

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TESIS

**ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN GEL DE NANOPARTÍCULAS
LIPOFÍLICAS DE BISMUTO, CONTRA EL
BIOFILM DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SOBRE HUESO**

POR

ERIKA CECILIA ESPINOSA VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA**

ENERO, 2018

**ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN GEL DE NANOPARTICULAS
LIPOFILICAS DE BISMUTO, CONTRA EL BIOFILM DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SOBRE HUESO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA

Por

ERIKA CECILIA ESPINOSA VILLARREAL

Comité de Examen de Tesis

Dra Norma Cruz Fierro

Presidente

Dr. Claudio Cabral Romero

Secretario

Dr. José Elizondo Elizondo

Vocal

**ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE UN GEL DE NANOPARTICULAS
LIPOFILICAS DE BISMUTO, CONTRA EL BIOFILM DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SOBRE HUESO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN ODONTOLOGÍA AVANZADA

Por

ERIKA CECILIA ESPINOSA VILLARREAL

Dirección de Tesis

Dr. Claudio Cabral Romero

Director de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Co-Director de Tesis

Dr. Gustavo Israel Martínez González

Asesor Estadístico

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo representa un proceso de crecimiento profesional y en primer lugar agradezco a mi familia por el apoyo moral que siempre me han brindado, en especial a mis padres por su incansable esfuerzo en proveer lo más adecuado para nuestra familia, y por enseñarme con ejemplo la importancia de la dedicación y trabajo. De la misma manera, a todas las personas que contribuyeron como apoyo moral en la realización de este trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Claudio Cabral, como asesor de tesis y consejero en el proceso de la realización de este trabajo, por su tiempo, dedicación y su interés en la divulgación de los resultados. Así como la Dra. Osvelia Rodríguez Luis por su disposición y valiosa participación e interés, en el presente trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico para la realización de esta investigación y mis estudios. Y a todos mis profesores de la Maestría en Odontología Avanzada por su contribución a mi formación clínica y académica.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, por ser pilar fundamental de lo que soy, a ustedes mamá y papá. De la misma manera, a mis hermanas, por ser el modelo a seguir más grande e importante que tengo.

A mis maestros que influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas.

A todas esas personas que estuvieron a mi lado previo a la decisión de iniciar este proyecto y durante el tiempo que tomo realizarlo, por permanecer a mi lado y ser roca en momentos difíciles. Así como a las personas que conocí en este proceso, por dejarme aprender cada día de ustedes.

INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Planteamiento del problema.....	5
Justificación.....	6
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	8
Antecedentes.....	16
Material y métodos.....	15
Resultados.....	18
Discusión.....	24
Conclusiones.....	26
Referencias.....	27
Apéndice I.....	30

INDICE DE FIGURAS

Resumen grafico de la metodología empleada.....	17
Caracterización del hidrogel cargado con nanoparticulas Bis BAL...	18
Actividad antimicrobiana del Gel-BisBAL NPs	19
Actividad antibiofilm del Gel-BisBAL NPs	20
Citotoxicidad del Gel-BisBALNPs sobre fibroblastos gingivales humanos.....	22

1. RESUMEN

El aumento en la prevalencia de multirresistencia entre los microorganismos patógenos a los antibióticos comunes, es uno de los principales problemas de la medicina moderna al que nos enfrentamos actualmente, siendo en el ámbito intrahospitalario el sector más afectado por esta problemática. Aun así en odontología no estamos exentos a esta situación, siendo por ejemplo, microorganismos periodontales aislados de pacientes con periodontitis crónica, que son resistentes a los agentes antimicrobianos usualmente utilizados en terapias periodontales que en estos casos resultan inefectivos. El objetivo de este trabajo fue demostrar la efectividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs) sobre la cepa resistente a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA) la cual ha sido aislada dentro de la cavidad oral, en el surco gingival enfermo e infecciones intraconducto. La actividad antimicrobiana fue determinada mediante ensayos de viabilidad celular MTT. Paralelamente se analizó su actividad antibiofilm sobre placas de 96 pozos empleando un modelo de hueso acoplado a microscopía de fluorescencia. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que a una concentración final de 15.6 μM inhibió ms del 60% del crecimiento de MRSA. A una concentración final de 100 μM de las BisBAL NPs el hidrogel inhibió más del 90% del crecimiento microbiano. Empleando esta última concentración de las BisBAL NPs el hidrogel removió el 86% del biofilm formado por MRSA sobre hueso obteniendo idéntico resultado al emplear 20 μM de la Doxiciclina. Finalmente a 100 μM de las BisBAL NPs el hidrogel no mostro toxicidad sobre fibroblastos gingivales humanos, obteniendo 85% de viabilidad celular después de 24h de tratamiento. En su conjunto estos datos muestran que el hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL es una alternativa de bajo costo y segura para combatir las infecciones causadas por MRSA.

2. ABSTRACT

The rise in the prevalence of the antimicrobial multiresistance among pathogenic bacteria to common antibiotics is one of the main problems we encounter now days in modern medicine, being the hospital setting the most affected by this problem. Even in dentistry we are not absent of this situation, for example periodontal pathogens isolated from patients with chronic periodontitis, that are resistant to the antimicrobial agents commonly used in periodontal therapy but in these cases result ineffective. The objective of this work was to demonstrate the antimicrobial and antibiofilm effect of a hydrogel loaded with lipophilic nanoparticles of bismuth (BisBAL NPs) on a methicilin resistant strain of *Staphylococcus aureus* (MRSA) that has been isolated in the oral cavity, in infected gingival groove and root canals. We determined the antimicrobial activity by the cell viability essays MTT. At the same time the antibiofilm activity was analyzed on a 96- well plate, using a bone model read with fluorescent microscopy. About the results gathered, we found that the final concentration of 15.6 μ M inhibited above the 60% of the MRSA growth. At a final concentration of 100 μ M of BisBAL NPs in a hydrogel it inhibited more than the 90% of the microbial growth. Using this last concentration of the BisBAL NPs in Hydrogel, it removed 86% of the biofilm formed with MRSA on bone, this being the exact same result as the one obtained using 20 μ M of Doxycycline. Finally at 100 μ M of BisBAL NPs the hydrogel did not show toxicity on human gingival fibroblast, getting 85% of cell viability after 24h of treatment. All together these data show that a hydrogel loaded with BisBAL NPs is a safe and low cost alternative to fight infections caused by MRSA.

3. INTRODUCCIÓN

El aumento en la prevalencia de multiresistencia entre los microorganismos patógenos a los antibióticos comunes, es uno de los principales problemas de la medicina moderna a nivel mundial incluido México. La resistencia bacteriana, está directamente relacionada al uso desmedido o auto medicado de los antibióticos o al no realizar exámenes de susceptibilidad bacteriana para las enfermedades infecciosas específicas (Verdugo, et al., 2015). En la 4ta conferencia internacional del consenso de MRSA se debate el acenso en resistencia a antibiótico que se consideraban efectivos y la necesidad de aumentar la MIC lo suficiente para evitar esta resistencia (Edwards, et al., 2014), e incluso se recomienda el uso único o concomitante de terapias alternas (Yang et al., 2014). La nanotecnología es una rama actual de la medicina en donde se utilizan materiales con tamaños nanométricos que muestran propiedades que en partículas más grandes del mismo material no muestran (Shelley, 2006). Esta tecnología actualmente se utiliza en odontología para materiales dentales a los que se les busca obtener un resultado agregado al ya existente, como el ionómero de vidrio con nanopartículas de cerámica donde se busca disminuir la tasa de desgaste del material (Najeeb et al., 2016). El uso de esta tecnología en el ámbito biomédico es una alternativa factible, teniendo como posible antibacteriano el bismuto, que es un elemento metálico del grupo VA que en su estado de nanopartícula ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra los patógenos comunes (Hernandez-Delgadillo et al., 2012). El objetivo de este trabajo fue demostrar la efectividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs) sobre la cepa resistente a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA) la cual ha sido aislada dentro de la cavidad oral, en el surco gingival enfermo e infecciones intraconducto. La actividad antimicrobiana fue determinada mediante ensayos de viabilidad celular MTT. Paralelamente se analizó su actividad antibiofilm sobre placas de 96 pozos empleando un modelo de hueso acoplado a microscopía de fluorescencia. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que a una concentración final de 15.6 μM inhibió ms del 60% del crecimiento de MRSA. A una concentración final de 100 μM de las BisBAL NPs el hidrogel inhibió más del 90% del crecimiento microbiano. Empleando esta última concentración de las BisBAL NPs el hidrogel removió el 86% del biofilm formado por MRSA sobre hueso obteniendo idéntico resultado al emplear 20 μM de la Doxiciclina. Finalmente a 100 μM de las BisBAL NPs el hidrogel no mostro toxicidad sobre fibroblastos gingivales humanos, obteniendo 85% de viabilidad celular después de 24h de tratamiento. En su conjunto estos datos muestran que el

hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL es una alternativa de bajo costo y segura para combatir las infecciones causadas por MRSA.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que existen en el mercado antibióticos efectivos para inhibir el crecimiento de MRSA, su elevado costo dificulta su adquisición para la mayoría de la población. Por eso urge el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento, que sean eficaces pero de bajo costo y seguras. La nanotecnología es una rama actual de la medicina en donde se utilizan materiales con tamaños nanométricos que muestran propiedades que en partículas más grandes del mismo material no muestran. La nanomedicina ofrece una alternativa para el desarrollo de fármacos “inteligentes” específicos de sitio, liberación controlada y sin desarrollar resistencia. El objetivo de este trabajo fue demostrar la efectividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs) sobre la cepa resistente a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA).

¿Un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs) inhibirá el crecimiento la cepa resistente a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA) sin efecto toxico sobre fibroblastos gingivales humanos?

5. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen productos tópicos intraorales con bases químicas, avalados por la FDA para la disminución de microorganismos patógenos y promover la reparación tisular disminuyendo la inflamación. Estos tienden a ser altamente tóxicos y no controlados. El elevado costo de los antibióticos más comúnmente empleados dificulta su adquisición para la mayoría de la población. Sin embargo, en el mercado aun no existen productos a base de nanopartículas de bismuto como productos tópicos, avalados por esta organización. Es por eso que en esta investigación se pretende estudiar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de bismuto como producto tópico intraoral, empleando como vehículo, gel. Buscando la similitud de efectividad, disminuyendo consecuencias negativas con un producto más saludable.

En caso de obtener una actividad antimicrobiana importante con la concentración en gel de nanopartículas de bismuto contra el *S. aureus*, se podría contar con una alternativa interesante para el tratamiento de las infecciones orales o como productos para prevenir infecciones post operatorias, disminuyendo los efectos adversos, buscando una respuesta positiva, que en una presentación en gel proporciona un método fácil de aplicación en etapas futuras de pruebas *in vivo*.

