bismuth catalysts. *Chemical Reviews*, **109**, 5579-5594.
- Lambert, J. R. (1991). Clinical indications and efficacy of colloidal bismuth subcitrate. *Scandinavian Journal of Gastroenterology-Supplement*, **185**, 13-21.
- Landsdown, A. B. & Williams, A. (2007). Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. *Journal of Wound Care* **16**, 15-19.
- Lang, L. A., Mattie, P. A. & Rawis, H. R. (2000). The effect of triphenylbismuth on the radiopacity and performance properties of compression- and injection-molded denture resins. *Journal of Prosthodontics*, **9**, 23-29.
- Lansdown, A. B. (2010). A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences*, **2010**, 910686.
- Lead, J. R., Fabrega, J., Fawcett, S. R. & Renshaw, J. C. (2009). Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* **43**, 7285-7290.
- Lewis, R. J. (2007) Hawley's Condensed Chemical Dictionary. In: *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, (ed.) Wiley-Interscience, Fifteenth Edition edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Li, C. X., O'Halloran, K. P., Ma, H. Y. & Shi, S. L. (2009). Multifunctional Multilayer Films Containing Polyoxometalates and Bismuth Oxide Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 8043-8048.
- Listgarten, M. (1999). Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: *Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Eastman Dental Institute, University College London*, 187-210.

- Liu, X. Y., Zeng, J. H., Zhang, S. Y., Zheng, R. B., Liu, X. M. & Qian, Y. T. (2003). Novel bismuth nanotube arrays synthesized by solvothermal method. *Chemical Physics Letters* **374**, 348-352.
- Lu, W. & Lieber, C. M. (2007). Nanoelectronics from the bottom up. *Nature Materials* **6**, 841-850.
- Lv, K. L., Zhang, J. X., Meng, X. C. & Li, X. Y. (2007). Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries. *Key Engineering Materials*, **330-332**, 267-270.
- Lynch, I., Dawson, K. A. & Linse, S. (2006). Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Science's STKE*, **2006**, pe14.
- Lyon, D. Y., Fortner, J. D., Sayes, C. M., Colvin, V. L. & Hughe, J. B. (2005). Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C60 water suspension. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 2757-2762.
- Mandell, R. L., Tripodi, L. S., Savitt, E., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (1986). The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, **57**, 94-99.
- Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. (1995). Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **15**, 169-175.
- Martin, D. J., Smart, S. K., Cassady, A. I. & Lu, G. Q. (2006). The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*, **44**, 1034-1047.
- Michalke, K., Meyer, J., Hirner, A. V. & Hensel, R. (2002). Biomethylation of bismuth by the methanogen *Methanobacterium formicicum*. *Applied Organometallic Chemistry* **16**, 221-227.
- Miller, B. & Heller, A. (1976). Semiconductor Liquid Junction Solar-Cells Based on Anodic Sulfide Films. *Nature* **262**, 680-681.
- Mohammadi, Z. & Abbott, P. V. (2009). Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Australian Endodontic Journal*, **35**, 131-139.
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, **32**, 967-976.
- Morrier, J. J., Suchett-Kaye, G., Nguyen, D., Rocca, J. P., Blanc-Benon, J. & Barsotti, O. (1998). Antimicrobial activity of amalgams, alloys and their elements and phases. *Dental Materials* **14**, 150-157.
- Mueller, A. A., Saldamli, B., Stubinger, S., Walter, C., Fluckiger, U., Merlo, A., Schwenzer-Zimmerer, K., Zeilhofer, H. F. & Zimmerer, S. (2009). Oral bacterial cultures in non-traumatic brain abscesses: results of a first-line study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **107**, 469-476.
- Murphy, C. J. (2002). Materials science. Nanocubes and nanoboxes. *Science* **298**, 2139-2141.

