

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA Y ANTIVIRAL DE
NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO CONTRA PATÓGENOS ORALES**

POR

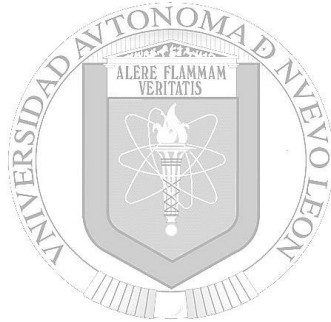
RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**

ENERO

2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA Y ANTIVIRAL DE
NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO CONTRA PATÓGENOS ORALES

Por

RENÉ HERNÁNDEZ DELGADILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Biotecnología

Enero, 2015

ACTIVIDAD BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA Y ANTIVIRAL DE
NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO CONTRA PATÓGENOS ORALES

Comité de tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Presidente

Dr. Claudio Cabral Romero

Co-director

Dra. Myriam Elías Santos

Secretario

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera

Vocal 1

Dr. Benito Pereyra Alférez

Vocal 2

Dra. María del Socorro Flores González

Vocal 3

ACTIVIDAD BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA Y ANTIVIRAL DE
NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO CONTRA PATÓGENOS ORALES

Dirección de Tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Director

Dr. Claudio Cabral-Romero

Director externo

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por darme la vida, la dicha de vivir.

Gracias a mi esposa Angela y a nuestro hijo Marcos por ser mi motor de vida y apoyarme en todo momento.

Agradezco a mis padres, René y Margarita, por ser un ejemplo en mi formación, por apoyarme siempre y estar al tanto de mis necesidades.

Dra. Katiushka Arévalo Niño y al Dr. Claudio Cabral Romero, asesores de mi tesis. Gracias por su dedicación y apoyo constante en la culminación de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Instituto de Biotecnología FCB-UANL y al Laboratorio de Biología Molecular FO-UANL por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

Al grupo de trabajo de la Facultad de Química-UNAM en especial al Dr. David Díaz por abrirme las puertas de su laboratorio y poder trabajar en el desarrollo de síntesis de nanopartículas de bismuto. Agradezco a Inti, Fabián, Donají, José Luis, Jazmín, Cora y Juan por su apoyo incondicional en el tiempo de mi estancia con ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Resistencia antimicrobiana: un problema de salud a nivel mundial.....	5
2.2 Biofilms: un mecanismo de resistencia antimicrobiana.....	12
2.2.1 Infecciones asociadas a la formación de biofilm.....	13
2.3 <i>Streptococcus mutans</i> : principal iniciador de la caries dental.....	18
2.4 <i>Candida albicans</i> : causa principal de moniliasis bucal.....	20
2.5 Infecciones virales en cavidad oral: Herpesvirus.....	22
2.6 Nanotecnología y nanomateriales.....	25
2.6.1 El bismuto: un elemento para diversas aplicaciones.....	29
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares.....	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de bismuto cero-valente (ZV-Bi NPs) y nanopartículas de óxido de bismuto (Bi ₂ O ₃ NPs).....	33
6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....	34

6.2.1 Actividad bactericida de ZV-Bi NPs sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> por el ensayo de MTT.....	34
6.2.2 Actividad inhibitoria de biofilm de ZV-Bi NP sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> por microscopía de fluorescencia.....	35
6.2.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de ZV-Bi NPs sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i>	36
6.3 Actividad antimicótica de Bi ₂ O ₃ NPs sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> por el ensayo de MTT.....	36
6.3.1 Actividad inhibitoria de biofilm de Bi ₂ O ₃ NPs sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> por microscopía de fluorescencia.....	37
6.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de Bi ₂ O ₃ NPs sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	38
6.4 Actividad viricida de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs en un modelo de rotavirus mediante el ensayo de inmunoperoxidasa.....	39
6.5 Análisis de citotoxicidad en células MA-104 con ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs mediante microscopía de fluorescencia.....	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Síntesis y caracterización de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs por método coloidal.....	41
7.2 Evaluación de la actividad bactericida de ZV-Bi NPs mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT y determinación de la CIM.....	42
7.3 Evaluación de la actividad antimicótica de Bi ₂ O ₃ NPs mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT y determinación de la CIM.....	44

7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de biofilm de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Candida albicans</i> por microscopía de fluorescencia.....	46
7.5 Determinación de la actividad viricida de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs en un modelo de rotavirus mediante el ensayo de inmunoperoxidasa.....	48
7.6 Análisis de la citotoxicidad de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs en cultivo celular mediante microscopía de fluorescencia	50
8. DISCUSIÓN.....	52
8. CONCLUSIONES.....	56
9. PERSPECTIVAS.....	57
10. BIBLIOGRAFÍA.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aprobación de nuevos antibióticos por la FDA.....	6
Figura 2. Historia del desarrollo de los antimicrobianos contra la subsecuente adquisición de microorganismos resistentes.....	10
Figura 3. Principales infecciones causadas por biofilms.....	15
Figura 4. Etapas de la formación de biofilms.....	17
Figura 5. La colonización oral bacteriana.....	19
Figura 6. Modelo esquemático indicando la formación del biofilm heterogéneo y el desarrollo de infecciones por <i>Candida albicans</i>	21
Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de alta de resolución de ZV-Bi NPs y su patrón de difracción de rayos X.....	41
Figura 8. Patrón de difracción de rayos-X Bi ₂ O ₃ NPs e imagen en SEM.....	42
Figura 9. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT.....	43
Figura 10. Determinación de CIM ZV-Bi NPs sobre el crecimiento de <i>S. mutans</i>	44
Figura 11. Actividad antifúngica de Bi ₂ O ₃ NPs sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	45
Figura 12. Determinación de CIM Bi ₂ O ₃ NPs sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i>	46
Figura 13. Análisis de la actividad inhibitoria de biofilm <i>S. mutans</i> por microscopía de fluorescencia.....	47
Figura 14. Inhibición del biofilm de <i>Candida albicans</i> detectada por microscopía de fluorescencia después de 24 horas.....	48
Figura 15. Actividad antiviral de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs en un modelo de rotavirus.....	49
Figura 16 y 17. Ensayo de la tinción por inmunoperoxidasa.....	50
Figura 18. Citotoxicidad de ZV-Bi NPs y Bi ₂ O ₃ NPs por microscopía de fluorescencia.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ZV-Bi NPs	Nanopartículas de bismuto cero-valente
Bi ₂ O ₃ NPs	Nanopartículas de óxido de bismuto
mM	Mili molar

RESUMEN

De acuerdo con un anuncio publicado por el NIH (National Institute of Health, EUA), los biofilms o biocapas son un problema de salud pública muy importante en el área médica, ya que representan más del 80% de las infecciones microbianas en el cuerpo humano. Los tratamientos antimicrobianos estándar, típicamente fallan para erradicarlos. Por tanto, existe una creciente necesidad de desarrollo de nuevos fármacos con nuevas y mejores capacidades que puedan controlar a los biofilms. Hoy en día, la nanoterapéutica ofrece opciones innovadoras para controlar enfermedades infecciosas incluyendo la cavidad oral, contrarrestando el crecimiento de microorganismos patógenos tales como, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* y herpesvirus. En el área médica, algunos derivados del bismuto, como el subsalicilato, han sido empleados en el área médica para contrarrestar el vómito, náuseas, diarrea y dolor de estómago. En esta investigación determinamos la actividad antimicrobiana de nanopartículas de bismuto (BiNPs) contra patógenos orales. La actividad antibacteriana y antifúngica lo evaluamos por el ensayo de MTT y microscopía de fluorescencia. Demostramos que las BiNPs inhibieron el crecimiento de *Streptococcus mutans* con un 69% de efectividad así mismo obtuvimos un 85% de inhibición con *Candida albicans*, además fueron capaces de inhibir la formación del biofilm de ambas cepas. Por otra parte, determinamos la actividad antiviral en un modelo de rotavirus mediante el ensayo de inmunoperoxidasa presentando 90% de control de infección con el tratamiento de BiNPs. Finalmente, se evaluó la posible citotoxicidad de BiNPs en células epiteliales de riñón de mono mediante microscopía de fluorescencia y no mostró evidencias de citotoxicidad a 24 horas de exposición.

ABSTRACT

According to the announcement by the NIH (National Institute of Health, USA), biofilms are a major problem in the medical public health, as they represent more than 80% of microbial infections in the body. Standard antimicrobial treatments, typically fail to eradicate. Therefore, there is a growing need to develop new drugs with new and better capabilities that can control the biofilms. At the present time, the nanoterapeutics provide innovative options for controlling infectious diseases including the oral cavity, counteracting the growth of pathogens such as *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and herpesvirus. In medicine, some derivatives of bismuth such as subsalicylate have been employed in the medical field to counteract vomiting, nausea, diarrhea and stomach pain. In this study we determined the antimicrobial activity of nanoparticles bismuth (BiNPs) against oral pathogens. The antibacterial and antifungal activity as assessed by the MTT assay and fluorescence microscopy. BiNPs demonstrate that inhibited the growth of *Streptococcus mutans* in 69% effective likewise obtained 85% inhibition with *Candida albicans*, were also able to inhibit biofilm formation of both strains. Furthermore, we determine the antiviral activity in a model of rotavirus by immunoperoxidase assay presenting 90% infection control treatment BiNPs. Finally, the potential cytotoxicity of BiNPs was evaluated in epithelial monkey kidney cells by fluorescence microscopy and showed no evidence of cytotoxicity at 24 hours of exposure.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar del hecho de que vivimos en una era de tecnologías avanzadas e innovadoras, las enfermedades infecciosas siguen siendo uno de los desafíos de salud más grande en todo el mundo. Los principales inconvenientes de los agentes antimicrobianos convencionales son el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos y los efectos secundarios adversos. La resistencia a los medicamentos impone altas dosis de la administración de antibióticos, a menudo generando toxicidad intolerable (Huh y Kwon 2011). Con la significativa reducción en la inversión en investigación de nuevos antimicrobianos y el desarrollo entre las grandes compañías farmacéuticas, no se producen *nuevas alternativas* de tratamiento con el potencial suficiente para contrarrestar la emergente resistencia entre las bacterias patógenas (Falagas et al. 2006). Después de observar a los primeros microorganismos que fueron encontrados en superficies, se hizo evidente que ellos prefieren crecer en conjunto asociados a comunidades, hoy en día llamado *biofilms* o *biocapas*. Se estima que *aproximadamente el 80 % de todas las infecciones microbianas en el ser humano son causadas por biofilms*, razón por la cual todo nuevo antibiótico debería ser analizado para probar su capacidad eliminadora de tal fenómeno. Actualmente la norma oficial mexicana NMX-BB-040-SFI-1999 (Olvera 2010) que regula la efectividad de toda solución con capacidad antimicrobiana no contempla este punto que es fundamental para demostrar su efectividad.

En las últimas décadas, la nanotecnología ha surgido como una nueva área con diversas aplicaciones, incluyendo la ciencia de los materiales, electrónica, biotecnología, microbiología, entre otros. Las nanopartículas son consideradas normalmente por tener un tamaño no superior a los 100 nm, exhibiendo propiedades muy diferentes que los mismos materiales de la misma composición. En particular, el uso de nanopartículas de plata, cobre, zinc, silicio y sus óxidos han sido considerados importantes por tener efectos antimicrobianos (Allaker 2010). Dentro de la amplia gama de nanomateriales existentes se encuentran las nanopartículas de bismuto (BiNPs), compuesto cuyas características han permitido su aplicación en diferentes ámbitos de la industria química, biología y medicina (Gandolfi et al. 2010; Velasco-Arias et al. 2012; Zlenko et al. 2012).

Bajo este contexto, se propuso determinar en este estudio la actividad bactericida, antimicótica y antiviral de BiNPs (nanopartículas de óxido de bismuto $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ y nanopartículas de bismuto cero-valente ZV-Bi NPs) y que debido a sus propiedades intrínsecas sea una nueva alternativa que combatan y erradiquen enfermedades infecciosas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Resistencia antimicrobiana: un problema de salud a nivel mundial

Los antimicrobianos constituyen la base fundamental del tratamiento de las enfermedades infecciosas, uno de los problemas más frecuentes y causante de la mayor morbimortalidad en cualquier especialidad médica. El conocer la interacción existente entre germen-huésped-antimicrobiano es fundamental para comprender la fisiopatología de las enfermedades infecciosas (Marsh 2010).

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente. No existe un único antibiótico que inhiba todos los microorganismos, por otra parte, la resistencia a los antimicrobianos es una propiedad inherente a prácticamente todos los microorganismos. Los productores de antibióticos son microorganismos que, para poder sobrevivir, desarrollan mecanismos de resistencia que neutralizan o destruyen sus propios antibióticos. La resistencia a los antimicrobianos se puede extender rápidamente si estos genes pasan a otros microorganismos por transferencia horizontal de genes.

Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta (EEUU), la resistencia a los antimicrobianos es muy extensa. Cerca de 2 millones de personas, en Estados Unidos, desarrollan cada año infecciones adquiridas en un hospital, denominadas nosocomiales. Las infecciones nosocomiales tiene un tratamiento difícil, porque hasta el 70% de los microorganismos infecciosos son resistentes a los fármacos

antimicrobianos. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirida en la comunidad, se ha incrementado dramáticamente en los últimos cinco años (Chambers y Deleo 2009), con al menos 50% de las infecciones por *S. aureus* adquiridas intra-hospitalariamente clasificadas como resistentes a meticilina y 30% de enterococos exhibiendo resistencia a vancomicina. En 2010, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América, lanzó su iniciativa 10 x 20, realizando un llamado al comité global para el desarrollo de nuevas drogas antibacterianas, con la meta para sintetizar 10 nuevos antibióticos para el año 2020 (Figura 1). En la década pasada, la crisis de resistencia antimicrobiana empeoró significativamente y existe una urgente necesidad de nuevos agentes antimicrobianos con actividad contra bacterias patógenas resistentes a multidrogas (Stewart y Costerton 2001; Rice 2003).

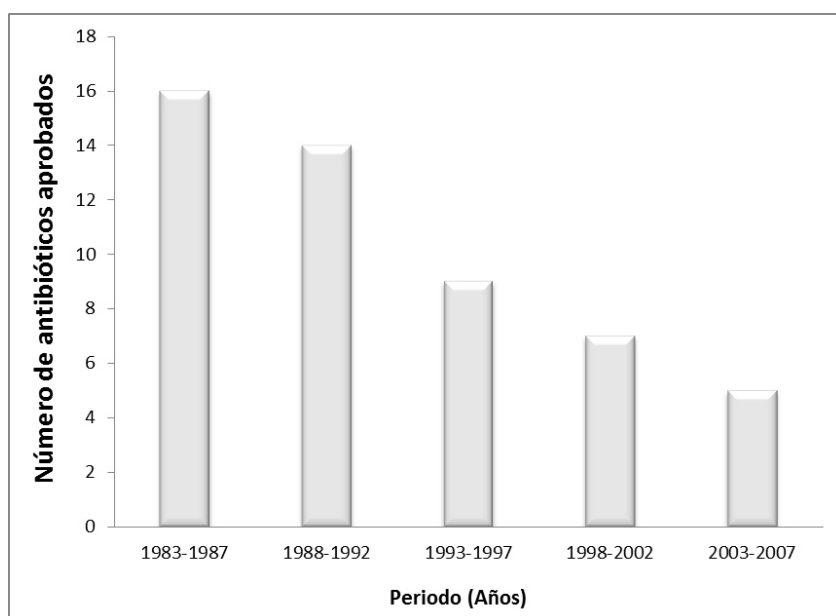


Figura 1. Aprobación de nuevos antibióticos por la FDA (Huh y Kwon 2011)

Existen seis razones por la que los microorganismos pueden ser naturalmente resistentes a ciertos antibióticos: (1) El microorganismo puede carecer de la estructura que es inhibida

por el antibiótico; por ejemplo, algunas bacterias como los micoplasmas carecen de una pared celular típica, por lo que son resistentes de forma natural a las penicilinas. (2) El organismo pueden ser impermeable al antibiótico, como ocurre en la mayoría de las bacterias gramnegativas, que son impermeables a la penicilina G y la platensemicina. (3) El organismo puede alterar el antibiótico inactivándolo. Muchos estafilococos contienen β -lactamasas, unas enzimas que rompen el anillo β -lactámico de la mayoría de las penicilinas. (4) El microorganismo puede modificar la diana del antibiótico. (5) El microorganismo puede desarrollar una ruta bioquímica resistente; por ejemplo, muchos patógenos desarrollan resistencia a las sulfamidas, producción que inhiben la producción de ácido fólico en bacterias. Las bacterias resistentes modifican su metabolismo para captar ácido fólico ya sintetizado del medio, obviando así la necesidad de una ruta que pueda ser bloqueada por las sulfamidas. (6) El microorganismo puede ser capaz de bombear hacia el exterior un antibiótico que haya penetrado la célula. Este proceso se denomina bombas de expulsión activa *efflux* (Levy 2001; Levy y Marshall 2004). La resistencia a antibióticos puede ser codificada genéticamente por el microorganismo, bien en el cromosoma, bien en plásmidos llamados *plásmidos de resistencia o plásmidos R*. Debido a la ya extendida resistencia a antibióticos, y a la aparición de nuevas resistencias, debe determinarse la sensibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas de muestras clínicas, utilizando para ello el método CMI (concentración mínima inhibitoria) o un método de difusión en agar. Las células resistentes a antibióticos se pueden aislar de cultivos realizados a partir de cepas que mostraban una sensibilidad generalizada al antibiótico de elección.