6. HIPOTESIS

La actividad antimicrobiana y antibiofilm del hidrogel con nanopartículas BisBAL será significativa sobre el crecimiento de MRSA, compitiendo contra los mejores antibióticos a muy bajo costo y sin causar toxicidad sobre fibroblastos gingivales humanos.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado de nanopartículas lipofílicas de bismuto sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

7.2. Objetivos Específicos

- Elaborar un hidrogel a base de carbopol, a partir de nanopartículas lipofílicas de bismuto sintetizadas por método coloidal.
- Determinar la actividad antimicrobiana del hidrogel-BisBAL NPs sobre el crecimiento de MRSA.
- Analizar la actividad antibiofilm sobre un biofilm de 24 horas de MRSA por microscopía de fluorescencia.
- Estudiar el posible efecto citotóxico del hidrogel-BisBAL NPs sobre un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos.

8. ANTECEDENTES

8.1. *Patógenos resistentes*

Se han detectado un grupo de bacterias resistentes a los antibióticos, las cuales tienen una alta patogenicidad y su resistencia antibacteriana las hace aún más peligrosas, dentro de estos se encuentra el *Staphylococcus aureus*, es una bacteria altamente estudiada por su facilidad de generar resistencia antimicrobiana y por su alta patogenicidad, ya que produce enfermedades desde infecciones cutáneas hasta celulitis, meningitis, endocarditis o neumonía (Wu et al., 2016), es el patógeno causante de una gran cantidad de infecciones intrahospitalarias, en específico de la neumonía, con una tasa de mortalidad del 60%, incrementando también su incidencia en pacientes no hospitalizados (David & Daum, 2010). Estos casos de neumonía por *S. aureus* son especialmente nombrados ya que de las cepas recolectadas, aproximadamente el 50% son cepas resistentes a meticilina MRSA (Hua, et al., 2014). El *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) es un patógeno que está aumentando su prevalencia en el mundo, se considera que en Europa afecta de del 3 al 70% de la población (Demir, et al., 2016). Es también la bacteria más comúnmente encontrada en la osteomielitis (Mooney, et al., 2016). Actualmente en diferentes partes del mundo aplican diferentes medidas de prevención para evitar el contagio de *S. aureus* (MRSA), que varían desde estudios previos al ingreso de pacientes a hospitales, aislamiento absoluto de los afectados y descontaminación de estos previo al tratamiento del motivo de consulta (Larsen et al., 2014). En la 4ta conferencia internacional del consenso de MRSA se menciona que la vancomicina es actualmente la droga más utilizada para combatir bacteriemias causadas por esta bacteria, aun así en esta misma conferencia se debate el acenso en resistencia a este antibiótico por *S. aureus* la necesidad de aumentar la MIC lo suficiente para evitar esta resistencia (Edwards, et al., 2014). Actualmente el *S. aureus* es altamente transmisible, en específico en ámbito intrahospitalario, y la presencia de la cepa MRSA resulta en una problemática para la correcta atención de enfermedades causadas por esta bacteria y es tratada con una alteración en la MIC de vancomicina.

8.2. Medicina Tradicional y sus desventajas.

Desde el descubrimiento de la acción antimicrobiana producida por la penicilina hace ya más de 80 años, los antibióticos han sido responsables de otorgarle a quien las consume, la posibilidad de una mejoría notable (Czaplewski, et al., 2016). Sin embargo la resistencia adquirida de las bacterias hacia antibióticos sintéticos, es actualmente una de las problemáticas más alarmantes en el ámbito biomédico (Paphitou, 2013), de acuerdo con la alianza mundial contra la resistencia antimicrobiana (WAAR), los antibióticos pueden perder su efectividad por completo en los próximos 5 años, gracias a la automedicación o la prescripción descontrolada de estas drogas (Rios, et al., 2016). La OMS menciona que cada año 480 000 personas presentan infecciones resistentes a antibióticos la cual ya está afectando a la lucha contra el VIH. Esto genera un aumento en el gasto , sufrimiento y mortalidad (Sciarretta, et al., 2016). Es por esto que en el 2010 la sociedad americana para enfermedades infecciosas solicitaron la producción de nuevas drogas antibacterianas y terapias alternas contra las bacterias, para el año 2020 (Bassetti & Righi, 2015).

Todos los fármacos, en alguna medida, tienen la capacidad de producir algún efecto adverso, ya sea leve, moderado o incluso fatal, de esta manera, en cada ocasión en que recetamos o incluso ingerimos algún medicamento, se corre un riesgo latente (Tripathi, 2008). Los efectos adversos provocados por fármacos pueden aparecer con rapidez después de tomar el fármaco, o puede aparecer después del uso prolongado del fármaco o incluso después de haberlo dejado, se consideran grupos de cuidado los pacientes que consumen varios medicamentos a la vez y los ancianos. Tienen una incidencia de aparición del 10 al 25% y se pueden dividir en predecibles e impredecibles. Los efectos predecibles son los conocidos efectos colaterales que produce un medicamento, como la somnolencia o diarrea. Los efectos impredecibles son aquellos asociados a un paciente específico que tiene una reacción exagerada a un componente del medicamento, como alergias. Los efectos adversos usualmente se pueden atenuar, pero no eliminar, al dosificar los medicamentos y saber su farmacodinamia. En dado caso, para un paciente específico se debe de planear según sus necesidades, diferentes medicamentos y sus diferentes efectos adversos para no producir un problema grave e irreparable (Fernández, 2008).

Se considera que el 10% de consumo de antibióticos, se da por infecciones orales y la resistencia bacteriana de la familia de *Streptococcus* y de bacterias gram- con las que constantemente luchamos en el área estomatológica, se relaciona con el uso descontrolado de estos antibióticos de amplio espectro que con frecuencia se recetan como coadyuvantes en el

tratamiento de enfermedades infecciosas de la cavidad oral o como profilaxis para evitar infecciones postoperatorias (Bascones Martínez et al., 2004; Fine et al., 1998). Esta resistencia bacteriana está directamente relacionada a que para enfermedades infecciosas específicas, no se realizan exámenes de susceptibilidad bacteriana y usualmente los antibióticos no se prescriben de manera correcta, por los días indicados o el paciente no termina la dosis recomendada (Verdugo et al., 2015). Los antibióticos utilizados frecuentemente en odontología presentan porcentajes considerables de resistencia microbiana. En casos de periodontitis existe alrededor de 15% de probabilidad de resistencia antimicrobiana al uso concomitante de amoxicilina y metronidazol. Así como un 43% en el uso de amoxicilina como único fármaco, o el 30% con metronidazol y 25% con clindamicina. De la misma manera, en casos de periimplantitis, el 46.7%, 39.2%, 25%, y 21.7% con el uso profiláctico de clindamicina, amoxicilina, doxicilina y metronidazol, respectivamente (Rams, Degener, & van Winkelhoff, 2014) (Verdugo et al., 2015).

Dentro de los coadyuvantes tópicos para procesos infecciosos en odontología, el uso de clorhexidina en los últimos años va en aumento. Este compuesto es un cristal no volátil, que es soluble en agua. Se utiliza como desinfectante dérmico y antiséptico oral. Poco se han estudiado los efectos adversos de este compuesto, se sabe que el contacto directo continuo a este desinfectante puede causar lesiones dérmicas y el consumo constante puede producir daños hepáticos irreversibles ("HSDB: CHLORHEXIDINE," 2015). En estudios iniciales del compuesto en colutorios orales, se demostró que el uso constante, no controlado de éste, puede producir edema y descamación de la mucosa oral (Flötra, Gjermo, Rölla, & Waerhaug, 1971). Es por esto, que se recomienda el uso de estos colutorios por periodos cortos. Sin embargo, colutorios con este compuesto se pueden adquirir sin prescripción médica y sin limitantes en un gran número de farmacias y tiendas de conveniencia, siendo posible su uso no controlado y excesivo. La exposición ocupacional a la clorhexidina, por contacto o inhalación, hacia tejidos que no son correctamente lavados, o hacia el tejido conjuntivo de los ojos, pueden dar a lugar casos de irritación y descamación, siendo el personal médico y odontológico un grupo de riesgo para estos accidentes (van der Bijl & Dreyer, 1982).

8.3. Nanotecnología biomédica.

La nanotecnología es la ciencia que trata con partículas pequeñas, con tamaños de milésimas de millón de metro, a esa escala los materiales o componentes químicos, muestran propiedades y aplicaciones que no siempre muestran a escalas mayores y pueden ser aplicados a muchas ciencias y disciplinas (Shelley, 2006), algunas de estas disciplinas están en vínculo directo con la vida, como lo es la biomedicina, en donde este tipo de tecnología se aplica para resolver problemas en cuestión de formulación de materiales, máquinas de biotecnología y máquinas de sistemas moleculares (Seifalian, et all., 2014).

Una de las aplicaciones de esta tecnología, se expuso en el tercer encuentro de nanotecnología en medicina, en la cual se menciona la producción de medicamentos basados en nanotecnología, los cuales se administran por uno métodos más estudiados en los últimos años, la emergente terapia inhalada, en donde por medio de humidificadores, se amplifican y reciben estos medicamentos (Azzawi, et al., 2016). Así mismo mencionan una tecnología a base de nanopartículas de oro que pueden, no solo diagnosticar cáncer a través de una T.C., si no que puede entregar tratamiento específico en la zona afectada, con mínimo daño al huésped, esta tecnología aún está en proceso de investigación, pero promete una terapia segura para el tratamiento de esta enfermedad que ha tenido un aumento de incidencia en los últimos años(Karponis, et al., 2016).

8.4. Nanotecnología en Odontología.

La nanotecnología está muy involucrada hoy en día en la odontología, desde la producción de materiales dentales, hasta el uso de nanopartículas como métodos de estudio de estructuras dentales. Para un estudio topográfico de la capa híbrida que se forma con la adhesión en dentina, se pueden utilizar nanopartículas de oro de 40-120nm en mezclados con el adhesivo de elección, ese tamaño de nanopartículas permite una correcta fotopolimerización del adhesivo y facilita el estudio de la penetración del material mediante una tomografía de coherencia óptica, en donde las nanopartículas de oro son fácilmente detectadas en el estudio(Braz et al., 2012).

De la misma manera, se ha intentado implementar la nanotecnología en materiales de uso cotidiano en la odontología, como son el Ionómero de vidrio, al cual se la ha modificado con nanopartículas cerámicas, con el

objetivo de disminuir el desgaste de este material, ya que en su fórmula original, resulta un material óptimo para la restauración dental por su alta afinidad a la dentina y su constante liberación de fluoruro, pero tiene un desgaste mayor al de la resina, amalgama o el mismo diente (Najeeb et al., 2016). Otra aplicación en materiales dentales, es en resinas con nanopartículas cerámicas no previamente recubiertas con sílice, estas ahora modificadas con sílice con el fin de proporcionar una mejor adhesión al polimerizar después de ser silanizadas (Kaizer et al., 2016; Rezvani, et al., 2016).

Dentro de los campos más estudiados en la odontología esta la osteointegración de los implantes, actualmente existen estudios que demuestran que el uso de la nanotecnología, en forma de recubrimientos de implantes como el de nano-hidroxiapatita o nanopartículas de fosfato de calcio en diferentes concentraciones (Jimbo et al., 2012) permiten una osteointegración más uniforme, densa y estable que en la colocación de implantes sin nanopartículas adicionadas. Inclusive, implantes tratados con Nanopartículas de fibrina de seda, que no solo inducen a la osteointegración, sino que también liberan por un tiempo prolongado un efecto antibacterial, proporcionando un espacio libre de bacterias para la correcta osteointegración del implante (Sharma et al., 2016).