- Nakao, M., Tada, M., Tsuchimori, K. & Uekata, M. (1995). Antibacterial properties of lansoprazole alone and in combination with antimicrobial agents against *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14**, 391-399.
- Naranjo, A. A., Trivino, M. L., Jaramillo, A., Betancourth, M. & Botero, J. E. (2006). Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *American Journal of Orthodontic and Dentofacial Orthopedics* **130**, 275 e217-222.
- NCCLS (2001). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Fifth Edition. *NCCLS document M11-A5*[ISBN 1-56238-429-5] **21**, 45.
- Nomoto, R., Komoriyama, M., McCabe, J. F. & Hirano, S. (2004). Effect of mixing method on the porosity of encapsulated glass ionomer cement. *Dental Materials* **20**, 972-978.
- Novick, A. (1955). Growth of bacteria. *Annual Review of Microbiology* **9**, 97-110.
- Nowack, B. & Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* **150**, 5-22.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. & Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, **113**, 823-839.
- Omelia, C. R. (1980). Aquasols - the Behavior of Small Particles in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, **14**, 1052-1060.
- Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 1712-1720.
- Pamphlett, R., Danscher, G., Rungby, J. & Stoltenberg, M. (2000a). Tissue uptake of bismuth from shotgun pellets. *Environmental Research*, **82**, 258-262.
- Pamphlett, R., Stoltenberg, M., Rungby, J. & Danscher, G. (2000b). Uptake of bismuth in motor neurons of mice after single oral doses of bismuth compounds. *Neurotoxicology and Teratology*, **22**, 559-563.
- Pan, D., Carauthers, S. D., Chen, J., Winter, P. M., SenPan, A., Schmieder, A. H., Wickline, S. A. & Lanza, G. M. (2010). Nanomedicine strategies for molecular targets with MRI and optical imaging. *Future Medicinal Chemistry*, **2**, 471-490.
- Panacek, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecna, T. & Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 16248-16253.
- Parahitiyawa, N. B., Jin, L. J., Leung, W. K., Yam, W. C. & Samaranayake, L. P. (2009). Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews*, **22**, 46-64.

- 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.
- Percival, S. L., Bowler, P. G. & Russell, D. (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection*, **60**, 1-7.
- Phillips, R. H., Whitehead, M. W., Doig, L. A., Sieniawska, C. E., Delves, H. T., Thompson, R. P. & Powell, J. J. (2001). Is eradication of *Helicobacter pylori* with colloidal bismuth subcitrate quadruple therapy safe? *Helicobacter* **6**, 151-156.
- Pramanik, P. & Bhattacharya, R. N. (1980). A Chemical Method for Deposition of Thin-Film of Bi₂S₃. *Journal of the Electrochemical Society* **127**, 2087-2087.
- Preshaw, P. M., Seymour, R. A. & Heasman, P. A. (2004). Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dental Update*, **31**, 570-572, 574-578.
- Puia, S. A., Rey, E. A. R. & Bozzini, C. E. (2003). Clinical evaluation of bismuth subgallate as a local hemostatic agent in dental surgery on patients under chronic anticoagulant therapy. *Journal of Dental Research* **82**, 45-45.
- Rabin, O., Perez, J. M., Grimm, J., Wojtkiewicz, G. & Weissleder, R. (2006). An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nature Materials* **5**, 118-122.
- Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, **27**, 76-83.
- Rawls, H. R., Marshall, M. V., Cardenas, H. L., Bhagat, H. R. & Cabasso, I. (1992). Cytotoxicity Evaluation of a New Radiopaque Resin Additive Triphenyl Bismuth. *Dental Materials* **8**, 54-59.
- Robert, P. (1950). Astonishingly rapid healing of a severe ulcerating bismuth stomatitis following successful penicillin therapy of fusospirillary superinfection. *Dermatologica* **101**, 269-270.
- Rohr, O. (2002). Bismuth - the new ecologically green metal for modern lubricating engineering. *Industrial Lubrication and Tribology* **54**, 153-164.
- Rokkas, T. & Sladen, G. E. (1988). Bismuth: effects on gastritis and peptic ulcer. *Scandinavian Journal of Gastroenterology-Supplement*, **142**, 82-86.
- Rothen-Rutishauser, B. M., Schurch, S., Haenni, B., Kapp, N. & Gehr, P. (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental Science & Technology* **40**, 4353-4359.
- Roveri, N., Battistella, E., Bianchi, C. L., Foltran, I., Foresti, E., Iafisco, M., Lelli, M., Naldoni, A., Palazzo, B. & Rimondini, L. (2009). Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. *Journal of Nanomaterials*, **2009**, 746383.

- Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. (2008). Biofilms in the edentulous oral cavity. *Journal of Prosthodontics*, **5**, 348-56.
- Sadler, P. J., Li, H. Y. & Sun, H. Z. (1999). Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coordination Chemistry Reviews* **186**, 689-709.
- Saku, S., Kotake, H., Scougall-Vilchis, R. J., Ohashi, S., Hotta, M., Horiuchi, S., Hamada, K., Asaoka, K., Tanaka, E. & Yamamoto, K. (2010). Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. *Dental Materials Journal*, **29**, 193-198.
- Saxton, C. (1973). Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. *Caries Research*, **7**, 102-119.
- Scannapieco, F. A. (1994). Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **5**, 203-248.
- Schindler, R., Heemann, U., Haug, U., Stoelck, B., Karatas, A., Pohle, C., Deppisch, R., Beck, W. & Hollenbeck, M. (2010). Bismuth coating of non-tunneled haemodialysis catheters reduces bacterial colonization: a randomized controlled trial. *Nephrology Dialysis Transplantations*, **25**, 2651-2656.
- Seven, N., Ayyildiz, A. & Kirzioglu, Z. (1989). The characteristics of antibacterial root canal-filling materials. *Mikrobiyol Bul*, **23**, 361-368.
- Severi, C., Abdullahi, M., Tari, R., Vannella, L., Marcheggiano, A., Capoccia, D., Leonetti, F., Osborn, J. & Annibale, B. (2009). High efficacy of bismuth subcitrate for Helicobacter pylori eradication in pangastritis. *Digestive and Liver Disease*, **41**, 555-558.
- Sharpe, J. L. & Williams, P. A. (2004). Secondary bismuth and molybdenum minerals from Kingsgate, New England district of New South Wales. *Australian Journal of Mineralogy* **10**.
- Silvestry-Rodriguez, N., Bright, K. R., Uhlmann, D. R., Slack, D. C. & Gerba, C. P. (2007). Inactivation of Pseudomonas aeruginosa and Aeromonas hydrophila by silver in tap water. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **42**, 1579-1584.
- Slots, J. & Taubman, M. A. (1992) *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. U S A: Mosby, pp. 649.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, **28**, 12-55.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, **38**, 135-187.
- Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, **275**, 177-182.

- Spann, C. T., Tutrone, W. D., Weinberg, J. M., Scheinfeld, N. & Ross, B. (2003). Topical antibacterial agents for wound care: a primer. *Dermatological Surgery*, **29**, 620-626.
- Stark, W. J., Limbach, L. K., Li, Y. C., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M. & Gunther, D. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science and Technology* **39**, 9370-9376.
- Stern, E., Klemic, J. F., Routenberg, D. A., Wyrembak, P. N., Turner-Evans, D. B., Hamilton, A. D., LaVan, D. A., Fahmy, T. M. & Reed, M. A. (2007). Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires. *Nature*, **445**, 519-522.
- Stern, S. T. & McNeil, S. E. (2008). Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological Sciences*, **101**, 4-21.
- Stoltenberg, M. & Danscher, G. (2000). Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections. *Histochemical Journal*, **32**, 645-652.
- Stoltenberg, M., Danscher, G., Pamphlett, R., Christensen, M. M. & Rungby, J. (2000). Histochemical tracing of bismuth in testis from rats exposed intraperitoneally to bismuth subnitrate. *Reproductive Toxicology*, **14**, 65-71.
- Stoltenberg, M., Larsen, A., Zhao, M., Danscher, G. & Brunk, U. T. (2002). Bismuth-induced lysosomal rupture in J774 cells. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, **110**, 396-402.
- Stoltenberg, M., Schionning, J. D. & Danscher, G. (2001). Retrograde axonal transport of bismuth: an autometallographic study. *Acta of Neuropathology*, **101**, 123-128.
- 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.
- Sun, Y. & Xia, Y. (2002). Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, **298**, 2176-2179.
- Taylor, E. A. O. D. (1950). A convenient demonstration of diamagnetism. *Journal of Chemical Education*, **27**, 457.
- Theilade, E., Theilade, J. & Mikkelsen, L. (1982). Microbiological studies on early dentogingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *Journal of Periodontal Research*, **17**, 12-25.
- Thurman, R. B. & Gerba, C. P. (1988). The Molecular Mechanisms of Copper and Silver Ion Disinfection of Bacteria and Viruses. *Critical Reviews in Environmental Control* **18**, 295-315.