La resistencia de estos aislamientos se suele deber a mutaciones en los genes cromosómicos. En la mayoría de los casos, la resistencia a antibióticos mediada por genes

cromosómicos aparece como una modificación de la diana de acción del antibiótico por ejemplo, un ribosoma. La mayoría de las bacterias resistentes aisladas de pacientes contienen genes de resistencia en plásmidos R, en lugar de en el cromosoma. En estos casos, la resistencia se debe generalmente a la presencia en el plásmido R de genes que codifican enzimas que modifican e inactivan el fármaco, o de genes que codifican enzimas que impiden la captación del fármaco o lo bombean fuera de la célula. Por ejemplo, la estreptomicina, neomicina y kanamicina son antibióticos aminoglucósidos que poseen estructuras químicas similares. Las cepas contienen plásmidos R para estos fármacos producen enzimas que modifican químicamente estos antibióticos, ya sea por fosforilación, acetilación o adenilación. Una vez modificado, el fármaco carece de acción antibiótica. En el caso de las penicilinas, los plásmidos R codifican la enzima *penicilinasa*, una β -lactamasa que rompe el anillo β -lactámico e inactiva así el antibiótico. La resistencia al cloranfenicol se debe a una enzima codificada por el plásmido R que acetila el antibiótico. Muchos plásmidos R contienen varios genes de resistencia diferentes, y pueden conferir resistencia múltiple a una célula que previamente era sensible a cada antibiótico por separado (van Hoek et al. 2011). El uso generalizado de antibióticos en medicina proporciona condiciones altamente selectivas para la propagación de plásmidos R. Los genes de resistencia de estos plásmidos confieren una ventaja selectiva inmediata, y de este modo, la resistencia a antibióticos debida a los plásmidos R se ha convertido en el resultado predecible de la selección natural. Los plásmidos R y otras fuentes de genes de resistencia limitan significativamente el empleo a largo plazo de cualquier antibiótico como agente quimioterapéutico eficaz.

El uso inapropiado de antimicrobianos es la causa principal del rápido desarrollo de resistencias específicas en microorganismos causantes de enfermedades. El descubrimiento y uso clínico de muchos de los antibióticos conocidos ha sido paralelo a la aparición de bacterias resistentes a su acción. Existen numerosos ejemplos que ilustran la relación entre el abuso de antibióticos y el desarrollo de resistencias. Resulta cada vez más frecuente el hecho de tener que cambiar los antimicrobianos prescritos para el tratamiento de una infección concreta por otros antimicrobianos distintos, debido al incremento de resistencias desarrolladas por el microorganismo causante de la enfermedad. Un ejemplo clásico es el desarrollo a la penicilina en *Neisseria gonorrhoeae*, la bacteria causante de la enfermedad de transmisión sexual llamada gonorrea. Antes de 1980, la penicilina era el antibiótico de elección para el tratamiento de esta enfermedad, y se había utilizado de forma interrumpida con este fin desde que se generalizó su uso en 1940. No obstante, la penicilina ya no es un antibiótico útil en el tratamiento de la gonorrea porque un alto porcentaje de los aislamientos clínicos actuales de *Neisseria gonorrhoeae* producen β -lactamasa, lo cual los convierte en resistentes a la penicilina. Prácticamente todos los aislamientos resistentes se han desarrollado desde 1980. El creciente desarrollo de resistencias a la fluoroquinolona en hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres, y en fuentes de infección de Asia, Hawaii y California, ha impulsado un cambio en la recomendación de antibióticos de elección para el tratamiento de la gonorrea.

Actualmente, la ceftriaxona ha sustituido al ciprofloxacino como antibiótico de elección. Los antibióticos todavía se utilizan en medicina con mucha más frecuencia de la que es necesaria. Los datos indican que el tratamiento con antibióticos está garantizado en el 20% de los individuos que acuden al médico por enfermedades infecciosas. Aun así los

antibióticos se prescriben hasta en el 80% de los casos. Además, en el 50% de los casos, las dosis recomendadas o la duración de los tratamientos no son correctas. Esto va acompañado del incumplimiento del tratamiento por parte de la o medicación, especialmente los antibióticos, en cuanto notan una mejoría en su estado. Por ejemplo, la aparición de tuberculosis resistente a la isoniazida muestra una correlación con la interrupción del tratamiento por parte de la persona enferma, que deja de tomar la medicación oral diaria durante períodos de 6 a meses. Los patógenos virulentos están expuestos a dosis subletales de antibióticos por períodos de tiempo inapropiados, y esto provoca la selección de las cepas resistentes al antibiótico.

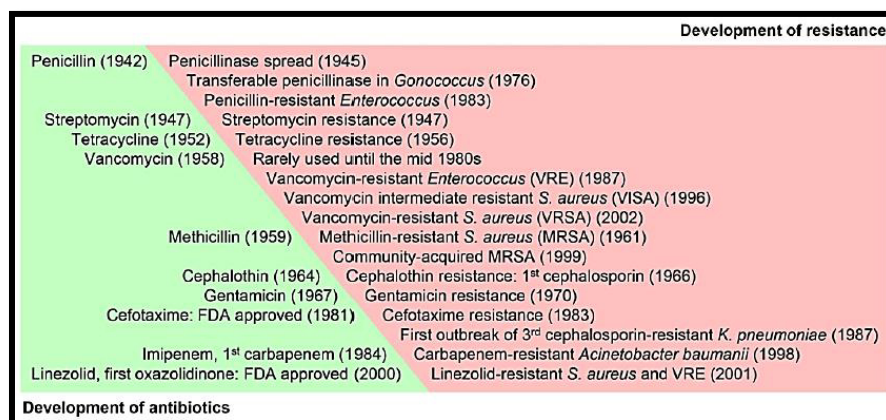


Figura 2. Historia del desarrollo de los antimicrobianos contra la subsecuente adquisición de microorganismos resistentes (Huh y Kwon 2011).

El uso indiscriminado de antibióticos para fines que no son los clínicos también ha contribuido a la aparición de cepas resistentes. Además de su uso tradicional como tratamiento para enfermedades, los antibióticos se utilizan en agricultura y ganadería como suplementos alimenticios que estimulan el crecimiento de los animales, y como aditivos profilácticos que previenen la aparición de enfermedades. Debido a gran parte del empleo inadecuado de antibióticos y a la falta de control sobre las resistencias desarrolladas, casi

todos los patógenos han desarrollado resistencia a algún agente quimioterapéutico desde que comenzó el uso generalizado de quimioterapia microbiana en la década de 1950. La penicilina y las sulfamidas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos utilizados en medicina, ya que no se utilizan de forma tan abusiva porque muchos patógenos han adquirido alguna forma de resistencia (Levy 1998). Incluso los organismos que todavía son uniformemente sensibles a la penicilina, como *Streptococcus pyogenes*, requieren hoy en día dosis más elevadas de penicilina que hace diez años para que el tratamiento surta efecto. Algunos patógenos han desarrollado resistencia a todos los agentes antimicrobianos conocidos. Entre ellos se encuentran varios aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina MRSA (de Lencastre et al. 2007). Aunque el MRSA se asocia habitualmente a los hospitales, también causa un gran número de infecciones comunitarias.

Un número creciente de cepas de MRSA derivadas independientemente han desarrollado una sensibilidad reducida incluso a la vancomicina, y se denominan cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA). Las cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina (VRE) y algunos aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans* también han desarrollado resistencias a todos los antimicrobianos que se conocen (Marchaim et al. 2012; Sotgiu et al. 2013). La resistencia a antibióticos puede minimizarse si estos fármacos se utilizan solamente en el tratamiento de las enfermedades que sean sensibles a ellos, y si se administran en dosis suficientemente elevadas y durante períodos de tiempo lo bastante largos como para reducir la población microbiana antes de que puedan aparecer mutantes resistentes. Dicha resistencia también puede reducirse combinando dos agentes quimioterapéuticos no relacionados, ya que es poco probable que una cepa mutante resistente a uno de los

antibióticos sea también resistente al otro fármaco. No obstante, existen algunos plásmidos R muy comunes que confieren resistencias múltiples a los microorganismos, por lo que la antibioticoterapia múltiple está dejando de aplicarse como estrategia clínicamente útil. Algunos informes sugieren que, si se suspende el empleo de un antibiótico determinado, la resistencia a dicho antibiótico desaparecerá en unos años. Por otra parte, los organismos resistentes a antibióticos pueden sobrevivir en el intestino durante algún tiempo. Estos datos indican que la eficacia de algunos antibióticos puede restablecerse eliminando su uso durante algún tiempo, pero esto sólo puede hacerse siguiendo un plan muy controlado de uso responsable cuando se reintroduzcan dichos fármacos (Madigan y Brock 2009).

2.2 Biofilms: un mecanismo de resistencia antimicrobiana

Aunque los genes de resistencia y sus productos son los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos, *existen otros menos explorados, como el relacionado con la producción de biofilms*. Los biofilms son agregados adherentes que se forman en superficies bióticas o abióticas (Callow y Callow 2006). Se ha demostrado que las cepas que producen *biofilms son significativamente más resistentes a antibióticos* (Gilbert et al. 2002; Stewart 2002). Esta forma de crecimiento bacteriano contiene células genéticamente sensibles y refractarias a muchos antibióticos, pero no a todos (Lewis 2001). Se han propuesto tres mecanismos por los cuales los biofilms contribuyen a la resistencia. Primero, se ha postulado que las células bacterianas embebidas en matrices de polisacáridos que constituyen el biofilm son menos accesibles a la difusión del antibiótico (Anderl et al. 2000). La segunda razón es que se trata de una forma indiferenciada del fármaco a causa de

los nutrientes y otros limitantes, pues muchas células bacterianas dentro del biofilm no se replican ni metabolizan lo suficiente para que el antibiótico funcione de manera eficaz (Gilbert et al. 1990; Anderl et al. 2003). La tercera hipótesis, y actualmente la más apoyada, es que las bacterias dentro de los biofilms se diferencian a estados refractarios a los antibióticos; es decir, una combinación de indiferencia y persistencia al fármaco (Southey-Pillig et al. 2005). Esto debe considerarse en el tratamiento. Por ejemplo, *P. aeruginosa* produce biofilm donde los antibióticos, como las fluoroquinolonas, penetran más fácil en comparación con los aminoglucósidos, pues éstos se unen a polímeros como el alginato (Walters et al. 2003), además de considerar interacciones muy importantes, como la de los aminoglucósidos como inductores de la formación de biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*, lo que exacerba la resistencia (Hoffman et al. 2005).

2.2.1 Infecciones asociadas a la formación de biofilm

Hoy en día, el estilo de vida provee más oportunidades a los biofilms de causar problemas a la humanidad. Aunque nosotros a menudo sólo nos fijamos en los biofilms perjudiciales; microorganismos comensales dentro de los biofilms intestinales, piel y cavidad oral pueden también tener efectos positivos por la inhibición de la colonización y el establecimiento de microorganismos patogénicos, y es por eso que ayudan a mantener la salud. Por lo tanto, es importante para nosotros el desarrollo y entendimiento de la formación del biofilm para ayudar a prevenir y/o controlar este desarrollo deseado y subsecuentemente, remover el biofilm perjudicial. Recientemente, los biofilms han sido implicados en muchas condiciones médicas e infecciones. Con el incremento del uso de procedimientos médico-

invasivos, las infecciones que forman biofilm constituyen un importante factor de riesgo para complicaciones postoperatorias. Muchas infecciones crónicas y persistentes, como la endocarditis, osteomielitis, periodontitis, otitis media e infecciones del tracto biliar, han sido atribuidas al desarrollo del biofilm bacteriano (Figura 3).

La formación de biofilm es una secuencia continua y dinámica de eventos que se dividen en cinco distintas etapas de desarrollo (Figura 4). El primer estado es al crecimiento microbiano de células planctónicas (Figura 4a). Estos son entonces transportados a una superficie o interface, conduciendo a la segunda etapa, donde los microorganismos se convierten en asociaciones con una superficie acondicionada formando una monocapa (Figura 4b). Durante esta etapa, las bacterias inicialmente se adhieren a la superficie en una forma reversible, de manera que puedan desprenderse con facilidad y moverse a lo largo de la superficie. Con el tiempo, los microorganismos se adhieren y forman microcolonias en la tercera etapa de la formación del biofilm (Figura 4c), a través de específicas (adhesinas) y no específicas interacciones (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas) en la superficie (Characklis y Marshall 1990; Busscher y van der Mei 1997). La formación de un biofilm maduro, en la etapa cuatro (Figura 4d), los exopolisacáridos (EPS) son esenciales para que la adhesión sea irreversible así como para el desarrollo de la estructura tridimensional que es una característica de un biofilm plenamente formado. Finalmente, las bacterias eventualmente regresan a su estado planctónico a través de la etapa dispersa y separación del biofilm (Figura 4e) (Davies 2003).

Las diferentes etapas de la formación del biofilm han sido descritas para especies gramnegativas como *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* and *Vibrio cholerae*,

sin embargo, se sabe menos acerca de procesos de formación de biofilms para bacterias grampositivas (Davey y O'Toole G 2000).

Table 1. Partial list of human infections involving biofilms.

Infection or disease	Common biofilm bacterial species
Dental caries	Acidogenic Gram-positive cocci (e.g., <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Gram-negative anaerobic oral bacteria
Otitis media	Nontypable strains of <i>Haemophilus influenzae</i>
Musculoskeletal infections	Gram-positive cocci (e.g., staphylococci)
Necrotizing fasciitis	Group A streptococci
Biliary tract infection	Enteric bacteria (e.g., <i>Escherichia coli</i>)
Osteomyelitis	Various bacterial and fungal species—often mixed
Bacterial prostatitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative bacteria
Native valve endocarditis	Viridans group streptococci
Cystic fibrosis pneumonia	<i>P. aeruginosa</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Nosocomial infections	
ICU pneumonia	Gram-negative rods
Sutures	<i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Exit sites	<i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Arteriovenous shunts	<i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i>
Scleral buckles	Gram-positive cocci
Contact lens	<i>P. aeruginosa</i> and Gram-positive cocci
Urinary catheter cystitis	<i>E. coli</i> and other Gram-negative rods
Peritoneal dialysis (CAPD) peritonitis	A variety of bacteria and fungi
IUDs	<i>Actinomyces israelii</i> and many others
Endotracheal tubes	A variety of bacteria and fungi
Hickman catheters	<i>S. epidermidis</i> and <i>C. albicans</i>
Central venous catheters	<i>S. epidermidis</i> and others
Mechanical heart valves	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>
Vascular grafts	Gram-positive cocci
Biliary stent blockage	A variety of enteric bacteria and fungi
Orthopedic devices	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>
Penile prostheses	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>

Figura 3. Principales infecciones causadas por biofilms (Costerton et al., 1999).