8.5. *Nanopartículas de Bismuto.*

El bismuto es un elemento metálico del grupo VA, sus números de oxidación son +3 y +5 y lo podemos encontrar en la corteza terrestre en una proporción similar a la de la plata, ya que no existen tantos depósitos de este metal, ocupa el lugar 73 de abundancia y lo podemos encontrar en China y México, en forma de Oxido de bismuto, Sulfato de bismuto y Carbonato de bismuto (Hernandez-Delgadillo et al., 2012).

9. MATERIAL Y METODOS

9.1. *Síntesis y caracterización de nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs)*

La síntesis de nanopartículas BisBAL se desarrolló utilizando Pentahidrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como sal de partida, 2,3-dimercapto-1-propanol como donador de la fracción BAL, borhidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor y propilenglicol como agente estabilizante, utilizando agua destilada estéril para las diluciones. Basado en un protocolo utilizado anteriormente (Hernandez-Delgadillo et al., 2014, 2015 y 2016), utilizando una solución base con un rango molar 2:1 de Bi(bis) a 2,3-dimercapto-1propanol (BAL) como precursor catiónico de las nanopartículas de BisBAL. Información acerca de la forma, tamaño y distribución de las nanopartículas BisBAL fue obtenida mediante microscopía electrónica de barrida (SEM) y la composición elemental de la muestra fue determinada por espectro EDS.

9.2. *Elaboración del gel cargado con nanopartículas BisBAL como ingrediente activo*

Para la elaboración del gel de BisBAL NPs se utilizaron 50 mL de agua destilada estéril, calentada a 70°C y se agregaron 2ml de la solución de BisBAL NPs. se incorpora lentamente y con agitación magnética 0.5g de carbopol como agente espesante hasta lograr la consistencia deseada. El gel se almacena a 4°C hasta su empleo. Su estabilidad fue analizada después de 2 meses de almacenamiento.

9.3. *Caracterización de BisBAL NPs-Gel*

La caracterización de BisBAL NPs-Gel se obtuvo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y el espectro EDS para confirmar la identidad y presencia del bismuto al interior del hidrogel.

9.4. Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL

La actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con BisBAL NPs sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (ATCC no 33592) se determinó utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5- Bromuro de difeniltetrazolio) (Biotium, Hayward, CA) (T. Mosmann., 1983; Y. Liu., 1997). De acuerdo a las instrucciones del proveedor; 1×10^4 células MRSA se inoculan en 100 μ l de Caldo de Tripticaseína de soya (TSB) en una placa de 96 pozos. Tres pozos con medio TSB, como control de crecimiento. 0.39-125 μ M de BisBAL NPs-Gel se agregaron para interferir con el crecimiento bacteriano. Como control positivo de inhibición se utilizaron 10 μ M de Doxiciclina. Las placas de 96 pozos se incubaron a 37°C por 24 horas. Cumplidas las 24 horas se agregaron 10 μ l de MTT a cada pozo, se protegió contra la luz e incubó a 37°C por 2 horas. Se agregaron 200 μ l de Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, MO, USA) para disolver el MTT reducido. La cantidad de células vivas, se determinó por un lector de absorbencia de microplacas (Biorad, Philadelphia, PA) a 595nm.

9.5. Actividad antibiofilm del hidrogel con BisBAL NPs sobre el biofilm de MRSA

Para analizar la capacidad del gel cargado con BisBAL NPs de inhibir la formación del biofilm de MRSA se empleó el protocolo descrito anteriormente para la actividad antimicrobiana. Un biofilm de 24h de MRSA se obtuvo en placas de 96 pozos sola o sobre superficie de hueso estéril y se expuso a 100 μ M del hidrogel cargado con BisBAL NPs, 10 μ M de Doxiciclina o medio solo como control de crecimiento de MRSA y se incubó por 24h a 37°C. Se lavó tres veces con PBS estéril y se tiñó con Diacetato Fluorescente (FDA). El biofilm bacteriano se observó con el uso de microscopio fluorescente a 495 nm (Thornwood, NY). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software AxioVision (Thornwood, NY). La intensidad fluorescente se midió empleando un escáner fluorómetro de microplacas multimodo (Promega, Madison, WI) a una longitud de onda de 525 nm.

9.6. Evaluación de toxicidad del gel cargado con nanopartículas de bismuto sobre fibroblastos gingivales humanos

La evaluación de la posible citotoxicidad del gel con BisBAL NPs se analizó sobre un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos (HFGs) empleando el ensayo de Diacetato Fluorescente acoplado a microscopia fluorescente. Previamente se cultivarán las células HFGs en el medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) en una mezcla de nutrientes con Ham's F12 (DMEM/F12), suplementada con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, California, USA) y 100U/ml de penicilina, 100 µg/ml streptomycin y 0.25 µg/ml amfotericina B (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) a 37 °C y 5% CO₂. Después de obtener el crecimiento celular (monocapa con 90% de confluencia), se agregaron BisBAL NPs-Gel en una concentración final de 100 µM o 10 µM de Doxiciclina como control positivo de inhibición. Después de 24 horas se hizo un lavado celular con solución salina de fosfato (PBS). Una vez obtenidas las células, la viabilidad celular se midió con el ensayo de Diacetato Fluorescente y se analizaron los datos para determinar el número de células viables. El experimento se repitió tres veces para garantizar la veracidad de los resultados.

10. RESULTADOS

La figura 1 ilustra de manera gráfica la estrategia experimental seguida en este estudio para determinar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Effect of BisBAL NPs-Gel on MRSA biofilm on bone surface

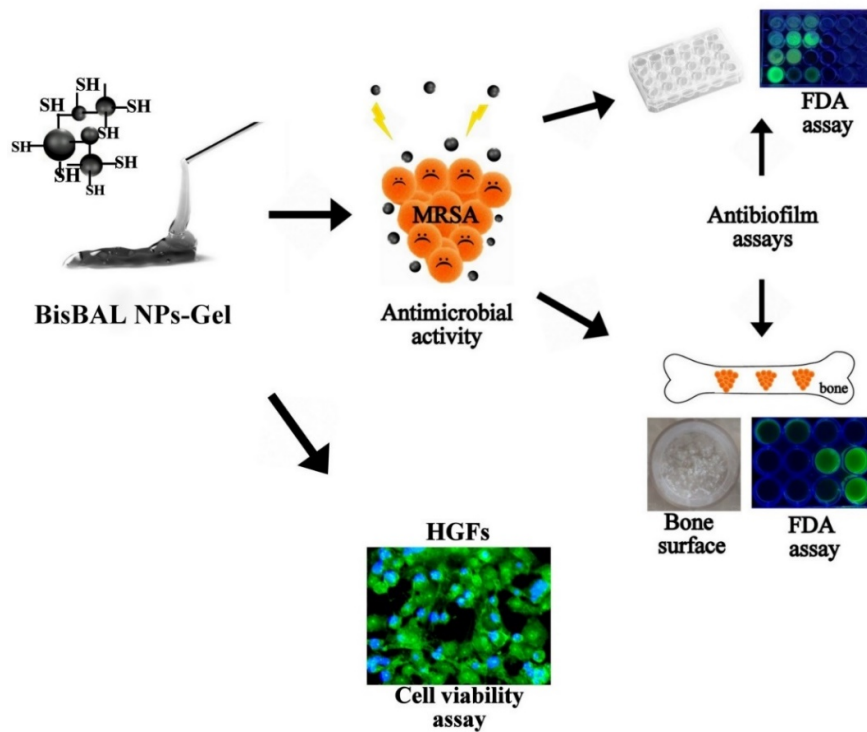


Figura 1. Resumen gráfico de la estrategia experimental para evaluar la propiedad antimicrobiana y antibiofilm del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL.

10.1. Caracterización del hidrogel cargado con BisBALNPs

El hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL presento una morfología similar a la de una “dona” con la presencia de las nanopartículas de bismuto en la zona electrodensa (Figura 2i-ii). Las nanopartículas presentaron un tamaño promedio de 28 nm, mientras que la dona completa midió en promedio 119 nm. La presencia de bismuto se corroboró mediante espectro EDS(Figura 2iii-iv).

Caracterización de BisBAL NPs-Gel por SEM y EDX

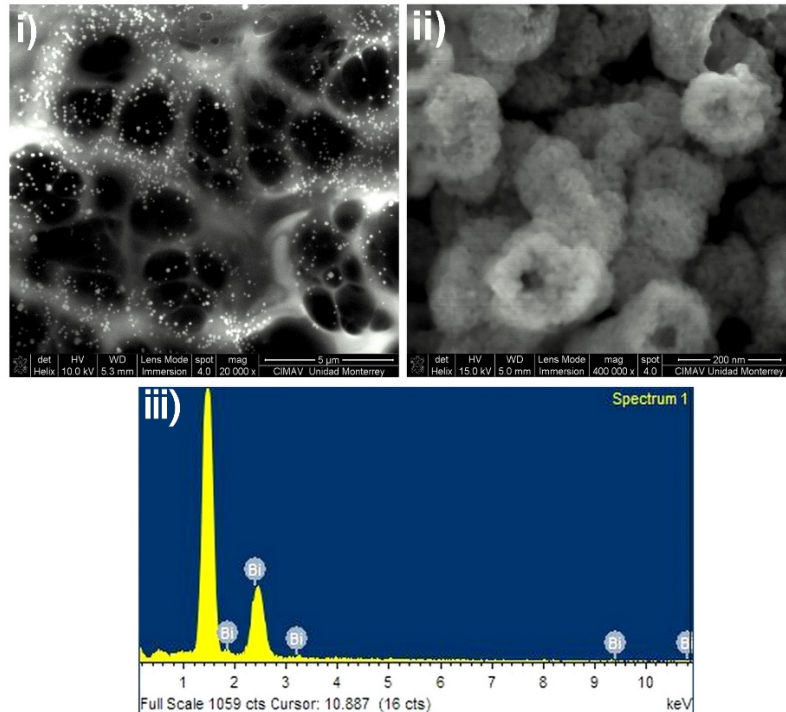


Figura 2.Caracterización del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL mediante microscopia electrónica de barrido SEM.

10.2. Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL

Las nanopartículas de BisBAL sintetizadas fueron utilizadas para desarrollar un gel que fue estable a temperatura ambiente por 3 meses. Cuando se evaluó la actividad antimicrobiana sobre MRSA se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de BisBALNPs-Gel para interferir con el crecimiento de MRSA (Figura 3). 125 μM de BisBALNPs mostro una inhibición superior del 90% del crecimiento bacteriano, comparado con los 20 μM de Doxyciclina que solo inhibió un 78% del crecimiento bacteriano. La MIC fue establecida en 6 μM de BisBALNPs como la mínima cantidad de nanopartículas de bismuto en el gel que bloquea el crecimiento de MRSA(Figura 3).