- Tomsia, A. P., Launey, M. E., Lee, J. S., Mankani, M. H., Wegst, U. G. K. & Saiz, E. (2011). Nanotechnology Approaches to Improve Dental Implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **26**, 25-44.
- Vega-Gonzalez, M. & Bokhimi, X. (2007). Atomic distribution and morphology of colloidal particles precursors of bismuthinite. *Journal of Physical Chemistry C* **111**, 188-193.
- Velasco, D., Diaz, D., Zumeta, I., Santiago-Jacinto, P., Castillo, S. E., Rendon, L. (en revisión). Soft Chemistry Synthesis of stable Zero-valent Bismuth nanoparticles.
- Vonberg, R. P., Sohr, D., Bruderek, J. & Gastmeier, P. (2008). Impact of a silver layer on the membrane of tap water filters on the microbiological quality of filtered water. *BMC Infectious Diseases* **8**, 133.
- Wagner, K. W., Schon, R., Schumacher, M., Schmelzeisen, R. & Schulze, D. (2006). Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **102**, e21-23.
- Wagstaff, A. J., Benfield, P. & Monk, J. P. (1988). Colloidal Bismuth Subcitrate - a Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Its Therapeutic Use in Peptic-Ulcer Disease. *Drugs* **36**, 132-157.
- Wang, D. B., Shao, M. W., Yu, D. B., Li, G. P. & Qian, Y. T. (2002). Polyol-mediated preparation of Bi₂S₃ nanorods. *Journal of Crystal Growth* **243**, 331-335.
- Wang, Y. & Herron, N. (1996). X-ray photoconductive nanocomposites. *Science* **273**, 632-634.
- Weir, E., Lawlor, A., Whelan, A. & Regan, F. (2008). The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. *Analytical* **133**, 835-845.
- Williams, L. & Adams, W. (2007). *Nanotechnology Demystified* 362.
- Winn, W. J., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. & Woods, G. (2005) *Koneman's Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Xie, H., Cook, G. S., Costerton, J. W., Bruce, G., Rose, T. M. & Lamont, R. J. (2000). Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *Journal of Bacteriology* **182**, 7067-7069.
- Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S. & Miyata, N. (1999). Biological activity of photoexcited fullerene. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 50-60.
- Yang, N. & Sun, H. (2007). Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. *Coordination Chemistry Reviews* **251**, 2354-2366.
- Yao, K., Gong, W. W., Hu, Y. F., Liang, X. L., Chen, Q. & Peng, L. M. (2008). Individual Bi₂S₃ nanowire-based room-temperature H₂ sensor. *Journal of Physical Chemistry C* **112**, 8721-8724.

Yu, J. C., Xu, A. W., Zhang, L. Z., Song, R. Q. & Wu, L. (2004). Synthesis and characterization of porous magnesium hydroxide and oxide nanoplates. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 64-70.

Zambon, J. J., DeLuca, C., Slots, J. & Genco, R. J. (1983). Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infection and Immunity*, **40**, 205-212.

Zhang, B., Ye, X. C., Hou, W. Y., Zhao, Y. & Xie, Y. (2006). Biomolecule-assisted synthesis and electrochemical hydrogen storage of Bi₂S₃ flowerlike patterns with well-aligned nanorods. *Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 8978-8985.

<http://www.nanotechproject.org/>; Project on Emerging Nanotechnologies, Consumer Products Inventory (2011). Acceso: marzo 2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; National Center for Biotechnology Information.

<http://www.atcc.org/>; American Type Culture Collection.