Es de particular interés, como la mayoría de las infecciones relacionadas a implantes son asociados con cepas grampositivas, predominantemente *S. aureus* y enterococos. Aunque cada etapa es caracterizada por la actividad bacteriana, que, en parte, dicta las características estructurales, siendo las bacterias capaces de expresar genes particulares para poder progresar a la siguiente etapa de desarrollo del biofilm. Algunos de estos requerimientos genéticos, además de otros factores que tienen influencia en la formación de biofilm, tales como el ambiente y condiciones físicas, han sido identificadas para un número limitado de especies bacterianas (Stoodley et al. 1998). Se estima que *aproximadamente 65% de todas las infecciones microbianas en humanos son causadas por biofilms* (Costerton et al. 1999). Recientemente, el NIH (National Institutes of Health),

comunicó que los biofilms son un problema de salud pública mundialmente en el área médica, representando más del 80% de las infecciones microbianas en el cuerpo humano (Davies 2003). Con el incremento del uso de procedimientos médico-invasivos, las infecciones que forman biofilm, constituyen un importante factor de riesgo para desarrollar complicaciones postoperatorias. Muchas infecciones crónicas y persistentes (Figura 3), como la endocarditis, osteomielitis, periodontitis, otitis media e infecciones del tracto biliar, han sido atribuidas al desarrollo del biofilm bacteriano (Costerton et al. 1995; Costerton 1999). Hoy en día, el estilo de vida provee más oportunidades a los biofilms de causar problemas a la humanidad. Entre los biofilms frecuentemente más detectados se incluyen el de la placa dental o dentobacteriana (ten Cate 2006)(Figura 3). Anton van Leeuwenhoek fue el primer científico que observó a los microorganismos en 1683 y una de las muestras que examinó por primera vez, fue su placa dentobacteriana. En el área clínica, los biofilms han sido ante todo relacionados a infecciones a la colocación de implantes, sin embargo, los médicos se han dado cuenta que las infecciones asociadas a los tejidos son causadas por microorganismos (entre ellos bacterias y hongos) que crecen en biofilms. Ellos contienen microcolonias de bacterias encerrados en una matriz de exopolisacáridos (EPS) y son resistentes al curso normal del tratamiento con antimicrobianos. Estas incluyen muchas infecciones nosocomiales asociadas a los implantes, que a menudo son causadas por *S. epidermidis*, *S. aureus* y Enterococos poco frecuentes como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Algunos ejemplos de infecciones causadas por biofilms se incluyen: la caries dental, periodontitis, otitis media, infecciones en el tracto biliar, osteomielitis, endocarditis y prostatitis (Figura 3). La formación del biofilm en medicina, puede proceder a través de

diferentes estadios de desarrollo y requerimientos genéticos. Consecuentemente, muchas caracterizaciones *in vitro* y estudios deben ser validados *in situ* y estudios *in vivo*. Este contraste es más obvio en las pruebas de sensibilidad de antimicrobianos, donde el biofilm no puede ser erradicado con la misma concentración de antibióticos en la fase logarítmica comparando con células planctónicas (Nickel et al. 1985). Las infecciones nosocomiales desarrolladas por biofilms, crean una carga económica enorme en países desarrollados (Plowman 1999).

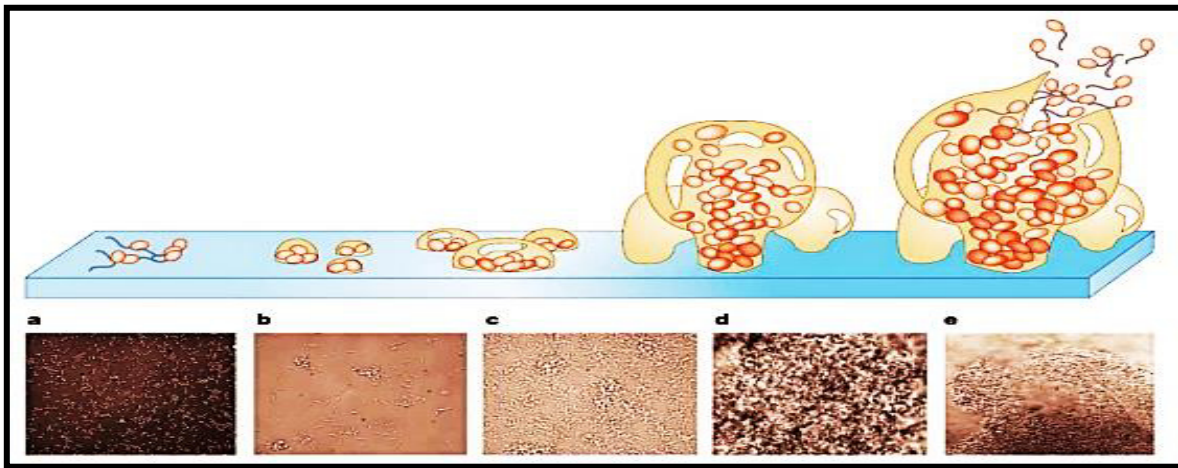


Figura 4. Etapas de formación de biofilms (Davies 2003).

2.3 *Streptococcus mutans*: principal iniciador de la caries dental

La caries dental es considerada como una de las enfermedades más prevalentes e infecciosas en el ser humano (Selwitz, et al. 2007) Se define como una desmineralización localizada en el esmalte dental de ácidos producidos por bacterias que fermentan la dieta de carbohidratos. El tratamiento de la enfermedad incluye la remoción del tejido dañado en el

esmalte dental y el reemplazo por un material restaurativo. La caries dental puede ser dividido en dos categorías: caries de corona y caries de raíz (Yoshida et al. 2005).

La etiopatogenia de la caries dental fue propuesta por W. Miller en 1882; según Miller el factor más importante en la patogenia de la enfermedad era la capacidad de gran número de bacterias bucales de producir ácidos partir de los hidratos de carbono de la dieta, hipótesis que sustentó experimentalmente al aislar varios grupos de microorganismos bucales cariogénicos (Miller y Kleinman 1974).

Paul Keyes en 1960, en forma teórica y experimental, estableció que la etiopatogenia de la caries obedece a la interacción simultánea de tres elementos o factores principales: un factor “microorganismo” que en presencia de un factor “sustrato” logra afectar a un factor “diente”. Esta representación se conoce como tríada de Keyes (Zijnge et al. 2010).

La caries dental es una enfermedad infecciosa de naturaleza, compleja, transmisible multifactorial, en la que un amplio grupo de factores biológicos, socio-económicos y culturales interactúan, directa o indirectamente en el establecimiento y desarrollo de los microorganismos cariogénicos incluidos en la comunidad microbiana del biofilm dental (Figura 5) (Beikler y Flemmig 2011). Afecta a la estructura dura de las piezas dentarias y se caracteriza por su desintegración molecular, localizada y progresiva que lleva, si no se detiene su avance natural, a una lesión irreversible (Arirachakaran et al. 2007). La enfermedad caries dental finalmente surge del desequilibrio fisiológico entre el mineral de las piezas dentarias y los constituyentes del biofilm (Zijnge et al. 2010).

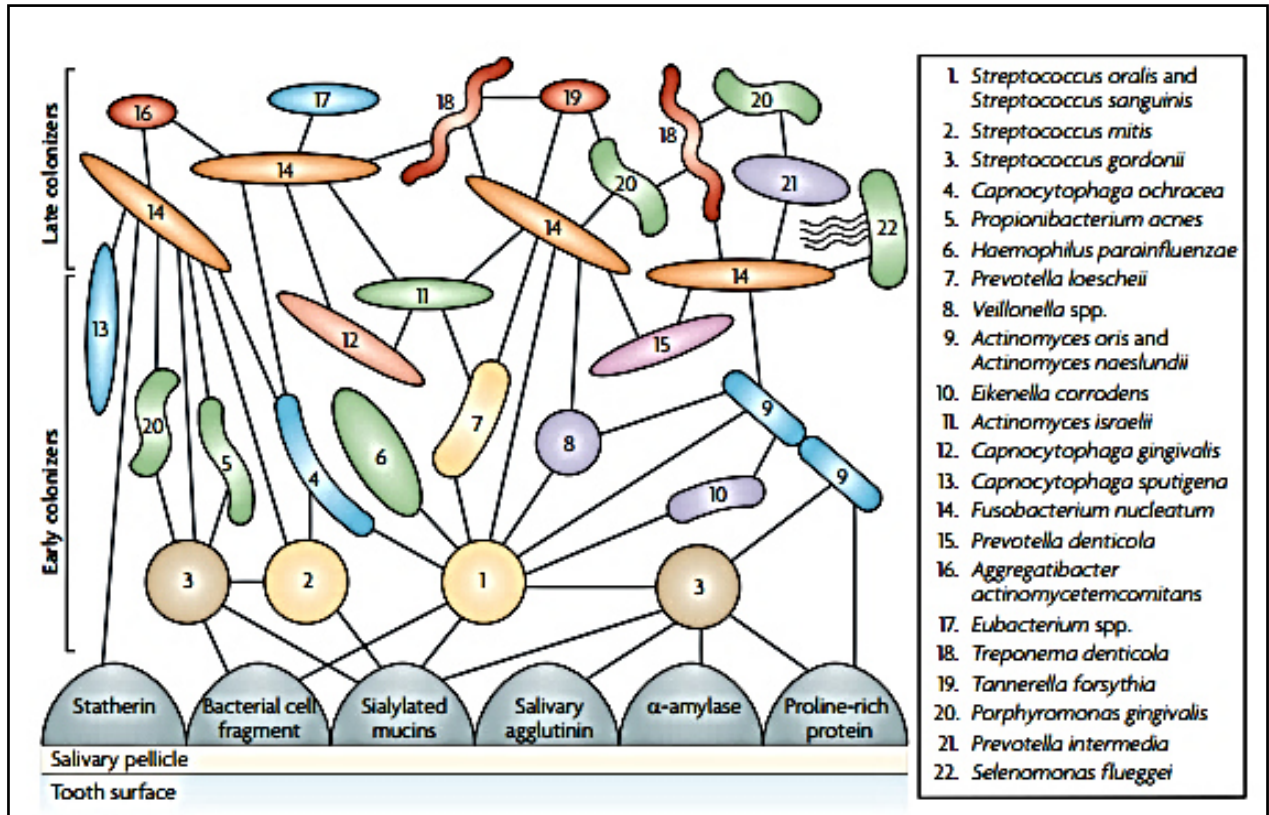


Figura 5. La colonización oral bacteriana. Modelo de la colonización bacteriana oral, mostrando el reconocimiento de receptores de la película salival por bacterias colonizadoras iniciales y coagregados entre colonizadores iniciales, Fusobacterias y colonizadores finales de la superficie del diente (Kolenbrander 2011).

Streptococcus mutans es considerado como el microorganismo cariogénico por excelencia ya que tiene una capacidad especial de colonizar superficies duras como el esmalte dental; se aísla a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva. Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, acidófila (crece en un pH bajo) y acidógena (capacidad de metabolizar azúcares a ácidos). Su papel es importante en el desarrollo de endocarditis subagudas, representando entre 7-14% de todas las originadas por estreptococos (Banas 2004). Sus colonias en agar sangre son α y γ -hemolíticas, y excepcionalmente, β -hemolíticas. En su estructura antigénica hay que destacar que posee los polisacáridos

parietales c, e y f y proteínas asociadas a la mureína conocidos como antígenos I/I que participan en procesos adhesivos: a) adhesinas interactuando con receptores de la película adquirida y b) como glucosiltransferasas y receptoras de glucanos en fenómenos agregativos y coagregativos entre bacterias que colonizan los dientes (Nobbs et al. 2009).

2.4 *Candida albicans*: causa principal de moniliasis bucal

Una de las manifestaciones patógenas más comunes, en personas inmunosuprimidas, de edad avanzada, es la candidiasis. La causa principal de este padecimiento es mediante el microorganismo del género *Candida*, mejor conocido como *Candida albicans* (Chandra et al. 2001). La candidiasis es usualmente asociada a dispositivos médicos como implantes dentales, prótesis artificiales, catéteres, válvulas para el corazón, lentes oculares, entre otros. Estos pueden crear o actuar como un sustrato para el crecimiento de biofilm (Nguyen y Yu 1995). La formación de biofilm de *C. albicans* es importante en el desarrollo estomatitis protésica y manifestaciones superficiales de candidiasis que afectan a más del 65% de individuos edéntulos (Budtz-Jorgensen 1990). *Candida albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados bien con su habilidad para evadir los mecanismos de defensa del hospedador o de resistir al tratamiento antifúngico o bien con su capacidad de lesionar las células y los tejidos que invade. Los factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y en un momento concreto y que determinan el fenotipo y la virulencia. Por lo tanto, no es sorprendente la variabilidad existente en la virulencia entre las cepas e incluso dentro de una misma cepa con relación a la localización corporal donde produzca la

infección Entre los genes conocidos asociados a la virulencia de *C. albicans* están el de la hexosaminidasa (hex1), varios genes de proteasas aspárticas (Sap1, Sap2, Sap3 y Sap4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (aInt1). El proceso de la infección de los tejidos por *C. albicans* presenta varios estadios: a) adhesión y colonización; b) penetración, que se facilita por la transformación levadura-micelio (formación de tubos germinales) y la producción de enzimas hidrolíticas (p. ej. proteasas ácidas o fosfolipasas) y c) respuesta inflamatoria aguda (predominio de neutrófilos y presencia de IgG, IgA, IgM, factores del complemento, linfocitos T y macrófagos) (Gow et al. 2012).

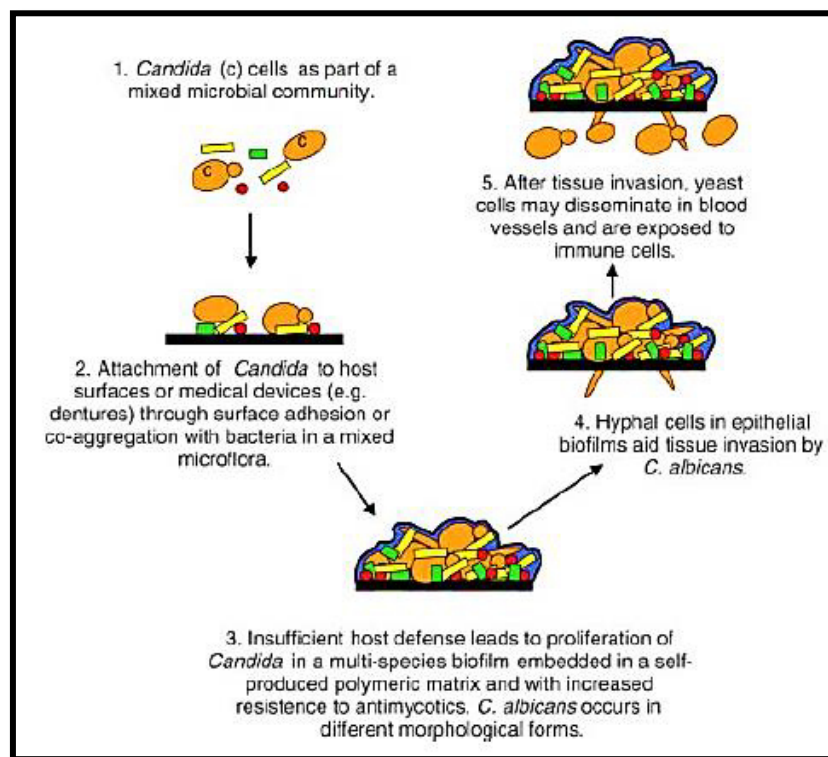


Figura 6. Modelo esquemático indicando la formación del biofilm heterogéneo y el desarrollo de infecciones por *Candida albicans* (ten Cate et al. 2009).

2.5 Infecciones virales en cavidad oral: Herpesvirus

El herpes simplex tipo I (del latín herpes, y del griego ἕρπης, «reptar») es una enfermedad infecciosa inflamatoria de tipo vírico, que se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas formadas por pequeñas vesículas agrupadas en racimo y rodeadas de un halo rojo. Es causada por el virus herpes simplex, o virus herpes hominis, de tipo I (VHS-1) que afecta cara, labios, boca y parte superior del cuerpo, y de tipo II (VHS-2) que se presenta más frecuentemente en genitales y parte inferior del cuerpo. Actualmente no existe cura definitiva para el herpes. Sin embargo hay varias formas de tratamiento disponibles para reducir los síntomas y acelerar el proceso de curación de las lesiones, tras el cual el virus persistirá de forma latente en el organismo hasta la reaparición del siguiente episodio activo. Los tipos de herpes simple han de distinguirse del herpes zóster que es una entidad nosológica totalmente distinta (Farrell y Nesland 1977).