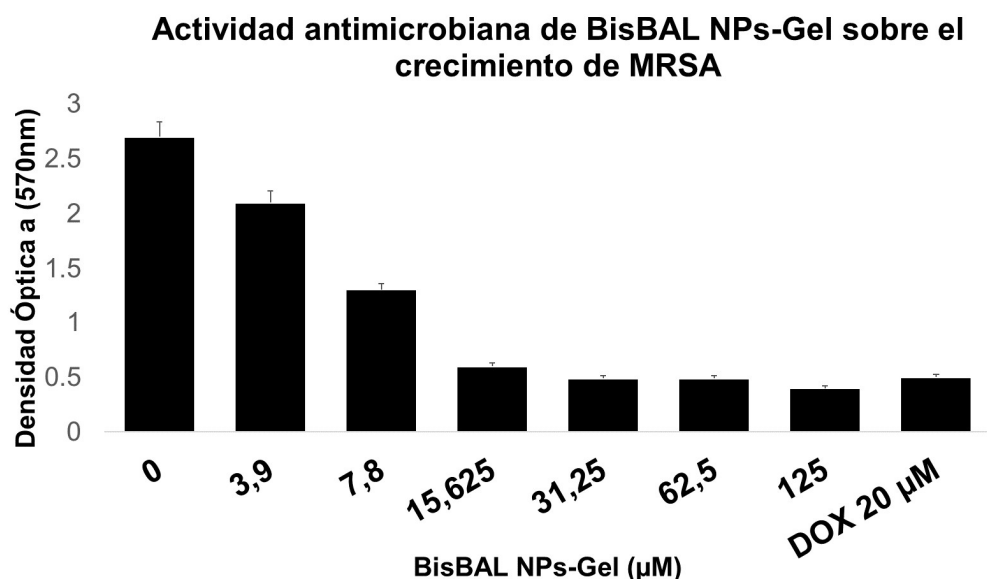
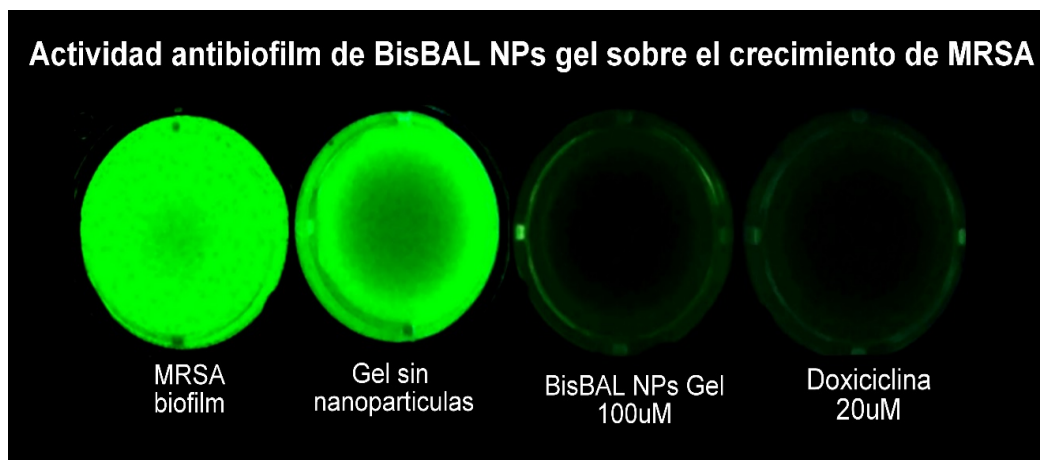


Figura 3. Actividad antimicrobiana del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.

10.3. Actividad antibiofilm del hidrogel con BisBAL NPs sobre el biofilm de MRSA

Cuando se analizó la actividad antibiofilm, los resultados mostraron que a una concentración final de 100 μM BisBAL NPs el hidrogel removió 79% del biofilm MRSA, mientras que 10 μM de doxiciclina desprendieron 86% del mismo biofilm bacteriano (Figura 4 A y B). Idénticos resultados se obtuvieron al emplear el modelo de biofilm de MRSA sobre hueso. En conjunto estos resultados sugieren que el hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL posee la misma efectividad antibiofilm que la doxiciclina.

A)



B)

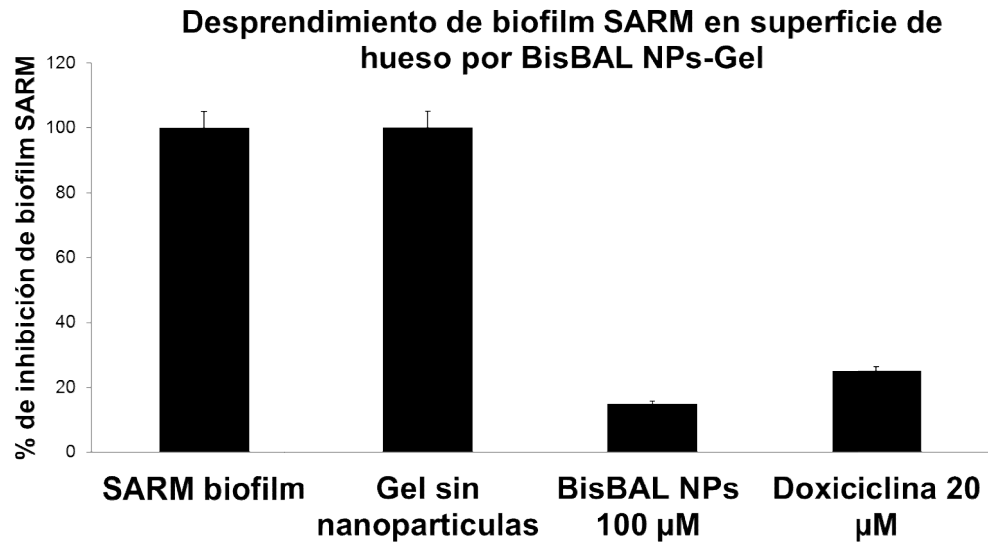


Figura 4. Actividad antibiofilm del hidrogel cargado con nanoparticulas BisBAL sobre un biofilm de 24h de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina sobre placa de 96 pozos o hueso por microscopía de fluorescencia.

10.4. Evaluación de toxicidad del gel cargado con nanopartículas de bismuto sobre fibroblastos gingivales humanos

Cuando se analizó el posible efecto citotóxico del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL sobre un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos, los resultados mostraron que a una concentración final de 100 μM of BisBAL NPs, la viabilidad celular se redujo solamente en un 16% después de 24h de tratamiento (Figura 5).

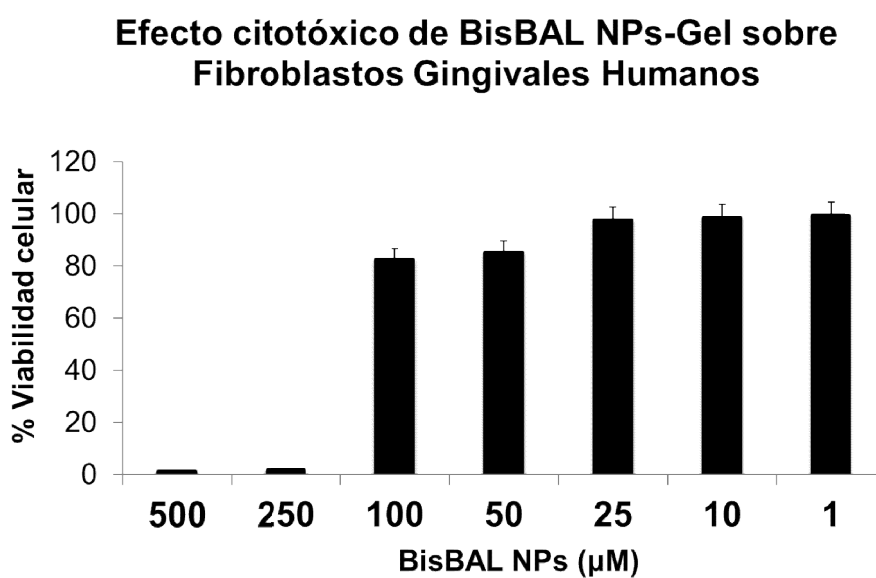


Figura 5. Efecto citotóxico del hidrogel cargado con nanopartículas BisBAL sobre un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos.

11. DISCUSIÓN

La nanotecnología es una nueva disciplina que ofrece la esperanza de desarrollar fármacos “inteligentes” para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos multiresistentes debido a las propiedades únicas de las nanopartículas, el desarrollo de fármacos específicos de blanco, liberación controlada y sin efectos secundarios para las células humanas. Previamente se han publicado muchos reportes describiendo las propiedades antimicrobianas de nanopartículas de diferentes metales tales como; plata, oro, platino, magnesio, cobre, etc. Sin embargo, presentan alta toxicidad sobre células humanas limitando su aplicación clínica. El bismuto es considerado como un elemento “verde” ya que no es cancerígeno y presenta nula toxicidad y bioacumulación en comparación con otros elementos como aluminio y antimonio. México es el segundo productor de bismuto a nivel mundial, solo superado por China. Tiene la desventaja de ser insoluble, pero al reaccionar con el 2,3-dimercapto-1-propanol adquiere grupos tiol que incrementan su solubilidad en agua de manera importante. La aplicación biomédica más conocida del bismuto es como subsalicilato mejor conocido como “Pepto-Bismol” para el tratamiento de diarrea y malestar estomacal. Recientemente nuestro grupo de trabajo describió las propiedades antimicrobianas de nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBALNPs) sobre patógenos orales inhibiendo la formación de su biofilm, compitiendo en efectividad con los antibióticos más comúnmente empleados.

En este trabajo se presenta evidencia sólida acerca de la efectividad bactericida y antibiofilm de un hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina sin causar efecto tóxico sobre fibroblastos gingivales humanos.

Estudios previos describen una alta actividad antimicrobiana contra el crecimiento de MRSA utilizando nanopartículas de oro y selenio, con citotoxicidad aparentemente baja en células de mamífero (X. Li., 2014; X. Huang, et al., 2016). Nuestros hallazgos están en concordancia con estos reportes, apoyando la hipótesis que la nanoterapéutica es una forma innovadora de controlar infecciones provocadas por MRSA.

Al explorar la actividad antibiofilm de BisBALNPs-gel, los resultados mostraron que 100 μ M BisBALNPs-Gel despega 79% del biofilm de MRSA, mientras que la doxiciclina remueve 86% de las células en comparación con el control positivo. Se obtuvo el mismo resultado sobre biofilm de MRSA creado en superficie ósea. Estos resultados sugieren que BAL NPs-Gel es tan efectivo como la doxiciclina para desprender biofilm de *S. aureus resistente a meticilina*. Agarwala y cols. Reportaron en el 2014 que las nanopartículas de óxido de cobre, presentan actividad antibacterial y antibiofilm contra MRSA a una dosis dependiente, sin embargo, su citotoxicidad en células mamíferas no fue explorada (M. Agarwala., 2014).