<http://depa.pquim.unam.mx/david/index.htm/>; Posgrado de Química UNAM.

<http://inegi.org.mx/>; Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Acceso: mayo 2011.

<http://minerals.usgs.gov/>; Mineral Resources Program.

www.bccresearch.com/; Marker Research Report, Industry Analysis.

<http://pubs.acs.org/>; American Chemical Society, Publications.

<http://www.mindat.org/>; Data on mineral.

<http://www.jstor.org/>; Digital archive of academic journals.

<http://www.cdc.gov/>; Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

Abreviaturas

Ag	Plata
Ag ⁺	Ión plata
Ag ⁰	Plata metálica o cerivalente
Ag ₂ S	Argentita
AgBr	Bromuro de plata
AgCl	Kerargita
AgF	Fluoruro de plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
Au	Oro
Bi	Bismuto
Bi ⁰	Bismuto metálico o cerivalente
Bi ₂ O ₃	Trióxido de bismuto
Bi ₂ S ₃	Sulfuro
Bi ₅ O(OH) ₉ (NO ₃) ₄	Subnitrato de bismuto
Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O	Nitrato de bismuto pentahidratado
Bi ₅ O(OH) ₉ (NO ₃) ₄	Subnitrato de bismuto
BiC ₁₂ H ₁₄ K ₅ O ₁₇	Subcitrato de bismuto coloidal
BiI ₃	Triyoduro de bismuto
BiO ⁺	Ión bismutilo
BiOCl	Oxicloruro de bismuto
BiPMo ₁₂ O ₄₀	Fosfomolibdato de bismuto
C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Ciprofloxacino
C ₁₈ H ₁₅ Bi	Trifenil bismuto
C ₆ H ₅ BiO ₇	Citrato de bismuto
C ₂ H ₆ SO	DMSO
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Citrato de sodio
C ₇ H ₅ BiO ₄	Subsalicilato de bismuto
C ₇ H ₅ BiO ₆	Subgalato de bismuto
C ₈ H ₁₅ AgO ₂	2-etilhexanoato de plata
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Calcio
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMIs	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₃	Ión carbonato
Cu	cobre
EPA	Environmental Protection Agency
Fe	Hierro
Fe ₃ O ₄	
H	Hidrógeno
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
KOH	Hidróxido de potasio
Na ₂ S	Sulfuro de sodio
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NaBiO ₃	Bismutato de sodio

NanoAgCV	Nanopartículas de Plata cerivalente
NanoBiCV	Nanopartículas de Bismuto cerivalente
NanoBi ₂ O ₃	Nanopartículas de Óxido de bismuto
NanoBi ₂ S ₃	Nanopartículas de Sulfuro de bismuto
NCCLS	National Comitee for Clinical Laboratory Standars
NPs	Nanopartículas
OH ⁻	Ión oxhidrilo
Pb	Plomo
-SH	Sulfhidrilo
SiO ₂	Sílice
Ti	Titanio
TiO ₂	Óxido de titanio

Para el desarrollo y difusión de esta tesis se contó con el apoyo de una beca de Maestría de CONACYT y el financiamiento a Congresos nacionales o internacionales, por parte del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud UNAM, del ICyTDF y de la SMCT.

Los avances de este trabajo fueron presentados en los siguientes foros:

Sesión Ordinaria de la IADR, división México, Acapulco Gro. Mayo 2010.

89ª Sesión General de la IADR, en Barcelona, España. Julio 2010, cartel.

XIX International Materials Research Congress IMRC, Cancún Quintana Roo.

Agosto 2010.

Semana de Ciencia y la Innovación 2010, México D.F. Noviembre 2010, cartel.

Sesión Ordinaria de la IADR, división México, Acapulco Guerrero. Mayo 2011.

XX International Materials Research Congress IMRC, Cancún Quintana Roo.

Agosto 2011.

IV International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, Puerto Vallarta

Jalisco. Septiembre 2011.

Publicación

Campos Ibarra V., Acevedo Contreras A., Camacho Carranza R., García Garduño M.V., Vargas Ulloa L. (2011) Nanotecnología, información básica. *Odontología Actual*, **99**, 48-54.