Se ha estimado que el 90% de los adultos ha albergado algún virus adquirido como resultado de una infección durante la vida. Muchos virus tienen la propiedad de latencia y pueden residir en los tejidos asintóticamente por el resto de la vida del paciente. Los tejidos orales son un sitio frecuente para la infección primaria sintomática y también la reactivación de virus latentes. La presencia de estos virus llega a ser a menudo evidente en ocasiones cuando se compromete la defensa inmune del huésped. Se puede extender desde episodios cortos de síntomas localizados en individuos por otra parte sanos a problemas prolongados y generalizados en pacientes VIH positivos (Witkowski y Parish 1985).

Los virus poseen un tamaño de 100 a 300 nm y consiste en un núcleo que contiene DNA o RNA rodeado por una capa de proteína (cápside) y pueden causar una gama de enfermedades humanas importantes. Ciertos virus también poseen una capa externa de lipoproteína derivada de las células huésped infectada. Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren la proteína sintetizada por los ribosomas de la célula huésped. La replicación viral es un proceso complejo y abarca varios pasos reconocidos incluyendo absorción/penetración en la célula huésped, descubrimiento, transcripción, síntesis de componentes virales, montaje y, finalmente, liberación de los nuevos viriones.

La infección primaria con VHS-1 ocurre usualmente durante los primeros años de vida y los marcadores de suero de la infección con el virus se encuentran casi universalmente en la población del mundo occidental a partir de los 15 años de edad. Los síntomas clínicos orales están caracterizados por el desarrollo de malestar oral generalizado y de la gingivostomatitis extensa.

La infección secundaria se da por encima del 40% de los individuos positivos con VHS-1. La reactivación del VHS-1 latente se relaciona con una ruptura en la inmunovigilancia local o una alteración en los mediadores inflamatorios locales. Tradicionalmente, se ha pensado que el VHS-1 reactivado migra del ganglio trigeminal a los tejidos periféricos. La reactivación del VHS-1 característico produce el herpes labial, conocido más comúnmente como dolor frío o ampolla de fiebre. Los síntomas de los herpes labiales característicos comienzan con un escozor o una sensación de ardor (pródromo) en una región localizada de los labios en el borde bermellón. El 25% de los episodios no tienen ninguna etapa prodrómica y la lesión se inicia como vesículas.

En el plazo de 48 hrs. las vesículas se rompen para dejar una erosión, que forma una costra posteriormente encima y cura eventualmente en el plazo de 7-10 días. El aspecto clínico es tan característico que el diagnóstico está basado solo en esto. Al menos en caso de necesidad, la presencia de VHS se puede confirmar por el aislamiento del virus en cultivos del tejido o el uso de inmunofluorescencia en un frotis de la lesión. Los factores que predisponen al desarrollo de los herpes labiales en individuos susceptibles incluyen la luz solar, trauma, estrés, fiebre, menstruación y la inmunosupresión. Una protección solar aplicada a los labios puede también ser eficaz en la reducción de la frecuencia de repeticiones inducidas por la luz solar. El uso tópico del Aciclovir o del penciclovir puede reducir la duración del brote. Individuos con repeticiones severas o frecuentes pueden beneficiarse del uso profiláctico del aciclovir sistémico (200 mg dos o tres veces diariamente). La reactivación del VHS-1 puede también producir la ulceración intraoral recurrente. De una manera similar a los herpes labiales, el paciente con una lesión intraoral es usualmente consciente del zumbido prodrómico. La mucosa del paladar duro es el sitio más frecuentemente implicado. También se reconoce que el VHS-1 es asintomático y se vierte periódicamente en la saliva de hasta un 70% de la población por lo menos una vez al mes. Tal vertimiento representa un riesgo de extensión del virus y en parte explica la naturaleza extensa de VHS-1 en la comunidad. La reactivación de VHS-1 también se ha implicado como factor etiológico de la enfermedad periodontal y del eritema multiforme.

2.6 Nanotecnología y nanomateriales

Durante mucho tiempo, en la literatura especializada, se ha identificado indistintamente como: coloide, nanopartícula, nanomaterial, clúster, nanoestructura, partículas de tamaño cuántico, partículas-Q, puntos cuánticos y partículas ultrafinas, para distinguir todo material que ha sido preparado y/o caracterizado con tamaños promedios que oscilan entre 1 y 100 nm (Sperling y Parak 2010). La obtención de compuestos con dimensiones nanométricas se remonta a más de una centuria, con los trabajos de M. Faraday en 1850. No obstante, el verdadero impulso a la investigación de los materiales nanoestructurados, tiene poco más de dos décadas. Algo que llama particularmente la atención de las nanopartículas es la diferencia de propiedades químicas y físicas con respecto a los macrocristales. Estas diferencias han obligado a retomar la investigación de muchos compuestos simples que creíamos conocer a la perfección (Poole y Owens 2003; Elaissari 2008). Para ser capaces de comprender el mundo de las dimensiones nanométricas primeramente debemos aprender a obtener materiales con tales dimensiones, y a pesar de que son muchos y muy variados los métodos de preparación de nanopartículas, ninguno ha demostrado ser más sencillo, reproducible y económico que la aproximación coloidal (Patakfalvi et al. 2008; Valle-Orta et al. 2008; Velasco-Arias et al. 2008; Sperling y Parak 2010).

Los metales han sido utilizados por siglos como agentes antimicrobianos: plata (Elechiguerra, Burt et al. 2005), oro (Chamundeeswari et al. 2010), cobre (Ruparelia, Chatterjee et al. 2008), titanio (Gelover et al. 2006) han tenido mayor atención debido a sus diferentes propiedades y espectros. Muchos productos orales como ionómeros dentales y resinas (Herrera et al. 2001) así como las pastas dentales, incorporan hoy en día cúmulos

de plata, citrato de zinc o acetato para controlar la formación de la placa dental. Con respecto a las nanopartículas, las propiedades antimicrobianas de la plata y cobre han sido estudiadas con mayor énfasis y se ha demostrado, que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas en el rango de tamaño de 1-10 nm posee la mayor actividad biocida en bacterias como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (Allaker 2010).

Se sabe que los metales, en su forma no particulada, como el cobre, que es excretado de forma activa y la plata puede tener acumulaciones importantes dentro del cuerpo humano. Sin embargo, la amenaza planteada por estos metales en forma de nanopartículas es desconocido. Estudios in vitro con células epiteliales de pulmón, enterocitos y keratinocitos de la piel, indicaron una marcada diferencia en la susceptibilidad con nanopartículas metálicas de acuerdo al tipo de célula probando plata y óxido de cobre (Allaker y Ren 2008; Allaker 2010). Como resultado de su pequeño tamaño, la actividad antimicrobiana de las nanopartículas pueden ofrecer otras ventajas en el campo biomédico mejorando su biocompatibilidad (Lellouche et al. 2011). Además, parece que las bacterias son mucho menos propensas a adquirir resistencia contra las nanopartículas de metales que los antibióticos (Pal et al. 2007). Se cree que debido a que los metales poseen un mayor espectro contra las bacterias; muchas mutaciones tendrían que ocurrir en los microorganismos para resistir a su actividad antimicrobiana (Weir et al. 2008). Además, se ha encontrado que estos materiales exhiben propiedades químicas, electrónicas, magnéticas y ópticas diferentes a las de un material macrocristalino que tiene la misma composición química, esto debido al confinamiento de los electrones en un volumen limitado, pero también a que en los materiales nanoestructurados la relación superficie-volumen (S/V) aumenta con la disminución del tamaño de partícula (Allaker 2010).

El término de nanomedicina se ha propuesto recientemente por diversas organizaciones del ámbito de la salud, como el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés), refiriéndose a las aplicaciones de la nanotecnología en el tratamiento, diagnóstico, monitorización y control de los sistemas biológicos.

Existen básicamente cinco campos en los que se centra principalmente la nanotecnología:

- desarrollo de nuevos materiales: más fuertes, resistentes y ligeros
- tecnología de información/comunicación: procesamiento de datos; en medicina:
- diagnóstico y tratamiento de enfermedades
- energía: con el fin de ahorrar
- alimentación: riesgos que podría producir este tipo de tecnología en la salud

La nanotecnología ha permitido la posibilidad de disponer de una medicina más predictiva, preventiva y específica, y en definitiva, de ofrecer a cada paciente el tratamiento más adecuado en la dosis justa. A nivel mundial, Estados Unidos es el país que ha apostado más por la nanotecnología, elevándose en los últimos años no sólo el número de artículos científicos e investigaciones que se llevan a cabo en este campo, sino también el número de patentes relacionadas con nanofármacos (Ferrari 2010). Existen tres grupos en los cuales se engloban los nanofármacos: La primera generación agrupa sobre todas las formulaciones liposomales. En este grupo no existen órganos dianas. Los primeros en comercializarse fueron formulaciones de liposomas, como Caelix®, clorhidrato de doxorubicina encapsulado en liposomas con metoxipolietilenglicol (MPEG), utilizado para el tratamiento del cáncer de ovario y de mama. En la clínica están teniendo mucho éxito y se estima que este mercado supone unos 5 billones de dólares. La segunda generación de nanofármacos,

incluyen dianas moleculares. El objetivo es liberar altas concentraciones de fármaco en los tejidos patológicos con el fin de aumentar su efecto en el tumor y también reducir su posible toxicidad (Miele et al. 2009). De hecho, hay miles de nanopartículas “inteligentes”, con capacidad de reconocimiento molecular de células cancerígenas que están en distintas fases de investigación y desarrollo, y que se irán incorporando a la práctica clínica en los próximos años. La tercera generación de nanofármacos se encuentra en desarrollo. Consiste en múltiples partículas (y no de una sola) que trabajarán y actuarán en equipo, por lo que sus capacidades funcionales serían enormes (Tasciotti et al. 2008).

2.6.1 El bismuto: un elemento para diversas aplicaciones

El bismuto es un elemento metálico que pertenece al grupo VA de la tabla periódica y se encuentra en el grupo que contiene el nitrógeno, fósforo, antimonio y arsénico. Los números usuales de oxidación son +3 y +5. En la corteza terrestre se encuentra casi en la misma proporción que la plata y ocupa el lugar número 73 en abundancia. Lo podemos encontrar en forma de sulfuro llamado *bismutinita* (Bi_2S_3); óxido de bismuto llamado *bismita* (Bi_2O_3); de carbonato, la *bismutita* $(\text{BiO})_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y de sulfoteluro, *tetradimita* (Kirk et al. 1998). México es el tercer productor de este metal en el mundo después de China, con alrededor de 970 toneladas en el 2005. El consumo de bismuto se realiza mayoritariamente como productos farmacéuticos, cosméticos, catálisis, pigmentos, electrónica y aleaciones.

En medicina, el subsalicilato y subcitrato de bismuto han sido usado para tratar desórdenes gastrointestinales como náuseas, diarrea, dolor de estómago, úlceras gástricas y duodenales así como terapia para la erradicación de *Helicobacter pylori* (Figuroa-Quintanilla et al. 1993; Briand y Burford 1999). El bismuto es uno de los pocos elementos que poseen la clasificación de “elemento verde” o compuestos no contaminantes compatibles con el medio ambiente; por esta razón este elemento puede sustituir en casi todas sus aplicaciones a los semiconductores hechos a base de elementos tóxicos como el Pb, Cd o Se (Rohr 2002). Con todo y a pesar de que la química de bismuto es una de las más diversas, es una de las menos estudiadas.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente prevalencia de resistencia microbiana a los antibióticos y antimicrobianos en general, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, incluidas las de origen bacteriano que forman biofilm ya que ha sido un fenómeno poco explorado. La caries dental y moniliasis bucal son un problema de salud pública muy importante a nivel mundial. En este trabajo, se propone determinar la actividad antimicrobiana y antibiofilm de nanopartículas de bismuto. La trascendencia de los resultados a obtener sería que las nanoestructuras con actividad biocida podrían usarse en el área médica y dental ya que serían empleados en un antiséptico oral, enjuague o pasta dental y para su uso en la desinfección de superficies presentes en los quirófanos, salas de terapia intensiva, sillones dentales etc.; para desinfectar instrumental como pinzas, sondas, tijeras, grapas quirúrgicas etc.; así como implantes, catéteres, marcapasos, prótesis, entre otros. Adicionalmente, se brindaría una aplicación a un recurso mineral abundante ya que nuestro país, México, es el segundo productor de bismuto solo después de China a nivel mundial. En medicina, el subsalicilato de bismuto ha sido usado para tratar náuseas, diarrea y dolor de estómago, como sistema nanoestructurado, podría tener un amplio impacto en el área médica y atender un problema mundial como lo es la resistencia antimicrobiana. Los resultados esperados, es poder crear un ingrediente activo de amplio espectro, económico para ser incorporados a un enjuague bucal, pasta o gel.

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de bismuto ($\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ y ZV-Bi NPs) presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro contra patógenos orales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad bactericida, antimicótica e inhibitoria de biofilm así como su actividad antiviral de nanopartículas de bismuto (BiNPs).

5.2 Objetivos particulares

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido ($\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$) y de bismuto cerovelente (ZV-Bi NPs).
2. Evaluar la actividad bactericida y antimicótica de ZV-Bi NPs contra *Streptococcus mutans* y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ contra *Candida albicans* por el ensayo de viabilidad celular MTT.
3. Determinar la actividad anti-biofilm de las ZV-Bi NPs contra *Streptococcus mutans* y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ contra *Candida albicans* por microscopía de fluorescencia.
4. Explorar la actividad antiviral de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ en un modelo de rotavirus mediante el ensayo de inmunoperoxidasa
5. Analizar la citotoxicidad de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ sobre células MA-104 por microscopía de fluorescencia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de bismuto cero-valente (ZV-Bi NPs) y nanopartículas de óxido de bismuto (Bi_2O_3 NPs)

Para sintetizar ZV-Bi NPs mediante método coloidal, empleamos nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) como sal de partida y citrato de sodio ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) como agente estabilizador y modificador de superficie. Pesamos 0.00148g de $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ los cuales fueron disueltos en 100 μl de agua para terminar de disolverse en 24 ml de dimetilsulfóxido (DMSO, Baker). Después adicionamos 0.0242 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; la solución resultante se burbujeó durante 15 minutos con argón y después, adicionamos bajo burbujeo y agitación constante, 1 ml de una solución en metanol de borohidruro de sodio (NaBH_4 , Sigma-aldrich) 0.2 M, como agente reductor. La concentración final de $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fue de 2×10^{-3} M. La concentración final de la solución de NaBH_4 fue de 4×10^{-4} M en 0.5 ml de metanol previamente burbujeado con argón (Ar, Praxair). El tamaño, distribución y morfología de las ZV-Bi NPs fueron determinados por microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) JEM 2010 FasTem. La identificación de la estructura cristalina romboedral del bismuto la obtuvimos mediante patrones de difracción de rayos-x en un difractómetro Bruker D-8 Advance usando una radiación $\text{Cu K}\alpha$ (20 mA 40 kV, $\lambda = 1.5418$ Å).

Para la síntesis de Bi_2O_3 NPs, previamente calentamos agua desionizada y burbujeamos con argón por 15 minutos para evitar la carbonatación. Posteriormente, pesamos 0.0247 g de

$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se añadió a 24.5 ml de agua desionizada 18.2 Ω (Milli Q, Thermo Fisher Scientific). La solución fue calentada bajo agitación vigorosa a 80°C. Después, 0.5 ml de una solución de 0.032 M de hidróxido de potasio (KOH, Meyer) fueron añadidos. La concentración final del bismuto y los iones hidróxido fue de 2×10^{-3} M y 6×10^{-3} respectivamente. Durante el proceso de síntesis se burbujeó con argón fue constante. Finalmente, la presencia de un polvo amarillento indicó la formación de Bi_2O_3 NPs. La morfología lo determinamos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) JEOL 1200-EXII 40-120 KV. La identificación de la estructura cristalina monoclinica del bismuto se obtuvo mediante patrones de difracción de rayos-x en un Bruker D2-Phaser diffractometer usando una radiación $\text{Cu K}\alpha$ (10 mA 30 kV, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$).

6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo

Adquirimos las cepas *Streptococcus mutans* UA130 nro. 700611 y *Candida albicans* nro. 90029 procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC). Su activación y crecimiento fue siguiendo las instrucciones del proveedor. Ambas cepas fueron activadas en caldo de tripticaseína de soya a una temperatura de 37°C.