Al analizar la citotoxicidad del BisBALNPs-Gel en HGFs, los resultados arrojan que 100 μ M of BisBALNPs-Gel disminuye solo el 16% de la viabilidad celular después de 24h de tratamiento en comparación con el control positivo. Estudios previos describen la actividad antimicrobiana de algunos metales como; plata, oro, zinc y titanio con muy buenos resultados (J. S. Kim 2007; N. Nataraj 2014). Sin embargo la mayoría de ellos presentan alta toxicidad en células humanas, limitando su aplicación clínica (S. Gaillet 2015). Nuestros resultados son importantes ya que demuestran que el BisBALNPs-Gel puede ser utilizado a la concentración de 100 μ M como antimicrobiano y antibiofilm sobre MRSA sin efecto adverso sobre cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos.

12. CONCLUSIONES

El hidrogel cargado con nanopartículas lipofílicas de bismuto inhibe el crecimiento de *S. aureus* multiresistente (MRSA) en concentraciones desde 6-100 μ M desprendiendo el biofilm creado sobre el modelo de hueso humano, sugiriendo que hidrogel con BisBALNPs es una alternativa innovadora para combatir infecciones causadas por MRSA sin el uso de antibióticos.

13. REFERENCIAS

Adamian, Z. N., Abovian, H. V. and Aroutiounian, V. M. 1996. Sensors and Actuators B. Chemical 35 (1–3):241.

Agarwala, M., Choudhury, B. and Yadav, R. N. 2014. Indian journal of microbiology 54 (3), 365.

Azzawi, M., Seifalian, A., & Ahmed, W. 2016. Nanotechnology for the diagnosis and treatment of diseases. Nanomedicine (London, England). 11(16): 2025–2027.

Badireddy, A.R., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R., S. Chellam, S and Cabral-Romero. 2014. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. C. J Nanopart Res 16 (6), 1.

Bascones Martínez, A., Aguirre Urizar, J. M., Bermejo Fenoll, A., Blanco Carrión, A., Gay-Escoda, C., González-Moles, M. A., de Vicente Rodríguez, J. C. Consensus statement on antimicrobial treatment of odontogenic bacterial infections. 2004. Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal. 9(5):369-376; 363–369.

Bassetti, M., & Righi, E. 2015. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. Current Opinion in Critical Care. 21(5):402–411.

Braz, A. K. S., de Araujo, R. E., Ohulchansky, T. Y., Shukla, S., Bergey, E. J., Gomes, A. S. L., & Prasad, P. N. 2012. In situ gold nanoparticles formation: contrast agent for dental optical coherence tomography. Journal of Biomedical Optics 17(6):066003.

Carmona-Rodriguez, B., Alvarez-Perez, M. A., Narayanan, A. S., Zeichner-David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., Garcia-Hernandez, A. L., Suarez-Franco, J. L., Chavarria, I. G., Villarreal-Ramirez, E. and Arzate, H. 2007. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. Biochemical and biophysical research communications 358 (3), 763.

Castillo-Martínez, J.C., Martínez-Castañón, G.A., Martínez-Gutierrez, F., Zavala-Alonso, N. V., Patiño-Marín, N., Niño-Martinez, N., Zaragoza-

Magaña, V. and Cabral-Romero, C. *Journal of Nanomaterials* 2015, 7. Chen, T. H., Lin C. C. and Meng, P. J. *Journal of hazardous materials* 2014;277, 134.

Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V. A., ... Rex, J. H. 2016. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *The Lancet.Infectious Diseases*. 16(2):239–251.

Czajka, M., Sawicki, K., Sikorska, K., Popek, S., Kruszewski, M. and Kapka-Skrzypczak, L. 2015. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 29 (5):1042

Desai, N. 2012. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *The AAPS journal* 14 (2), 282.

Demir, T., Coplu, N., & Esen, B. 2016. Comparative analysis of phenotypic and genotypic detection of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus*. *Ind Jur of Patholog & Microbiolog*. 59(3): 314–317

Fernández, P. L. 2008. *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana.

Fine, D. H., Hammond, B. F., & Loesche, W. J. 1998. Clinical use of antibiotics in dental practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9(4): 235–238.

Flötra, L., Gjermo, P., Rölla, G., & Waerhaug, J. 1971. Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 79(2): 119–125.

HSDB: CHLORHEXIDINE. 2015. *TOXNET Toxicology Data Network*. U.S. National Library of Medicine. U.S.

H.-D. Rene, A. R. Badireddy, M.-S. Juan José, C.-C. Juan Francisco, M.-G. Gustavo Israel, S.-N. Rosa Isela, S. Chellam and C.-R. Claudio. 2016. Effect of Lipophilic Bismuth Nanoparticles on Erythrocytes. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 16 (1), 203.

J. C. Nickel, J. B. Wright, I. Ruseska, T. J. Marrie, C. Whitfield and J. W. Costerton. 1985. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro. *European journal of clinical microbiology*. 4 (2), 213.

J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong and M. H. Cho, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2007;3 (1), 95.

Jimbo, R., Coelho, P. G., Bryington, M., Baldassarri, M., Tovar, N., Currie, F. Wennerberg, A. 2012. Nano hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties. *J of Dent Rech.* 91(12):1172–1177.

Kaizer, M. R., Almeida, J. R., Gonçalves, A. P. R., Zhang, Y., Cava, S. S., & Moraes, R. R. 2016. Silica Coating of Nonsilicate Nanoparticles for Resin-Based Composite Materials. *J Dent Res.* 95(12):1394-1400.

Karponis, D., Azzawi, M., & Seifalian, A. 2016. An arsenal of magnetic nanoparticles; perspectives in the treatment of cancer. *Nanomed (London, England).* 11(16), 2215–2232.

N. Nataraj, G. S. Anjusree, A. A. Madhavan, P. Priyanka, D. Sankar, N. Nisha, S. V. Lakshmi, R. Jayakumar, A. Balakrishnan and R. Biswas. 2014. Synthesis and anti-staphylococcal activity of TiO₂ nanoparticles and nanowires in ex vivo porcine skin model. *Journal of biomedical nanotechnology.* 10 (5), 864.

Najeeb, S., Khurshid, Z., Zafar, M. S., Khan, A. S., Zohaib, S., Martí, J. M. N. Rehman, I. U. 2016. Modifications in Glass Ionomer Cements: Nano-Sized Fillers and Bioactive Nanoceramics. *Int J Mol Sci.* 17(7).

N. C. Norman. 1998. *Chemistry of Arsenic, Antimony, and Bismuth.* Blackie Academic and Professional, UK.

P. Peyrani, M. Allen, D. Seligson, C. Roberts, A. Chen, N. Haque, M. Zervos, T. Wiemken, J. Harting, D. Christensen and R. Ramirez. 2012. A secreted bacterial protease tailors the *Staphylococcus aureus* virulence repertoire to modulate bone remodeling during osteomyelitis. *American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.).* 41 (3), 117.

P. M. Favi, M. Gao, L. Johana Sepulveda Arango, S. P. Ospina, M. Morales, J. J. Pavon and T. J. Webster. 2015. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *Journal of biomedical materials research. Part A.*

P. Moayyedi, S. Soo, J. Deeks, B. Delaney, M. Innes and D. Forman. 2006. Pharmacological interventions for non-ulcer dyspepsia *The Cochrane database of systematic reviews* (4), CD001960.

Rams, T. E., Degener, J. E., & van Winkelhoff, A. J. 2014. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *Journal of Periodontology*. 85(1), 160–169.

Rezvani, M. B., Atai, M., Hamze, F., & Hajrezai, R. 2016. The effect of silica nanoparticles on the mechanical properties of fiber-reinforced composite resins. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. 10(2), 112–117.

R. Hernandez-Delgadillo, R., Velasco-Arias, D., Diaz, D., Arevalo-Niño, K., Garza-Enriquez, M., De la Garza-Ramos, M. A., & Cabral-Romero, C. 2012. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 2109–2113

R. Hernandez-Delgadillo, D. Velasco-Arias, J. J. Martinez-Sanmiguel, D. Diaz, I. Zumeta-Dube, K. Arevalo-Nino and C. Cabral-Romero. 2013. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation *International journal of nanomedicine*. 8, 1645.

R. Hernandez-Delgadillo, A. R. Badireddy, V. Zaragoza-Magaña, R.I. Sánchez-Nájera, S. Chellam and C. Cabral-Romero. 2006. *Journal of Nanomaterials* 2015, 9 .

R. Hernandez-Delgadillo, A. R. Badireddy, J. Martínez-Sanmiguel, J.F Contreras-Cordero, G. I. Martínez-Gonzalez, R.I. Sánchez-Nájera, S. Chellam, and C. Cabral-Romero, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2016 (1), 203

R. Kock, K. Becker, B. Cookson, J. E. van Gemert-Pijnen, S. Harbarth, J. Kluytmans, M. Mielke, G. Peters, R. L. Skov, M. J. Struelens, E. Tacconelli, A. Navarro Torne, W. Witte and A. W. Friedrich. 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 15 (41), 19688.

Sacar, S., Sayin Kutlu, S., Turgut, H., Cevahir, N., Hircin Cenger, D., & Tekin, K. 2010. Epidemiology and associated factors for nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary-care hospital. *Epidemiology and Infection*. 138(5), 697–701.

Seifalian, A., de Mel, A., & Kalaskar, D. M. (2014). *Nanomedicina*. One Central Press. UK

Sharma, S., Bano, S., Ghosh, A. S., Mandal, M., Kim, H.-W., Dey, T., & Kundu, S. C. 2016. Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 12(5), 1193–1204.

S. Gaillet and J. M. Rouanet. 2015. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 77:58.

Tacconelli, E., Venkataraman, L., P. C. De Girolami and D. A. EM. 2004. Surveillance and Correlation of Antimicrobial Usage and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: A Hospital Population-Based Study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 53 (3):474

Tripathi, K. D. (2008). *Farmacologia En Odontologia: Fundamentos*. Ed. Médica Panamericana.

T. Mosmann. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65 (1-2), 55.

T. Ito, Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn and K. Hiramatsu. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45 (5), 1323.

Van der Bijl, P., & Dreyer, W. P. 1982. Chlorhexidine gluconate mouthrinse--further aspects concerning its chemical compatibility, stability and detection of potentially harmful degradation products. *The Journal of the Dental Association of South Africa*. 37(11): 741–745.

Verdugo, F., Laksmana, T., & Uribarri, A. 2015. Systemic antibiotics and the risk of superinfection in peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*. 64, 39–50.

W. C. Huang, P. J. Tsai and Y. C. Chen. 2007. Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (London, England)*. 2 (6), 777.

Wu, S., Duan, N., Gu, H., Hao, L., Ye, H., Gong, W., & Wang, Z. 2016. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 8(7).

X. Li, S. M. Robinson, A. Gupta, K. Saha, Z. Jiang, D. F. Moyano, A. Sahar, M. A. Riley and V. M. Rotello. 2014. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS nano*. 8 (10), 10682.

X. Huang, X. Chen, Q. Chen, Q. Yu, D. Sun and J. Liu. 2016. Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs. *Acta biomaterialia*. 30, 397

Y. H. Hsueh, W. J. Ke, C. T. Hsieh, K. S. Lin, D. Y. Tzou and C. L. Chiang. 2015. ZnO Nanoparticles Affect *Bacillus subtilis* Cell Growth and Biofilm Formation. *PloS one*. 10 (6), e0128457.

Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura and D. Schubert. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*. 69 (2), 581.

14. APENDICE I

Editors

Professor Ishaq Ahmad and Dr Paolo Di Sia

**ADVANCED MATERIALS AND
THEIR APPLICATIONS:**
Micro to nano scale



1

Antimicrobial and Antibiofilm Activities of a Bismuth Lipophilic Nanoparticles Hydrogel against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm

Rene Hernández-Delgadillo¹, Erika Cecilia Espinoza-Villarreal¹, Casiano Del Angel-Mosqueda¹, Osvelia Esmeralda Rodríguez-Luis¹ and Claudio Cabral-Romero¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Odontología, Laboratorio de Biología Molecular, Monterrey, Nuevo León, México

Outline

Introduction.....	2
Antimicrobial and antibiofilm activities of BisBAL NPs-Gel on MRSA	4
Characterization of the BisBAL NPs-Gel by SEM	5
Determination of MIC of BisBAL NPs-Gel on MRSA growth	6
Antibiofilm activity of BisBAL NPs-Gel on MRSA biofilm	7
Cytotoxicity of BisBAL NPs-Gel on Human Gingival Fibroblasts (HGFs).....	9
Conclusion.....	9
References.....	10

Introduction

Despite of continuous effort by pharmaceutical industry and medicine, the multidrug resistance among pathogen microorganisms against most common antibiotics has increased drastically. Multidrug resistance has become one of most important health problems worldwide. Nosocomial infections caused by multidrug resistant microorganisms are hard to treat, since 70% of these microbes are resistant against most common drugs. *Staphylococcus aureus* is a pathogen identifies as the etiological agent of health-care-associated infections and community acquired ones¹ (Figure 1.1). The clinical relevance of *S. aureus* infections is due to their resistance to common antibiotics specifically to methicillin (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)². The infections caused by *S. aureus* community acquired have been increased in the last two years with 50% of these infections caused by MRSA. The strain USA-300 has been recognized as an etiology of osteomyelitis³. Their therapeutic management is a cost driver in healthcare, specifically in hospitals. Among the different factors as the major cost drivers are: prolonged hospital length to stay, cost of patient isolation and complications⁴. The treatment of MRSA infectious is complicated not only to their resistance to beta-lactam antibiotics, but also by their growing as biofilm. Microorganisms into biofilms become 1000 times more resistant than planktonic bacteria to physical and chemical attacks⁵. The tolerance of biofilms to antimicrobials increase with biofilm maturation and it is attributed mainly to restricted penetration of antibiotics, slow growth of pathogen microorganisms. Despite of their effectiveness, antibiotics more commonly employed on infectious diseases treatment are very expensive for most of patients, constituting a huge disadvantage during clinical practice in developing countries. It is urgent to develop new alternative drugs with antimicrobial and antibiofilm properties, non-antibiotic type, low cost and safe for treating infectious diseases. To attend this challenge of biofilms and their increased tolerance to antimicrobial agents, topical administration arises as an interesting alternative since it provides high local concentrations by delivering drugs directly to the site of infection and avoiding systemic side effects.

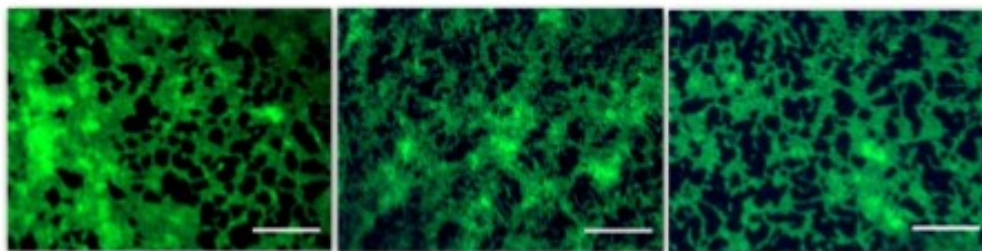


FIGURE 1.1 *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA) stained with SYTO9 green observed by fluorescent microscopy. Bar indicates 10 μ m.

Nanotechnology holds the promise of revolutionize modern medicine developing smart drugs with the ability to overcome biological barriers to efficiently get the target sites of diseases^{6,7}. The increase of multidrug resistance among pathogen microorganisms to the common antibiotics force to use higher doses of antibiotics to effectively inhibit the bacterial growth. Nanocomposites have been shown antimicrobial activity against gram positive and gram negative bacteria. Nanostructures of several metals like; silver, gold, zinc, and titanium and bismuth have been described with very good results⁸⁻¹². However, most of them present high toxicity on human cells,

limiting their used¹³⁻¹⁶. Bismuth is considered as "green metal", non-carcinogenic, and less bioaccumulative than other heavy metals like lead and antimony¹⁷. It is used in industry and for treatment of gastrointestinal diseases^{18,19}. Early reports of our group described antimicrobial and antibiofilm properties of bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs; Figure 1.2) against oral pathogens including bacteria, fungus and parasites. The BisABL nanoparticles did not present cytotoxicity on epithelial and blood human cells²⁰⁻²⁴. These studies have been described that bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth at concentrations lower than 1 mM and bismuth oxide nanoparticles exhibited antifungal activity on *Candida albicans* since 2 mM, showing better results than commercial antifungals.

More recently bismuth nanoparticles synthesis was modified adding the reaction with 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL), developing the BisBAL nanoparticles with lipophilic property. The antimicrobial activity of these nanostructures increased 1000 times in comparison with our previous synthesis and may due their lipophilic attribute. When the antimicrobial activity was studied, the results showed MICs values of 5-10 μM to inhibit oral bacterial and fungal growth. BisBAL NPs compete in efficacy against most common antibiotics. Despite of antimicrobial and antibiofilm properties of BisBAL NPs seems to be interesting, their effect of BisBAL nanoparticles against multidrug resistant pathogens (like MRSA) has not been explored. Will be interesting to develop a pharmaceutical presentation with BisBAL NPs as active ingredient and demonstrate their clinical application. Since infectious diseases initiate in specific sites on human body, they can be treating locally. Therefore we developed a hydrogel loaded with BisBAL nanoparticles and evaluated their potential as antimicrobial agent. MRSA was used as target to determine their possible clinical application as alternative treatment of infectious diseases.

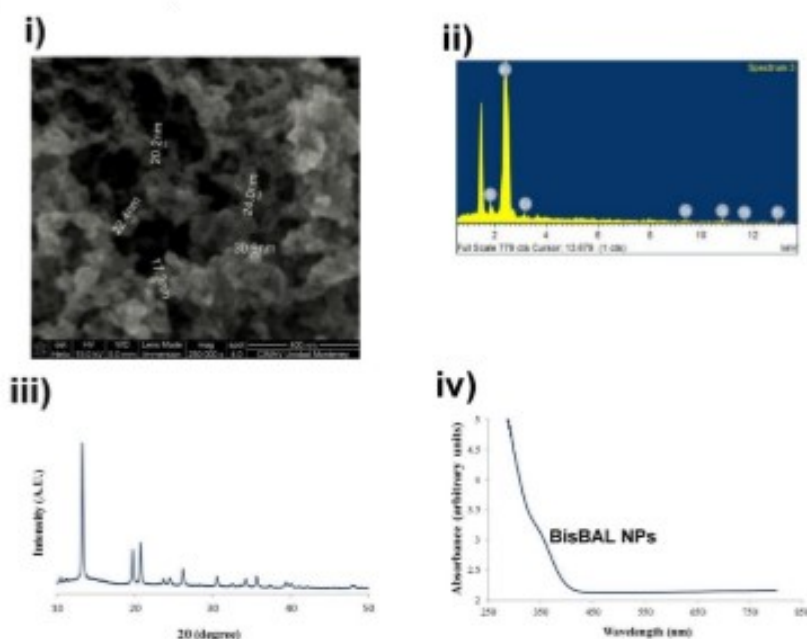


FIGURE 1.2

i) Bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs) observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). ii) EDS spectrum showed the element composition in the sample observed by SEM. iii) The bismuth presence in the sample of BisBAL nanoparticles was identified by X-ray diffraction pattern. iv) The UV-Vis absorbance.

In this work is described the effectiveness of a BisBAL NPs-Gel to detach Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. 6 μ M was the MIC of BisBAL nanoparticles necessary to inhibit the MRSA growth competing in efficacy with most common antibiotics. A 24h MRSA biofilm was detached from 96-well plate and bone surface after exposition to BisBAL NPs-Gel for 24h supporting the bactericidal findings. Finally, bismuth lipophilic nanoparticles showed not cytotoxicity on human gingival fibroblasts, suggesting the lack of non-desired effects. Altogether these results suggest BisBAL nanoparticles are a low cost and safe alternative to fight against MRSA infections.

Antimicrobial and antibiofilm activities of BisBAL NPs-Gel on MRSA

BisBAL nanoparticles were synthesized and characterized as early was described in our recent publications²². To obtain the BisBAL NPs gel, 50 mL of sterile distilled water were heated until 70°C and slowly 0.5 g of carbopol (Sigma Aldrich, MO, USA) were mixture with magnetic agitation. Following 2 mL of BisBAL nanoparticles were added to get a final concentration of 100 μ M. Finally, 500 μ L of triethanolamine (TEA; Sigma Aldrich, MO, USA) were added to the solution and employing more sterile water to get a final volume of 100 mL. Under these experimental conditions, the BisBAL NPs-Gel obtained a final concentration of 100 μ M. The characterization of BisBAL NPs-Gel was made by Scanning Electron Microscopy (SEM), EDS spectrum, XRD and UV-visible absorption spectra to confirm the identity of bismuth (Figure 1.2 i-iv).

A general description of methodology followed to determine the antimicrobial and antibiofilm activities of BisBAL NPs-Gel is showed in Figure 1.3. The antimicrobial activity of BisBAL NPs-Gel on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* growth (ATCC no 33592) was determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Biotium, Hayward, CA)^{25,26} according to the instructions of manufacturer. Briefly, 1X10⁴ MRSA cells were inoculated in 100 μ l of trypticasesoybroth (TSB) medium in a 96-well polystyreneplate. Three wells with only TSB medium were used as MRSA growing control. 0.39-125 μ M of BisBAL NPs-Gel were added to interfere with bacterial growth. As positive control 10 μ M of Doxycycline was employed. The 96-well plate was incubated at 37°C overnight. 10 μ l of MTT was added to each well, the plate was protected against light and incubated at 37°C for 2h. 200 μ l of Dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, MO, USA) was added to dissolve the reduced MTT. The number of live cells was determined by a Microplate Absorbance Reader (Biorad, Philadelphia, PA) at 595 nm. The experiment was repeated three times and the measured optical density were analyzed by descriptive statistics.