6.2.1 Actividad bactericida de ZV-Bi NPs sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* por el ensayo de MTT

Determinamos la actividad bactericida de ZV-Bi NPs, sobre *Streptococcus mutans* empleando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol MTT (Mosmann 1983) . Previamente, ajustamos la densidad poblacional en una cámara de Neubauer para inocular con 1×10^4 bacterias en un volumen final de 100 μ l de caldo de tripticaseína de soya por pozo utilizando placas de 96 pozos de poliestireno. Añadimos controles negativos solo para el crecimiento de *Streptococcus mutans*, el cual no agregamos ningún agente bactericida. Utilizamos a la clorhexidina a una concentración de 1.2 mM como un control positivo de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans*. Por último, añadimos las ZV-Bi NPs a una concentración de 2 mM. Finalmente, incubamos la placa a 37°C en condiciones aeróbicas por 24 horas. Después, añadimos 10 μ l de la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por pozo homogenizando ligeramente e inncubamos a 37°C durante 2 horas. Después, añadimos 200 μ l de DMSO para disolver el formazan (MTT reducido) pipeteando arriba abajo varias veces. Inmediatamente, utilizamos una lectora de placas de ELISA y cuantificamos a una longitud de onda de 595 nm. Cada experimento se desarrolló por triplicado y las densidades ópticas obtenidas las analizamos empleando estadística descriptiva.

6.2.2 Actividad inhibitoria de biofilm de ZV-Bi NP sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* por microscopía de fluorescencia

Tal como describimos anteriormente, observamos la formación del biofilm mediante microscopía de fluorescencia utilizando un marcador fluorescente (SYTO9 green partiendo

de una dilución 1:10 (40 µl de SYTO 9 y 960 µl de H₂O desionizada 18.2 Ω) para llegar a una concentración final de 20 µM. Agregamos el marcador y se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto directo con la luz. El biofilm lo observamos utilizando un microscopio Carl Zeiss® Z1 AxioInverter con tecnología LED Colibrí® (Thornwood, NY) a una longitud de onda de 485nm.

6.2.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de ZV-Bi NPs sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*

Para la obtención de la CIM fue necesario primeramente determinar al tubo 0.5 de la escala de McFarland 1×10^6 (Andrews 2001). El tubo con la concentración 1×10^6 fue utilizado como referencia inicial (observaciones por turbidez) para determinar la MIC de ZV-Bi NPs. Se incluyeron las siguientes concentraciones de ZV-Bi NPs; 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mM. Se incubó a 37°C durante 18 horas. La CIM se determinó por la presencia o ausencia de turbidez en los diferentes tubos que contenían las ZV-Bi NPs, y fueron cuantificadas las absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm.

6.3 Actividad antimicótica de Bi₂O₃NPs sobre el crecimiento de *Candida albicans* por el ensayo de MTT

Determinamos la actividad antimicótica de Bi₂O₃NPs, sobre *Candida albicans* empleando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol MTT (Mosmann

1983). Ajustamos la densidad poblacional contando las células en una cámara de Neubauer para inocular con 1×10^4 células en un volumen final de 100 μl de caldo de tripticaseína de soya por pozo utilizando placas de 96 pozos de poliestireno. Añadimos controles negativos solo para el crecimiento de *C. albicans*, el cual no se agregó ningún agente antimicótico. Utilizamos a la clorhexidina (20mM) y terbinafina, agente antimicótico, al (100mM) como un control positivo de inhibición del crecimiento de *C. albicans*. Por último, añadimos las $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ a una concentración de 2 mM. Finalmente, incubamos la placa a 37°C en condiciones aeróbicas por 24 horas. Después, añadimos 10 μl de la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por pozo homogenizando ligeramente y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después se añadieron 200 μl de DMSO para disolver el formazan (MTT reducido) pipeteando arriba abajo varias veces. Posteriormente, utilizamos una lectora de placas de ELISA y se cuantificó a una longitud de onda de 595 nm. Cada experimento lo desarrollamos por triplicado y las densidades ópticas obtenidas se analizaron empleando estadística descriptiva.

6.3.1 Actividad inhibitoria de biofilm de $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ sobre el crecimiento de *Candida albicans* por microscopía de fluorescencia

Observamos la formación del biofilm mediante microscopía de fluorescencia marcando con el Dye SYTO9 green (Life Technologies, CA, EUA) (Yue et al. 2001), partiendo de una dilución 1:10 (40 μl de SYTO 9 y 960 μl de H_2O desionizada 18.2 Ω) para llegar a una concentración final de 20 μM . Agregamos el marcador y se dejó reposar por 30 minutos a

temperatura ambiente, evitando el contacto directo con la luz. El biofilm se observó utilizando un microscopio Carl Zeiss® Z1 AxioInverter con tecnología LED Colibrí® (Thornwood, NY) a una longitud de onda de 485nm.

6.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de Bi₂O₃NPs sobre el crecimiento de *Candida albicans*

Como se describió anteriormente, se determinó el tubo 0.5 de la escala de McFarland 1×10^6 (Andrews 2001) para analizar la CIM en *Candida albicans*. El tubo con la concentración 1×10^6 fue utilizado como referencia inicial (observaciones por turbidez) para determinar la CIM de Bi₂O₃NPs. Incluimos las siguientes concentraciones de Bi₂O₃NPs; 2, 1.5, 1, 0.5, 0.25 y mM. Incubamos a 37°C durante 18 horas. La CIM la determinamos por la presencia o ausencia de turbidez en los diferentes tubos que contenían las Bi₂O₃NPs, y fueron cuantificadas las absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm.

6.4 Actividad viricida de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs en un modelo de rotavirus mediante el ensayo de inmunoperoxidasa

Para determinar la actividad viricida de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs, cultivamos células de riñón de mono (MA-104, ATCC CRL-2378) en medio mínimo esencial (MEM, Biowest) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Biowest) al 3 % a una temperatura de 37 ° C con 5 % de CO₂ en placas de 96 pozos durante dos días para formar una monocapa confluyente. La suspensión de rotavirus humano Wa (1:8) con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5 se activó previamente con tripsina al 1% y fue incubada a 37°C durante 30 minutos. A continuación, a una concentración de 2 mM de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs, así como la sal de partida (Bi(NO₃)₃.5H₂O), incubamos con la suspensión viral durante 1 hora a 37°C de manera independiente. La suspensión viral/BiNPs fue mezclada con MEM sin suero y añadida a la monocapa confluyente celular durante 1 hora. Más tarde, se reemplazó por MEM suplementado con 3 % de SFB y se incubaron a 37 ° C y 5 % de CO₂ durante 14 horas. Posteriormente, las unidades formadoras de focos (UFF) de rotavirus fueron observadas mediante el ensayo de tinción con inmunoperoxidasa (IPS) (Weber et al. 1992; Gutierrez et al. 2010). Las células las fijamos con acetona al 80%, más 5X de PBS durante 40 minutos para permeabilizar las células. Una vez añadido el anticuerpo primario anti-Was rotavirus (1:700) incubamos a 37 ° C y 5 % de CO₂ durante 1 hora. Más tarde, añadimos la proteína peroxidasa de rábano HRP (1:1500) anti-conejo e incubamos a 37 ° C y 5 % de CO₂ durante 1 hora. Finalmente, añadimos 100 µl/pozo del sustrato carbazol. La placa se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Contamos el número de unidades formadoras de focos (UFF) utilizando un microscopio

óptico y comparamos con las células infectadas sin tratamiento con *ZV-Bi NPs* y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$. El experimento lo realizamos por triplicado y los datos se analizaron mediante estadística descriptiva.

6.5 Análisis de citotoxicidad en células MA-104 con ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ mediante microscopía de fluorescencia

Cultivamos 1×10^5 células (MA-104) en medio mínimo esencial (MEM, Biowest), suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB, Biowest) y antibióticos 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina y 100UI de penicilina (Gibco), a 37°C con 5% de CO_2 en placas de 96 pozos por 24 horas. Las células adheridas después de 24 horas, fueron lavadas con solución de fosfato salino (PBS 1X) e inmediatamente, las nanopartículas, las agregamos a la placa con el cultivo celular en monocapa confluyente a una concentración de 2 mM de *ZV-Bi NPs* y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$. El control negativo fueron células sin tratamiento de nanopartículas de bismuto (BiNPs). El tiempo de incubación fue de 24 horas. La morfología celular y la arquitectura del citoesqueleto se observaron por microscopía de fluorescencia y por contraste de interferencia diferencial (DIC). Para observar la fluorescencia, los núcleos en las células se marcaron con DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) para observar el efecto citopático así como indicios de citotoxicidad de *ZV-Bi NPs* y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$.

7. RESULTADOS

7.1 Síntesis y caracterización de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs por método coloidal

Por medio del método de síntesis coloidal pudimos obtener partículas con distribución estrechas de tamaño $3.3 \text{ nm} \pm 0.97 \text{ nm}$ el cual es un tamaño promedio menor a todos los reportados en la literatura. Se muestra el resultado de la difracción de rayos X (Figura 7).

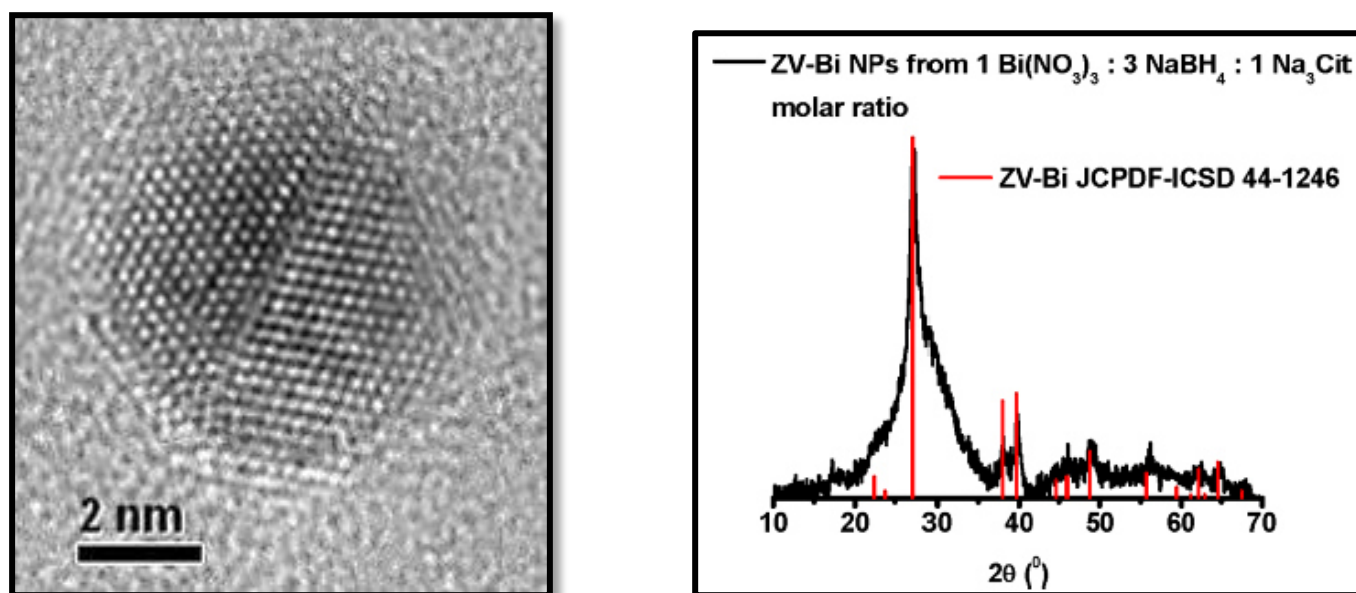


Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de alta de resolución de ZV-Bi NPs y su patrón de difracción de rayos X que indica la identidad del bismuto (JCPDF-ICSD 44-1246) (Velasco-Arias et al. 2012)

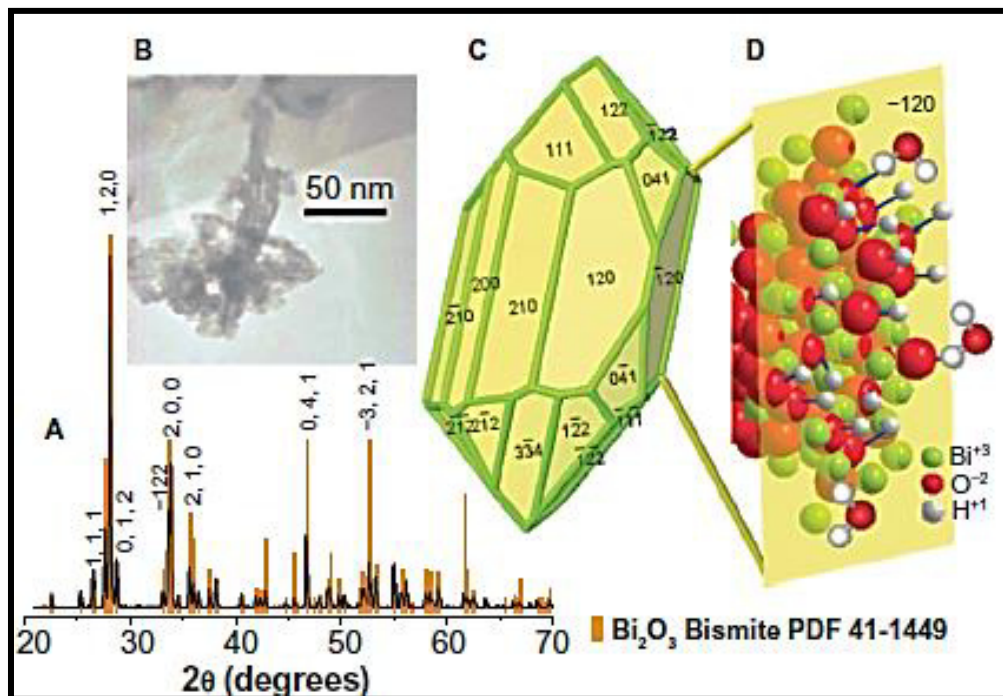


Figura 8. A) Patrón de difracción de rayos-X (PDF 41-1449). B) Imagen de microscopía de transmisión electrónica. C) Modelo de estructura cristalina en forma de aguja. D) Interacciones del bismuto con los iones hidroxilo y moléculas de agua.

La dispersión coloidal de Bi₂O₃NPs tuvo como resultado un polvo amarillento con un tamaño aproximado a 77 nm. El patrón de difracción de rayos X mostró la ausencia de posibles compuestos indeseados al momento de la síntesis como la presencia e carbonatos. Con esto aseguramos que la actividad antimicótica es esencialmente con Bi₂O₃NPs y no con otros elementos (figura 8).

7.2 Evaluación de la actividad bactericida de ZV-Bi NPs mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT y determinación de la CIM

Para poder indagar sobre la posible actividad bactericida de la solución de ZV-Bi NPs, empleamos el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción del MTT. Los resultados obtenidos indican que las ZV-Bi NPs tuvieron un 69% de efectividad de actividad antimicrobiana, comparado con el control de crecimiento. Mientras que la clorhexidina presentó un 63% de efectividad en comparación con el control de crecimiento, tal como podemos apreciar en el siguiente gráfico (Figura 9). Estos datos sugieren fuertemente que las nanopartículas de ZV-Bi NPs poseen una alta actividad antimicrobiana. La CIM fue de 0.5 mM (Figura 10).

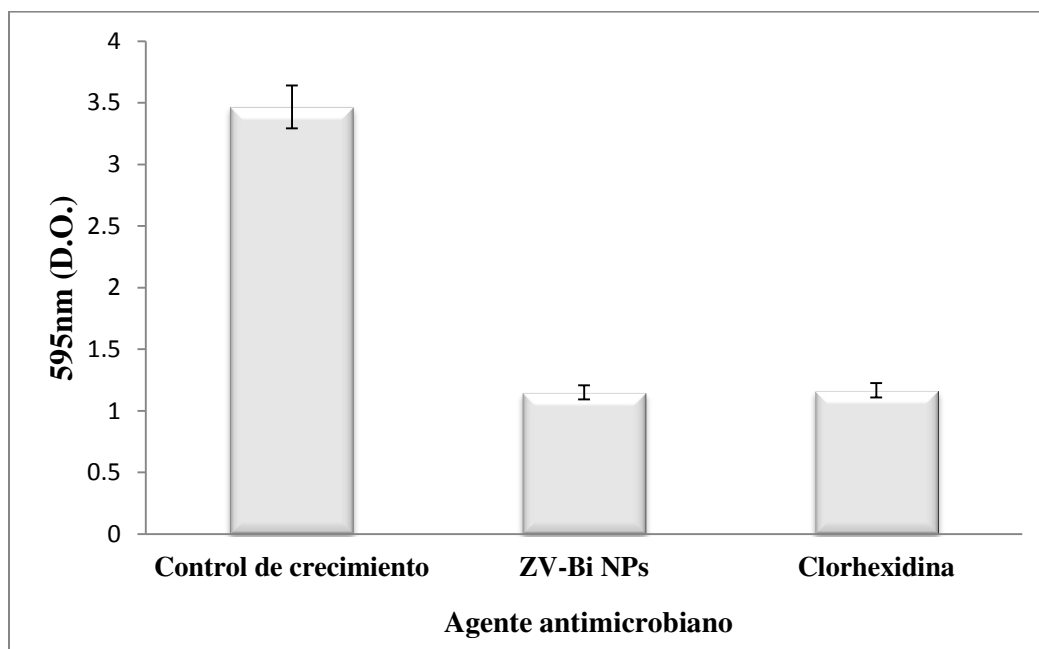


Figura 9. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT. La concentración de ZV-Bi NPs fue 2mM y de la clorhexidina 1.2mM.

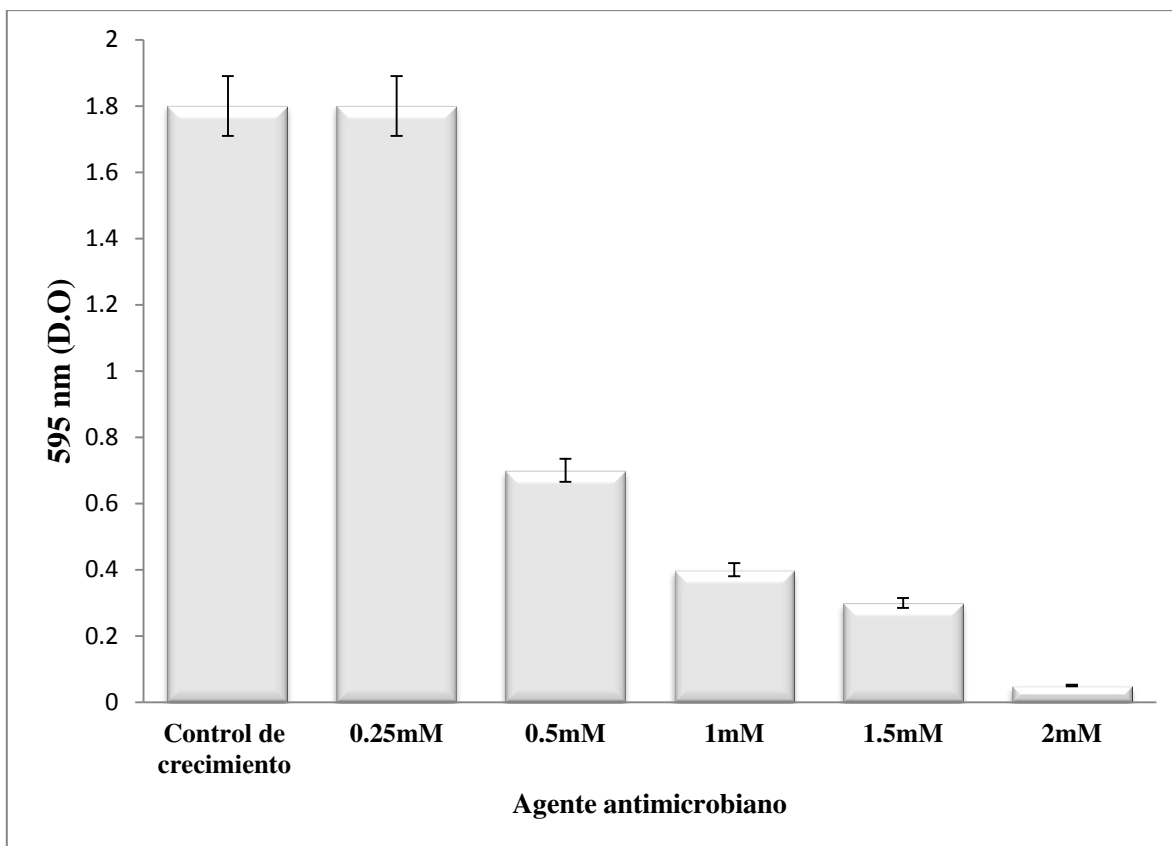


Figura 10. Se determinó la CIM de ZV-Bi NPs sobre el crecimiento de *S. mutans* y fue de 0.5mM.

7.3 Evaluación de la actividad antimicótica de $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ mediante el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT y determinación de la CIM

Para explorar la posible actividad antimicótica de $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$, empleamos el ensayo de viabilidad celular MTT. Los resultados obtenidos mostraron que las $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ tuvieron un 85% de efectividad en comparación con el control de crecimiento. Al mismo tiempo, el

tratamiento con clorhexidina (20mM) y terbinafina (100mM) (controles de inhibición) mostraron un 44% y 51% de reducción en el número de células de *C. albicans* respectivamente. El efecto de Bi₂O₃NPs fue dos veces más efectivo en comparación con el Bi₂O₃ (comercial no nanoestructurado), sugiriendo que la nanoestructura es más efectiva como agente antifúngico (Figura 11). La CIM fue de 1.5 mM (Figura 12).

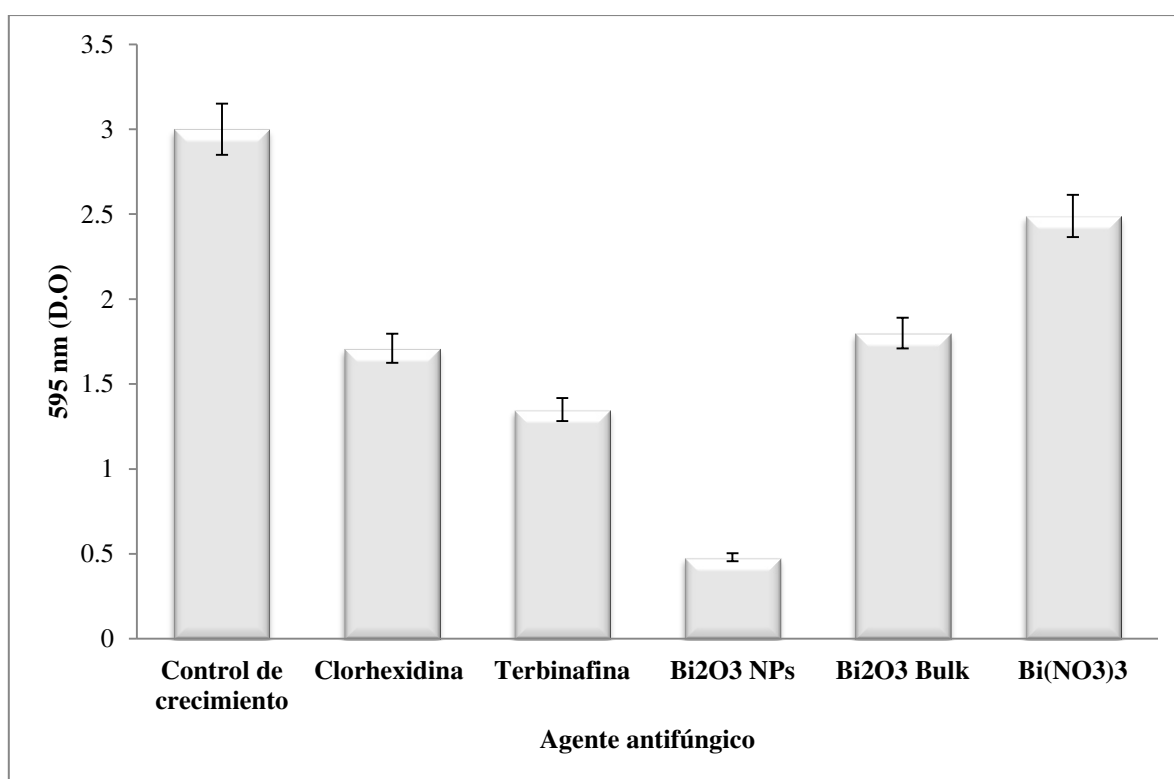


Figura 11. Actividad antifúngica de Bi₂O₃NPs contra el crecimiento de *Candida albicans*.

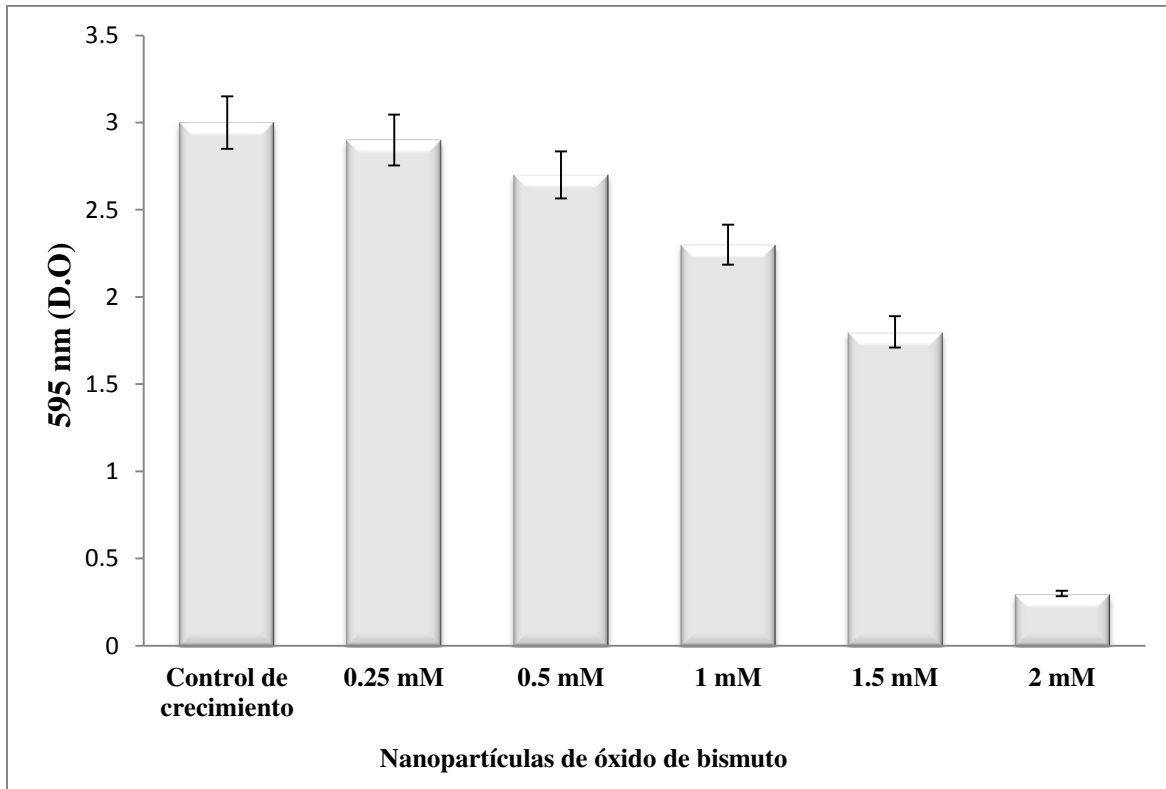


Figura 12. CIM de Bi_2O_3 NPs contra el crecimiento de *C. albicans*. El eje de las x muestra las diferentes concentraciones de Bi_2O_3 NPs analizadas.

7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de biofilm de ZV-Bi NPs y Bi_2O_3 NPs sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* por microscopía de fluorescencia

Para corroborar los resultados obtenidos con el ensayo de MTT, analizamos la capacidad de formación de biofilm de *S. mutans*, al añadir la solución de nanopartículas de ZV-Bi NPs mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran el biofilm obtenido en el control de crecimiento sin añadir ningún agente antibacteriano (Figura 13A).

El control positivo de inhibición de formación de biofilm mostró la ausencia de biofilm al añadir la clorhexidina (1.2mM) (Figura 13B), apreciándose un fondo negro y partículas del marcador. Al añadir la solución de ZV-Bi NPs no detectamos formación de biofilm de *S. mutans*, y solo visualizamos un fondo negro y partículas del marcador fluorescente (Figura 13C).

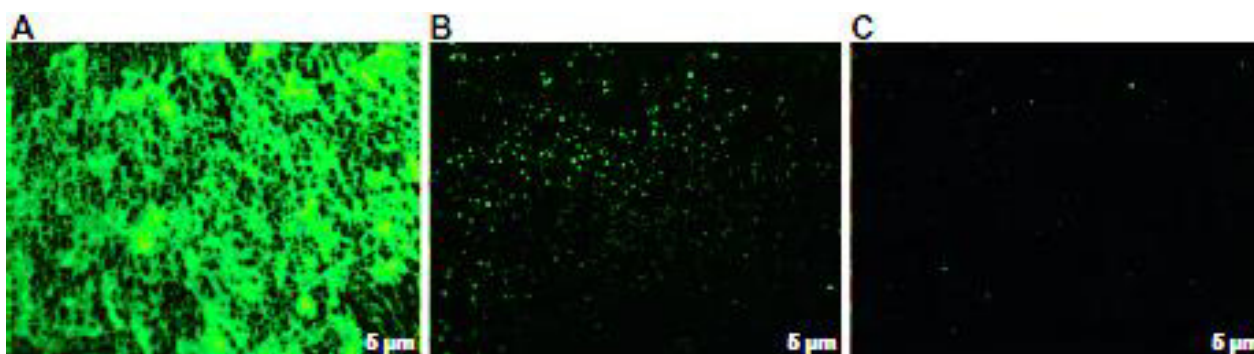


Figura 13. Análisis de la actividad inhibitoria de biofilm por microscopia de fluorescencia. A) Control de crecimiento de biofilm de *Streptococcus mutans*. B) Control positivo de inhibición de biofilm con clorhexidina (1.2mM). C) ZV-Bi NPs a una concentración de 2mM. La barra indica la escala de 5 µm.

Para analizar la posible inhibición del biofilm por *C. albicans* mediante $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ empleamos microscopía de fluorescencia. Los resultados demostraron una completa inhibición de de la formación de biofilm por la clorhexidina (1.2mM) (Figura 14B), terbinafina (100mM) (Figura 14C) y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ (Figura 14D) comparado con el control (Figura 14A). Estos datos indican que $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ tuvieron actividad antibiofilm más efectiva que la clorhexidina y terbinafina.

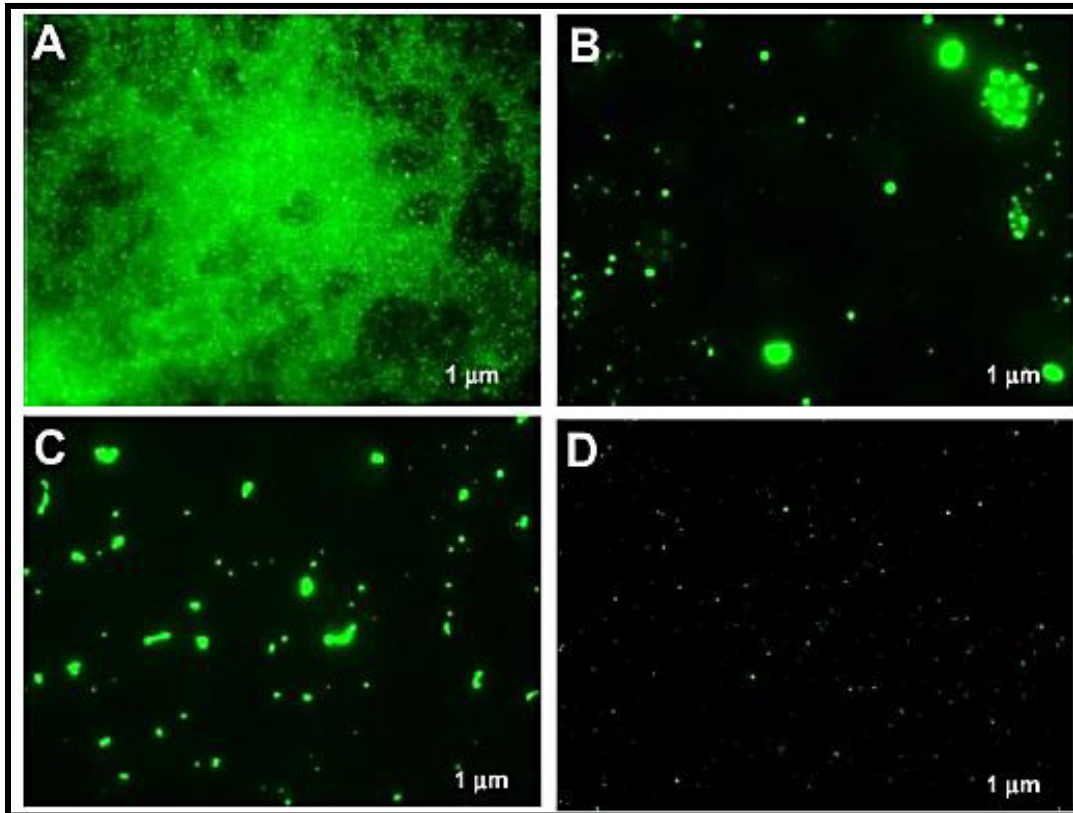


Figura 14. Inhibición del biofilm de *Candida albicans* detectada por microscopía de fluorescencia después de 24 horas. A) Control de crecimiento, B) Clorhexidina, C) Terbinafina y D) $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ a una concentración de 2 mM. La barra indica 1 μm .