Based on the protocol described above, the antibiofilm property of BisBAL NPs-Gel was analyzed. A 24h MRSA biofilm on 96-well plate or bone surface was exposed to 100 μ M BisBAL NPs-Gel or 10 μ M of Doxycycline for 24h a 37°C. MRSA biofilm remains was washed three times with PBS and stained with FDA. The bacterial biofilm was observed under fluorescence microscopy at 495 nm (Thornwood, NY). The images were analyzed by using Axio Vision software (Thornwood, NY). The fluorescence intensity was measured using a 96-well scanning fluorometer Glomax[®] Multi + Microplate Multimode (Promega, Madison, WI) at wavelength of 525 nm.

Effect of BisBAL NPs-Gel on MRSA biofilm on bone surface

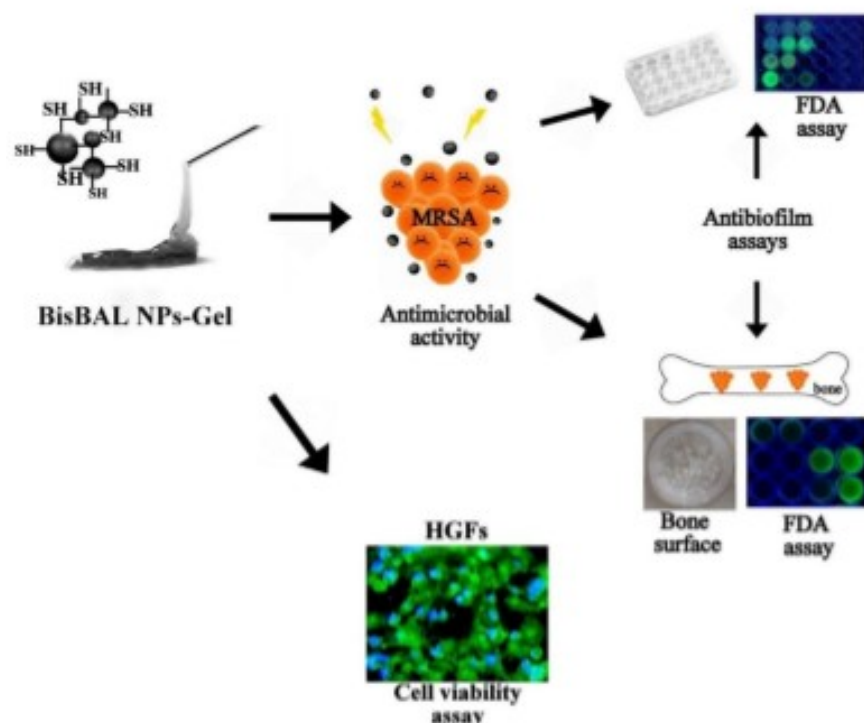


FIGURE 1.3

Graphical abstract to determine the antimicrobial and antibiofilm activities of a BisBAL-NPs-Gel on MRSA biofilm.

To explore the possible cytotoxic effect of BisBAL NPs-Gel on Human Gingival Fibroblasts (HGFs), cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F12 (DMEM/F12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 ²⁷. After obtaining cell confluence, BisBAL nanoparticles were added at a final concentration of 1000-5 μM . Cells were maintained in growth medium for 24h. After that the medium was removed and cells were washed with phosphate buffered saline (PBS). The cell viability was measured by Fluorescein Diacetate assay (FDA, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO). Data were analyzed to determine the number of viable cells.

Characterization of the BisBAL NPs-Gel by SEM

The BisBAL NPs-Gel showed a cluster of donut shape with an electro dense core of BisBAL nanoparticles visualized by SEM. The average size of each donut was of 145.6 nm in diameter

(Figure 1.4i, ii and iii). Bismuth composition was corroborated inside of SEM images by EDS spectrum (Figure 1.4iv). The BisBAL nanoparticles synthesized by colloidal method were used as active ingredient to develop a hydrogel and it was stable to room temperature for until 3 months. Since early it was described the antimicrobial activity of BisBAL nanoparticles we corroborate this property in the hydrogel composite BisBAL-NPs-Gel against MRSA growth. Following a deep characterization of the bactericidal activity of BisBAL-NPs-Gel against MRSA was made to compare their efficacy with most common antibiotics like Doxycycline. The bismuth NPs hydrogel will have the advantage of being non-antibiotic type with a lower cost of synthesis in comparison with antibiotics.

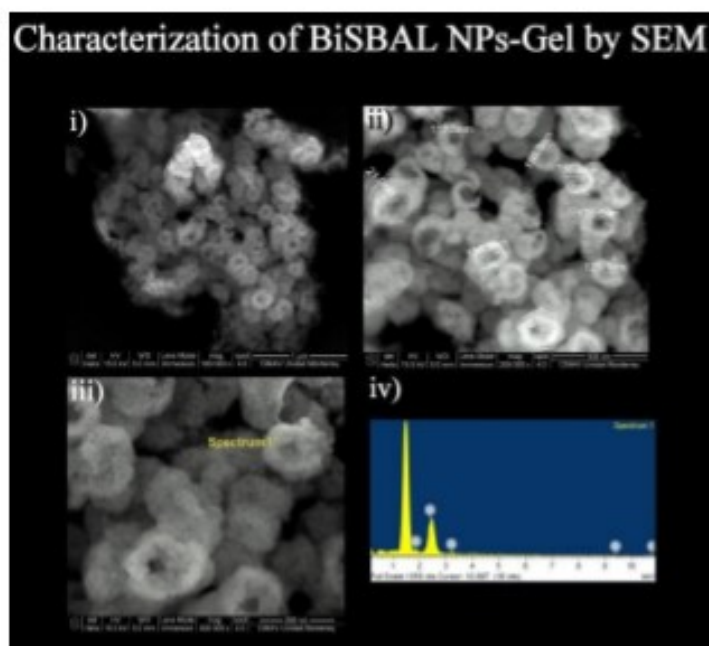
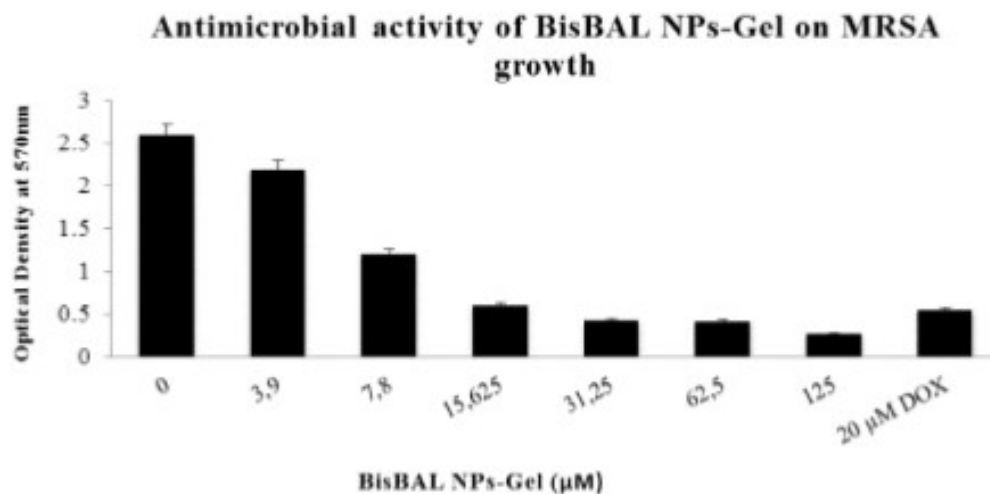


FIGURE 1.4
Characterization of the hydrogel of Bismuth Lipophilic (BisBAL) Nanoparticles by Scanning Electron Microscopy (SEM).

Determination of MIC of BisBAL NPs-Gel on MRSA growth

When Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of BisBAL NPs-Gel was evaluated to interfere with MRSA growth, 125 μM of BisBAL NPs showed the higher inhibition of bacterial growth, leading to 20 μM of Doxycycline as can be seen in the Figure 1.5. The MIC was established in 6 μM of BisBAL NPs as the minimal amount of bismuth nanoparticles gel to block the MRSA growth.

Early reports have been described high antimicrobial activity against MRSA growth using gold and selenium nanoparticles with an apparent low cytotoxicity on mammalian cells^{28,29}. Our findings are agreed with these reports supporting the hypothesis that nanotherapeutics is an innovative way to control MRSA infections.

**FIGURE 1.5**

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of BisBAL nanoparticles against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* growth.

The action mechanism of BisBAL nanoparticles to inhibit the bacterial growth is not well established. Our hypothesis is that bismuth nanoparticles alter the cellular membrane affecting their permeability leading to lysis. This hypothesis is based on early experiments using Calcein AM assays. Calcein AM is a non-fluorescent, hydrophobic compound that easily permeates intact, live cells. The hydrolysis of Calcein AM by intracellular esterases produces calcein, a hydrophilic strongly fluorescent compound that is well-retained in the cell cytoplasm. Maybe BisBAL NPs through their lipophilic property have affinity for cell membrane, penetrating to the cell cytoplasm and breaking down membrane structure. By the other side, we do not have evidence of damage on cell genome or inhibition of protein synthesis after exposition to bismuth nanoparticles.

Antibiofilm activity of BisBAL NPs-Gel on MRSA biofilm

When antibiofilm activity of BisBAL NPs-gel was explored, results showed that 100 µM BisBAL NPs-Gel detached 79% of MRSA biofilm, while Doxycycline removed 86% of cells in comparison with the growing control. Identical results were obtained on MRSA biofilm on boon surface. These results suggest that BisBAL NPs-Gel is as effective as Doxycycline to detach Methicillin-resistant *S. aureus* biofilm (Figure 1.6). Agarwala *et al* reported in 2014 that Copper oxide nanoparticles exhibited antibiofilm and bactericidal properties against MRSA in a dose dependent, however their cytotoxicity on mammalian cells was not explored³⁰.