7.5 Determinación de la actividad viricida de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ en un modelo de rotavirus mediante el ensayo de inmunoperoxidasa

Analizamos la actividad antiviral de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$; demostramos que ZV-Bi NPs tuvo un 93% y que $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$, presentó un 88% de efectividad contra la infección viral en el modelo de rotavirus (Figura 15, 16 y 17). Ambos fueron comparados con el control (no

tratado), además de incluir a la sal de partida ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para descartar un posible efecto antagonista de la replicación viral. Esto permite afirmar que es necesaria la nanoestructura para que exista un efecto con actividad biológica, en este caso su potencial antiviral.

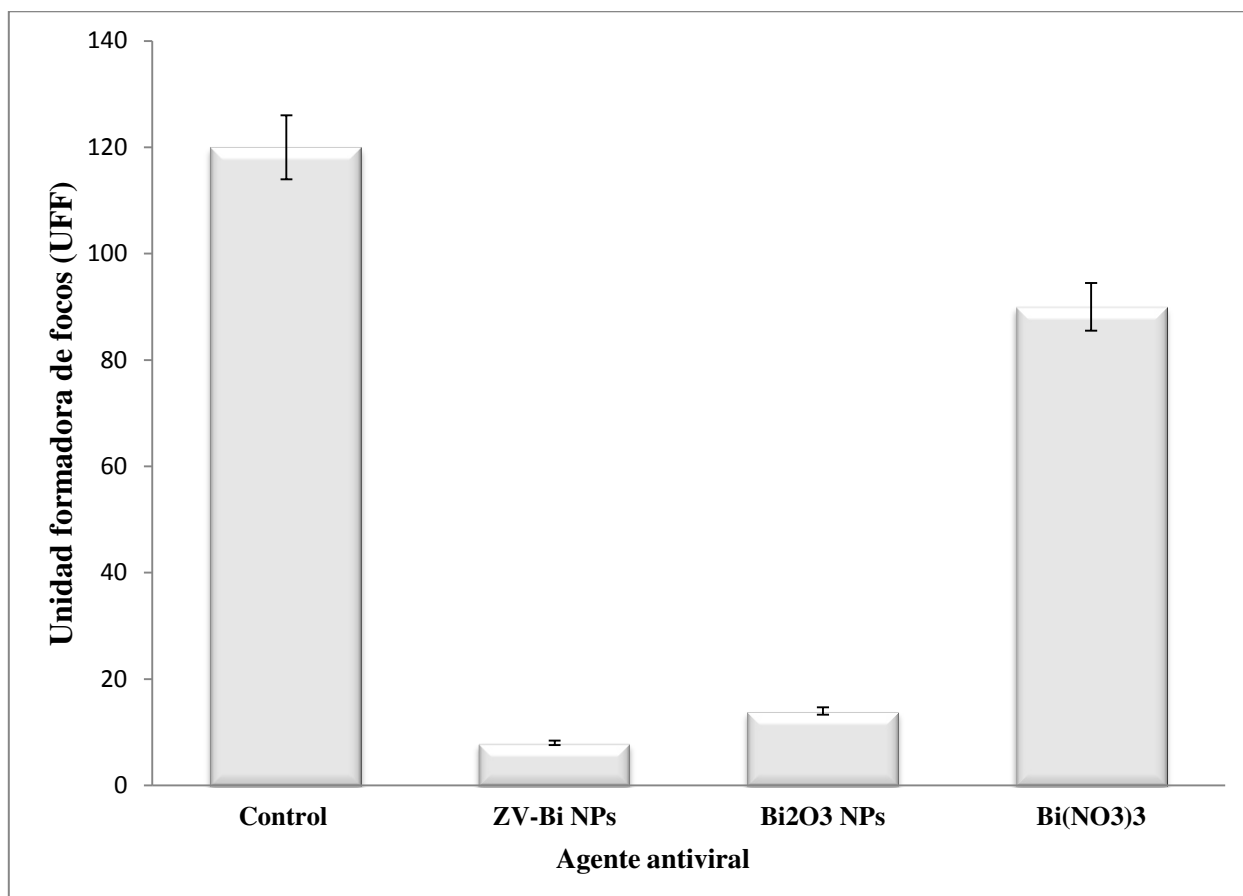


Figura 15. Actividad antiviral de ZV-Bi NPs y Bi_2O_3 NPs contra la replicación de rotavirus.

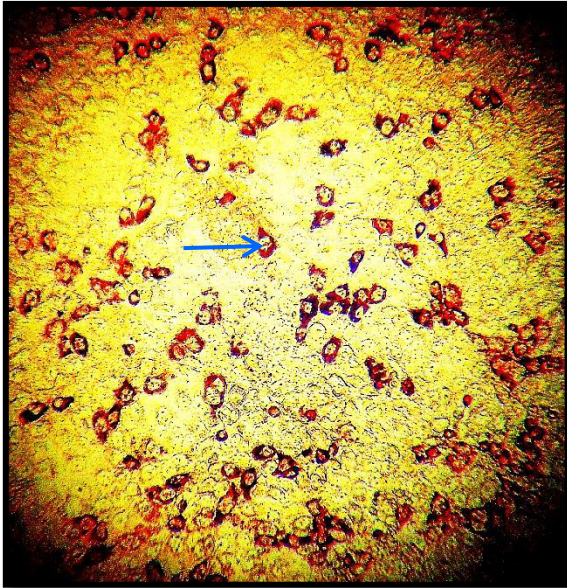


Figura 16. Ensayo de la tinción por inmunoperoxidasa observamos las UFFs. En la periferia de la célula (flecha) apreciamos una coloración rojiza cuyo significado es la infección por rotavirus (Control sin tratamiento).

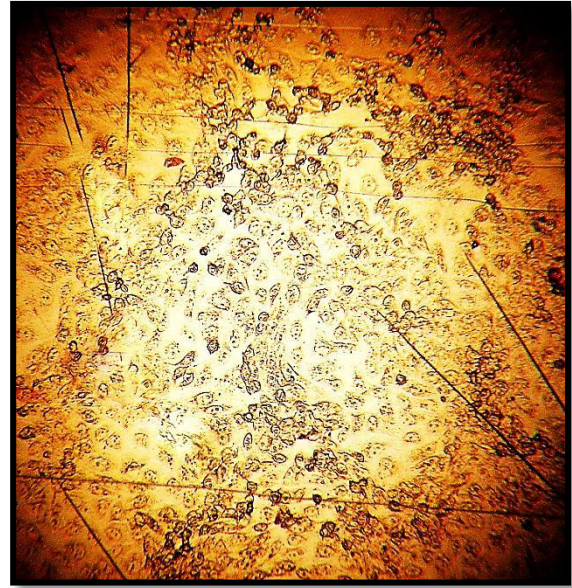


Figura 17. Ensayo de la tinción por inmunoperoxidasa. Ausencia de UFFs debido al tratamiento por ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs.

7.6 Análisis de la citotoxicidad de *ZV-Bi NPs* y *Bi₂O₃NPs* en cultivo celular mediante microscopía de fluorescencia

El efecto citotóxico de *ZV-Bi NPs* y *Bi₂O₃NPs* fue evaluado en células MA-104 por microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que las *ZV-Bi NPs* y *Bi₂O₃NPs* no causaron efectos citotóxicos en las células a 24 horas de exposición comparado con las células que no fueron tratadas. Los núcleos celulares se mostraron muy similares en la presencia o ausencia de *ZV-Bi NPs* y *Bi₂O₃NPs* (Figura 18).

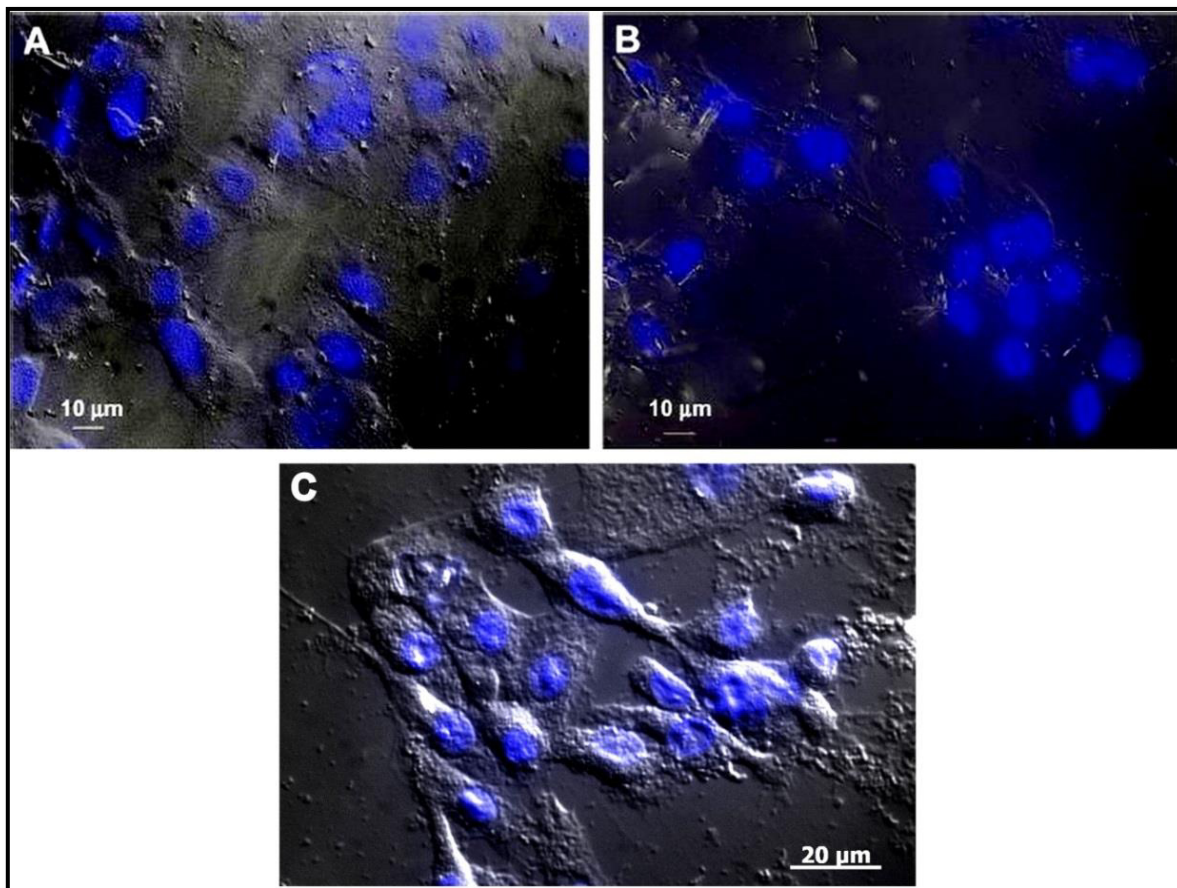


Figura 18. Citotoxicidad de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs detectada por microscopía de fluorescencia. A) Células sin tratamiento. B) Bi₂O₃NPs. C) ZV-Bi NPs.

8. DISCUSIÓN

A pesar del enorme esfuerzo en investigación, generación de fármacos que podemos encontrar en el mercado, la resistencia antimicrobiana sigue en constante aumento (Levy 1995; Levy y O'Brien 2005). El uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos y las incorrectas medidas de higiene en hospitales permiten el surgimiento de nuevas resistencias y la difusión de las existentes (Rutala et al. 1997).

La nanotecnología es una nueva disciplina con diversas aplicaciones en el área de las ciencias biológicas y medicina. Numerosas nanoestructuras han sido empleadas para contrarrestar el crecimiento de microorganismos patógenos al ser humano (Chavez de Paz, Resin et al. 2011; Eshed et al. 2012; Zhukova et al. 2012; Abadi et al. 2013; Adhikari et al. 2013). Las nanopartículas de bismuto son agentes cuya actividad antimicrobiana ha sido un tema poco abordado, sin embargo, en la presente tesis, demostramos la actividad bactericida, antimicótica y antiviral de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs en condiciones netamente *in vitro*.

Existen diversas nanopartículas con actividad bactericida reportada, como la plata, óxido de cobre, selenio, óxido de zinc (Sondi y Salopek-Sondi 2004; Ren et al. 2009; Tran y Webster 2011). En nuestro trabajo, determinamos la actividad bactericida de ZV- BiNPs sobre *S. mutans* obteniendo una efectividad del 69% a una concentración de 2 mM, similar al trabajo de (Lara et al. 2010) que mostro un 55.67% de inhibición sobre *S. aureus* MRSA con nanopartículas de plata y con una dosis mayor de 50 mM. Una característica importante de nuestro trabajo, es poder determinar si las ZV-Bi NPs tuvieron el potencial de interferir

con la inhibición de la formación del biofilm sobre el crecimiento de *S. mutans*, y efectivamente tuvieron la capacidad de contrarrestarlo al igual que otros elementos, pudieron eliminar el biofilm de otros microorganismos (Chavez de Paz et al. 2011; Sun et al. 2012; Besinis et al. 2013). Los resultados de este trabajo apoyan que las nanopartículas de bismuto además de poseer propiedades antimicrobianas, pueden desprender o eliminar el biofilm de *S. mutans*.

Al mismo tiempo, la actividad antimicótica de $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ fue demostrado. El subsalicilato de bismuto, derivado del bismuto, ha sido analizado para tratar infecciones fúngicas sin embargo, no posee dicha actividad (Alharbi et al. 2012), lo que resultan necesarias las nanopartículas para tener efecto antifúngico. Existen diversos reportes de actividad antimicótica de otros elementos como: zinc, titanio y plata (Lipovsky et al. 2011; Tatlıdil et al. 2011; Hwang et al. 2012). Sin embargo, no evalúan la actividad anti-biofilm. *Candida albicans* es un microorganismo oportunista con una mortalidad del 40% en personas ancianas e inmunodeprimidos y es comúnmente asociada a dispositivos médicos, implantes dentales y prótesis, gracias a su gran capacidad formadora de biofilm (Chandra et al. 2001).

Recientemente se reportó la actividad bactericida, antimicótica e inhibitoria de biofilm de nanopartículas de bismuto en microorganismos orales (Badireddy et al. 2014). A diferencia de nuestras nanopartículas (ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$), éstas poseen una característica lipofílicas que las hace más afines a las estructuras bacterianas teniendo mayor interacción con la membrana plasmática (Badireddy et al. 2014). Sus resultados poseen mayor actividad que algunos antibióticos como la vancomicina y rifampicina (Andrews 2001), demostrando mayor actividad en concentraciones menores (Ren et al. 2009; Hernandez-Delgadillo et al. 2012; Hernandez-Delgadillo et al. 2013).

La actividad antiviral de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$, fue analizada en un modelo de rotavirus mediante la tinción por inmunoperoxidasa (Weber et al. 1992). Lo que encontramos fue una inhibición de focos infecciosos, representando un promedio de 90% en comparación con nuestro control con células infectadas. La actividad antiviral de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ podría deberse a una interacción de las nanopartículas con la proteína VP4 de rotavirus, evitando así encontrar su receptor celular y la entrada a la célula para infectarla.