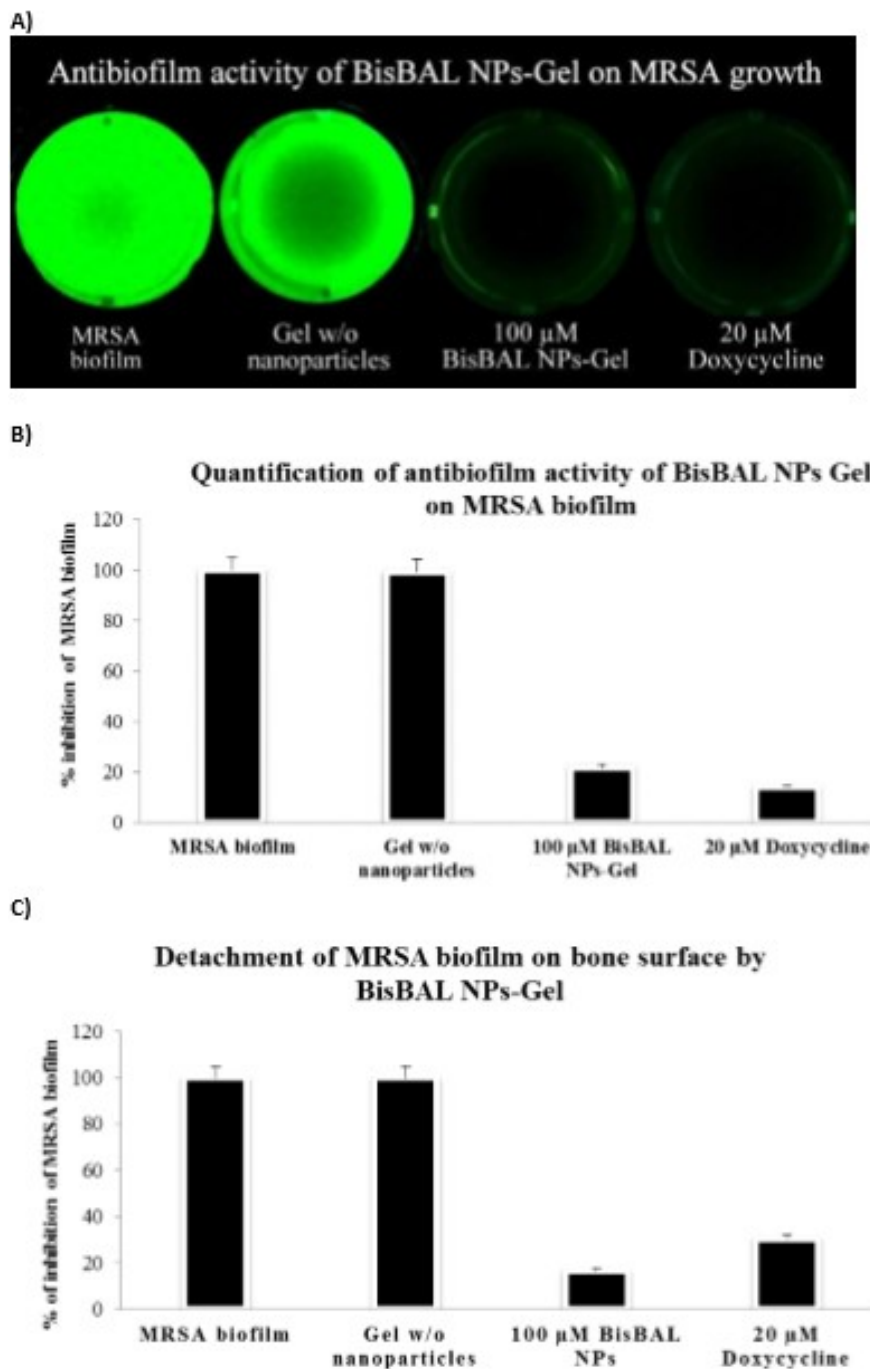


FIGURE 1.6
Antibiofilm activity of BisBAL-NPs-Gel against MRSA *S. aureus* biofilm by fluorescence microscopy.

Cytotoxicity of BisBAL NPs-Gel on Human Gingival Fibroblasts (HGFs)

When cytotoxic effect of BisBAL NPs-Gel was analyze on HGFs results show that 100 μM of BisBAL NPs-Gel decrease only 16% of cell viability after 24h of treatment in comparison with the growing control (Figure 1.7). Previous studies have been described antimicrobial properties of several metals like; silver, gold, zinc, and titanium with very good results⁸⁻¹². However, most of them present high toxicity on human cells, limiting their use in clinical practice¹³⁻¹⁶. Our result is very important because mean that BisBAL NPs-Gel can be used at a final concentration of 100 μM as antimicrobial and antibiofilm drug against MRSA without affect mammalian cells. It is important to mention that bacterial and eukaryotic cells have important differences that may explain why BisBAL nanoparticles inhibit bacterial growth without affect human cells. First of all bacteria is around 10 times smaller than human cells. Following the hypothesis describe above, if BisBAL NPs attach to the cell membrane to penetrate to the cytoplasm altering their permeability, a human cell will require a higher quantity of BisBAL nanoparticles than a bacterial one to get the same effect. This phenomenon will explain the obtained data using 250-1000 μM of BisBAL NPs killing the human gingival fibroblast but remaining cell viability when 5-100 μM of BisBAL NPs were added to cell cultures. This hypothesis is supported by early experiments adding BisBAL nanoparticles to *Trichomonas vaginalis* culture. These parasites have a size similar to eukaryotic cells. 500 μM of BisBAL NPs were required to inhibit with parasitic growth³¹ in comparison with 60-100 μM to block the growing of MRSA.

Cytotoxic effect of BisBAL NPs-Gel on Human Gingival Fibroblasts

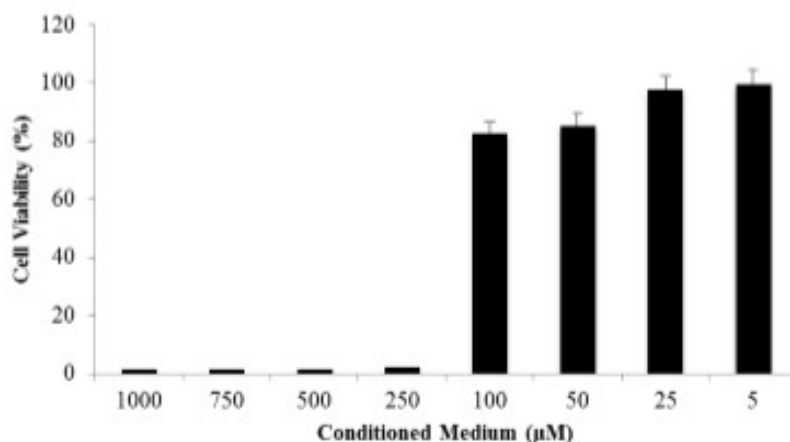


FIGURE 1.7

Cytotoxicity of the hydrogel of BisBAL Nanoparticles on Human Gingival Fibroblasts (HGFs).

Conclusion

Bismuth lipophilic nanoparticles as active ingredient of a hydrogel inhibit the MRSA growth since a

final concentration of 6 μM . 100 μM of BisBAL NPs-Gel detached the bacterial biofilm on dentin model suggesting that BisBAL nanoparticles hydrogel is a non-antibiotic, low cost and safe alternative to fight against MRSA infections. Applied in a topic manner, the BisBAL NPs-Gel provides high local concentrations by delivering bismuth nanoparticles directly to the site of infection avoiding side effects.

Acknowledgements

Authors wish to thank to Nayeli Pineda-Aguilar from CIMAV-Monterrey for their technical assistance in scanning electron microscopy. Claudio Cabral-Romero wants to thanks to CONACyT for financing the project 183825.

References

1. Tacconelli E, Venkataraman L, De Girolami PC, EM DA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia diagnosed at hospital admission: distinguishing between community-acquired versus healthcare-associated strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. Mar 2004;53(3):474-479.
2. Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. May 2001;45(5):1323-1336.
3. Peyrani P, Allen M, Seligson D, et al. Clinical outcomes of osteomyelitis patients infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA-300 strains. *American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)*. Mar 2012;41(3):117-122.
4. Kock R, Becker K, Cookson B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. Oct 14 2010;15(41):19688.
5. Nickel JC, Wright JB, Ruseska I, Marrie TJ, Whitfield C, Costerton JW. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro. *European journal of clinical microbiology*. Apr 1985;4(2):213-218.
6. Desai N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *The AAPS journal*. Jun 2012;14(2):282-295.
7. Nalwa HS. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. In: Nalwa HS, ed. Vol 1-10. Los Angeles, CA American Scientific Publishers; 2004.
8. Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. Mar 2007;3(1):95-101.
9. Huang WC, Tsai PJ, Chen YC. Functional gold nanoparticles as photothermal agents for selective-killing of pathogenic bacteria. *Nanomedicine (London, England)*. Dec 2007;2(6):777-787.
10. Castillo-Mart, #xed, nez JC, et al. Antibacterial and Antibiofilm Activities of the Photothermal Therapy Using Gold Nanorods against Seven Different Bacterial Strains. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015:7.

11. Hsueh YH, Ke WJ, Hsieh CT, Lin KS, Tzou DY, Chiang CL. ZnO Nanoparticles Affect *Bacillus subtilis* Cell Growth and Biofilm Formation. *PLoS one*. 2015;10(6):e0128457.
12. Nataraj N, Anjusree GS, Madhavan AA, et al. Synthesis and anti-staphylococcal activity of TiO₂ nanoparticles and nanowires in ex vivo porcine skin model. *Journal of biomedical nanotechnology*. May 2014;10(5):864-870.
13. Gailliet S, Rouanet JM. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms—a review. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. Mar 2015;77:58-63.
14. Favi PM, Gao M, Johana Sepulveda Arango L, et al. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *Journal of biomedical materials research. Part A*. Apr 22 2015.
15. Czajka M, Sawicki K, Sikorska K, Popek S, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. Aug 2015;29(5):1042-1052.
16. Chen TH, Lin CC, Meng PJ. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of hazardous materials*. Jul 30 2014;277:134-140.
17. Norman NC. *Chemistry of Arsenic, Antimony, and Bismuth*. UK: Blackie Academic and Professional; 1998.
18. Moayyedi P, Soo S, Deeks J, Delaney B, Innes M, Forman D. Pharmacological interventions for non-ulcer dyspepsia. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2006(4):CD001960.
19. Adamian ZN, Abovian HV, Aroutiounian VM. Smoke sensor on the base of Bi₂O₃ sesquioxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1996;35(1-3):241-243.
20. Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Diaz D, et al. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:2109-2113.
21. Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Martinez-Sanmiguel JJ, et al. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:1645-1652.
22. Appala Raju Badireddy SC, Rene Hernandez-Delgadillo, Rosa Isela Sánchez-Nájera and Claudio Cabral-Romero Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014,16:2456.
23. Hernandez-Delgadillo R, Badireddy AR, Zaragoza-Maga, et al. Effect of Lipophilic Bismuth Nanoparticles on Erythrocytes. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015:9.
24. Hernandez-Delgadillo R ARBM-SJ, Contreras-Cordero J F, Martinez-Gonzalez G I, Sánchez-Nájera R I, Chellam S, and Cabral-Romero Claudio. Cytotoxic Effect of Lipophilic Bismuth Dimercaptopropanol Nanoparticles on Epithelial Cells *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;2016(1):203-209.
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. Dec 16 1983;65(1-2):55-63.
26. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*. Aug 1997;69(2):581-593.

27. Carmona-Rodriguez B, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. Jul 6 2007;358(3):763-769.
28. Li X, Robinson SM, Gupta A, et al. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS nano*. Oct 28 2014;8(10):10682-10686.
29. Huang X, Chen X, Chen Q, Yu Q, Sun D, Liu J. Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs. *Acta biomaterialia*. Jan 15 2016;30:397-407.
30. Agarwala M, Choudhury B, Yadav RN. Comparative study of antibiofilm activity of copper oxide and iron oxide nanoparticles against multidrug resistant biofilm forming uropathogens. *Indian journal of microbiology*. Sep 2014;54(3):365-368.
31. Rodríguez-Luis OE, Hernández-Delgadillo R, Pineda- Aguilar, et al., Effect of Bismuth Lipophilic Nanoparticles (BisBAL NPs) on *Trichomonas vaginalis* Growth. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;17: 4618- 4622.