Diversos estudios con nanopartículas de plata han demostrado eficacia contra varios virus, entre ellos VIH, hepatitis B, H3N2, herpes simple, etc. (Lu et al. 2008; Baram-Pinto et al. 2009; Xiang et al. 2013), no obstante, son las más tóxicas (Ahamed et al. 2008; Piao et al. 2011). Existen tres factores cruciales para que las nanopartículas presenten toxicidad: tamaño, forma y composición química (Linkov et al. 2008). En el caso de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$, las partículas introducidas en el medio de cultivo celular, fue significativamente bajo comparado con otros dos derivados del bismuto (Bi_2O_3 comercial y nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)). El posible efecto citotóxico de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ lo exploramos en células MA-104 por microscopía de fluorescencia. En un estudio reciente, evaluaron toxicidad de nanopartículas de plata y quitosano en macrófagos de ratón demostrando daño celular y desfragmentación del ADN a concentraciones de 20 ppm (Jena et al. 2012). Nuestros resultados, en este estudio, no revelaron toxicidad celular por ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ a las 24 horas de exposición bajo nuestras condiciones experimentales previamente descritas. La ausencia de citotoxicidad puede ser atribuida a una cantidad mínima de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$ interaccionando con las células. No detectamos cambios en la morfología del núcleo en presencia o ausencia de ZV-Bi NPs y $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{NPs}$, sin embargo, es necesario emplear otras metodologías que puedan determinar el efecto tóxico

de manera cuantitativa. Hasta el momento no sabemos con exactitud cuál es el mecanismo de acción de BiNPs, por lo que hacen falta estudios enfocados a evaluar en qué nivel actúan (membrana plasmática, ADN o síntesis de proteínas) dichas nanopartículas.

8. CONCLUSIONES

El principal objetivo de esta tesis fue el determinar la actividad antimicrobiana de ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- 1- Reportamos la primera evidencia de actividad bactericida y anti-biofilm sobre el crecimiento de *S. mutans* con ZV-Bi NPs con un tamaño promedio de 3nm.
- 2- Demostramos la actividad antimicótica y anti-biofilm de Bi₂O₃NPs sobre el crecimiento de *C. albicans* con un tamaño promedio de 77nm.
- 3- Las ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs fueron capaces de evitar la infección, por parte de rotavirus, a la línea celular MA-104.
- 4- Las ZV-Bi NPs y Bi₂O₃NPs representan una opción innovadora debido a su amplio espectro y bajo costo, para el tratamiento de contagios virales así como infecciones causadas por biofilms de bacterias y hongos.

9. PERSPECTIVAS

- 1- Analizar el posible mecanismo de acción de BiNPs.
- 2- Explorar la genotoxicidad de BiNPs en fibroblastos humanos.
- 3- Innovar un enjuague oral con el principio activo como tratamiento para combatir enfermedades infecciosas en cavidad oral.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abadi, M. F., S. Mehrabian, et al. (2013). "Silver nanoparticles as active ingredient used for alcohol-free mouthwash." *GMS Hyg Infect Control* 8(1): Doc05.
- Adhikari, M. D., S. Goswami, et al. (2013). "Membrane-directed high bactericidal activity of (gold nanoparticle)-polythiophene composite for niche applications against pathogenic bacteria." *Adv Healthc Mater* 2(4): 599-606.
- Ahamed, M., M. Karns, et al. (2008). "DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 233(3): 404-410.
- Alharbi, S. A., B. H. Mashat, et al. (2012). "Bismuth-inhibitory effects on bacteria and stimulation of fungal growth in vitro." *Saudi J Biol Sci* 19(2): 147-150.
- Allaker, R. P. (2010). "The use of nanoparticles to control oral biofilm formation." *J Dent Res* 89(11): 1175-1186.
- Allaker, R. P. and G. Ren (2008). "Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(1): 1-2.
- Anderl, J. N., M. J. Franklin, et al. (2000). "Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin." *Antimicrob Agents Chemother* 44(7): 1818-1824.
- Anderl, J. N., J. Zahller, et al. (2003). "Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin." *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1251-1256.
- Andrews, J. M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1: 5-16.
- Arirachakaran, P., S. Luengpailin, et al. (2007). "Effects of manganese on *Streptococcus mutans* planktonic and biofilm growth." *Caries Res* 41(6): 497-502.
- Badireddy, A., R. Hernandez-Delgado, et al. (2014). "Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation." *Journal of Nanoparticle Research* 16(6): 1-12.
- Banas, J. A. (2004). "Virulence properties of *Streptococcus mutans*." *Front Biosci* 9: 1267-1277.
- Baram-Pinto, D., S. Shukla, et al. (2009). "Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate." *Bioconjug Chem* 20(8): 1497-1502.
- Beikler, T. and T. F. Flemmig (2011). "Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures." *Periodontol* 2000 55(1): 87-103.
- Besinis, A., T. De Peralta, et al. (2013). "Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine." *Nanotoxicology*.
- Briand, G. G. and N. Burford (1999). "Bismuth Compounds and Preparations with Biological or Medicinal Relevance." *Chem Rev* 99(9): 2601-2658.
- Budtz-Jorgensen, E. (1990). "Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections." *Acta Odontol Scand* 48(1): 61-69.
- Busscher, H. J. and H. C. van der Mei (1997). "Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation." *Adv Dent Res* 11(1): 24-32.
- Callow, J. A. and M. E. Callow (2006). "Biofilms." *Prog Mol Subcell Biol* 42: 141-169.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, et al. (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et al. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284(5418): 1318-1322.

- Chambers, H. F. and F. R. Deleo (2009). "Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era." *Nat Rev Microbiol* 7(9): 629-641.
- Chamundeswari, M., S. S. Sobhana, et al. (2010). "Preparation, characterization and evaluation of a biopolymeric gold nanocomposite with antimicrobial activity." *Biotechnol Appl Biochem* 55(1): 29-35.
- Chandra, J., D. M. Kuhn, et al. (2001). "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance." *J Bacteriol* 183(18): 5385-5394.
- Characklis, W. G. and K. C. Marshall (1990). *Biofilms*, Wiley.
- Chavez de Paz, L. E., A. Resin, et al. (2011). "Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms." *Appl Environ Microbiol* 77(11): 3892-3895.
- Davey, M. E. and A. O'Toole G (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 847-867.
- Davies, D. (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." *Nat Rev Drug Discov* 2(2): 114-122.
- de Lencastre, H., D. Oliveira, et al. (2007). "Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power." *Curr Opin Microbiol* 10(5): 428-435.
- Elaissari, A. (2008). *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*, John Wiley & Sons.
- Elechiguerra, J. L., J. L. Burt, et al. (2005). "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1." *J Nanobiotechnology* 3: 6.
- Eshed, M., J. Lellouche, et al. (2012). "Sonochemical coatings of ZnO and CuO nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation on teeth model." *Langmuir* 28(33): 12288-12295.
- Falagas, M. E., K. N. Fragoulis, et al. (2006). "A comparative study on the cost of new antibiotics and drugs of other therapeutic categories." *PLoS One* 1: e11.
- Farrell, R. G. and R. S. Nesland (1977). "Topical ethyl ether therapy of herpes simplex lesions." *JACEP* 6(8): 372-373.
- Figuroa-Quintanilla, D., E. Salazar-Lindo, et al. (1993). "A Controlled Trial of Bismuth Subsalicylate in Infants with Acute Watery Diarrheal Disease." *New England Journal of Medicine* 328(23): 1653-1658.
- Gandolfi, M. G., G. Ciapetti, et al. (2010). "Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation." *Dent Mater* 26(10): 974-992.
- Gelover, S., L. A. Gomez, et al. (2006). "A practical demonstration of water disinfection using TiO₂ films and sunlight." *Water Res* 40(17): 3274-3280.
- Gilbert, P., D. G. Allison, et al. (2002). "Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?" *Symp Ser Soc Appl Microbiol*(31): 98S-110S.
- Gilbert, P., P. J. Collier, et al. (1990). "Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response." *Antimicrob Agents Chemother* 34(10): 1865-1868.
- Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, et al. (2012). "*Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." *Nat Rev Microbiol* 10(2): 112-122.
- Gutierrez, M., P. Isa, et al. (2010). "Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis." *J Virol* 84(18): 9161-9169.
- Hernandez-Delgadillo, R., D. Velasco-Arias, et al. (2012). "Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm." *Int J Nanomedicine* 7: 2109-2113.
- Hernandez-Delgadillo, R., D. Velasco-Arias, et al. (2013). "Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation." *Int J Nanomedicine* 8: 1645-1652.

- Herrera, M., P. Carrion, et al. (2001). "In vitro antibacterial activity of glass-ionomer cements." *Microbios* 104(409): 141-148.
- Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, et al. (2005). "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." *Nature* 436(7054): 1171-1175.
- Huh, A. J. and Y. J. Kwon (2011). "'Nanoantibiotics': a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era." *J Control Release* 156(2): 128-145.
- Hwang, I. S., J. Lee, et al. (2012). "Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals." *FEBS J* 279(7): 1327-1338.
- Jena, P., S. Mohanty, et al. (2012). "Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells." *Int J Nanomedicine* 7: 1805-1818.
- Kirk, R. E., D. F. Othmer, et al. (1998). *Encyclopedia of chemical technology*, Wiley.
- Kolenbrander, P. E. (2011). "Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source." *Int J Oral Sci* 3(2): 49-54.
- Lara, H., N. Ayala-Núñez, et al. (2010). "Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(4): 615-621.
- Lellouche, J., A. Friedman, et al. (2011). "Improved antibacterial and antibiofilm activity of magnesium fluoride nanoparticles obtained by water-based ultrasound chemistry." *Nanomedicine*.
- Levy, S. B. (1995). "Antimicrobial resistance: a global perspective." *Adv Exp Med Biol* 390: 1-13.
- Levy, S. B. (1998). "The challenge of antibiotic resistance." *Sci Am* 278(3): 46-53.
- Levy, S. B. (2001). "Antibiotic resistance: consequences of inaction." *Clin Infect Dis* 33 Suppl 3: S124-129.
- Levy, S. B. and B. Marshall (2004). "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses." *Nat Med* 10(12 Suppl): S122-129.
- Levy, S. B. and T. F. O'Brien (2005). "Global antimicrobial resistance alerts and implications." *Clin Infect Dis* 41 Suppl 4: S219-220.
- Lewis, K. (2001). "Riddle of biofilm resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 45(4): 999-1007.
- Linkov, I., F. K. Satterstrom, et al. (2008). "Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions." *Nanomedicine* 4(2): 167-171.
- Lipovsky, A., Y. Nitzan, et al. (2011). "Antifungal activity of ZnO nanoparticles--the role of ROS mediated cell injury." *Nanotechnology* 22(10): 105101.
- Lu, L., R. W. Sun, et al. (2008). "Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication." *Antivir Ther* 13(2): 253-262.
- Madigan, M. T. and T. D. Brock (2009). *Brock biology of microorganisms*, Pearson/Benjamin Cummings.
- Marchaim, D., L. Lemanek, et al. (2012). "Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis." *Obstet Gynecol* 120(6): 1407-1414.
- Marsh, P. D. (2010). "Controlling the oral biofilm with antimicrobials." *J Dent* 38 Suppl 1: S11-15.
- Miele, E., G. P. Spinelli, et al. (2009). "Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer." *Int J Nanomedicine* 4: 99-105.
- Miller, C. H. and J. L. Kleinman (1974). "Effect of microbial interactions on in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*." *J Dent Res* 53(2): 427-434.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Nguyen, M. H. and V. L. Yu (1995). "Meningitis caused by *Candida* species: an emerging problem in neurosurgical patients." *Clin Infect Dis* 21(2): 323-327.

- Nickel, J. C., J. B. Wright, et al. (1985). "Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro." *Eur J Clin Microbiol* 4(2): 213-218.
- Nobbs, A. H., R. J. Lamont, et al. (2009). "Streptococcus adherence and colonization." *Microbiol Mol Biol Rev* 73(3): 407-450, Table of Contents.
- Olvera A, J. H., Gómez P. (2010). "Aseguramiento de la calidad en la determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas." *Simposio de Metrología*.
- Pal, S., Y. K. Tak, et al. (2007). "Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 73(6): 1712-1720.
- Patakfalvi, R., D. Diaz, et al. (2008). "Synthesis and direct interactions of silver colloidal nanoparticles with pollutant gases." *Colloid & Polymer Science* 286(1): 67-77.
- Piao, M. J., K. A. Kang, et al. (2011). "Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis." *Toxicol Lett* 201(1): 92-100.
- Plowman, R. (1999). *The Socio-economic Burden of Hospital Acquired Infection, Public Health Laboratory Service*.
- Poole, C. P. and F. J. Owens (2003). *Introduction to nanotechnology*, J. Wiley.
- Ren, G., D. Hu, et al. (2009). "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications." *Int J Antimicrob Agents* 33(6): 587-590.
- Rice, L. B. (2003). "Do we really need new anti-infective drugs?" *Curr Opin Pharmacol* 3(5): 459-463.
- Rohr, O. (2002). "Bismuth – the new ecologically green metal for modern lubricating engineering." *Vol. 54(4): pp.153 - 164*.
- Ruparelia, J. P., A. K. Chatterjee, et al. (2008). "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles." *Acta Biomater* 4(3): 707-716.
- Rutala, W. A., M. M. Stiegel, et al. (1997). "Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants." *Infect Control Hosp Epidemiol* 18(6): 417-421.
- Selwitz, R. H., A. I. Ismail, et al. (2007). "Dental caries." *Lancet* 369(9555): 51-59.
- Sondi, I. and B. Salopek-Sondi (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria." *J Colloid Interface Sci* 275(1): 177-182.
- Sotgiu, G., A. Spanevello, et al. (2013). "History of tuberculosis and drug resistance." *N Engl J Med* 368(1): 88-89.
- Southey-Pillig, C. J., D. G. Davies, et al. (2005). "Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *J Bacteriol* 187(23): 8114-8126.
- Sperling, R. A. and W. J. Parak (2010). "Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles." *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 368(1915): 1333-1383.
- Stewart, P. S. (2002). "Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms." *Int J Med Microbiol* 292(2): 107-113.
- Stewart, P. S. and J. W. Costerton (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *Lancet* 358(9276): 135-138.
- Stoodley, P., I. Dodds, et al. (1998). "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure." *J Appl Microbiol* 85 Suppl 1: 19S-28S.
- Sun, L. M., C. L. Zhang, et al. (2012). "Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol." *J Agric Food Chem* 60(24): 6150-6156.
- Tasciotti, E., X. Liu, et al. (2008). "Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications." *Nat Nanotechnol* 3(3): 151-157.

- Tatlıdil, İ., M. Sökmen, et al. (2011). "Degradation of *Candida albicans* on TiO₂ and Ag-TiO₂ thin films prepared by sol-gel and nanosuspensions." *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 60(1): 23-32.
- ten Cate, J. M. (2006). "Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque." *Odontology* 94(1): 1-9.
- ten Cate, J. M., F. M. Klis, et al. (2009). "Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation." *J Dent Res* 88(2): 105-115.
- Tran, P. A. and T. J. Webster (2011). "Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth." *Int J Nanomedicine* 6: 1553-1558.
- Valle-Orta, M., D. Diaz, et al. (2008). "Instantaneous Synthesis of Stable Zerovalent Metal Nanoparticles under Standard Reaction Conditions†." *The Journal of Physical Chemistry B* 112(46): 14427-14434.
- van Hoek, A. H., D. Mevius, et al. (2011). "Acquired antibiotic resistance genes: an overview." *Front Microbiol* 2: 203.
- Velasco-Arias, D., D. az, et al. (2008). "Direct Interaction of Colloidal Nanostructured ZnO and SnO₂ with NO and SO₂." *J Nanosci Nanotechnol* 8(12): 6389-6397.
- Velasco-Arias, D., I. Zumeta-Dubé, et al. (2012). "Stabilization of Strong Quantum Confined Colloidal Bismuth Nanoparticles, One-Pot Synthesized at Room Conditions." *The Journal of Physical Chemistry C* 116(27): 14717-14727.
- Walters, M. C., 3rd, F. Roe, et al. (2003). "Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin." *Antimicrob Agents Chemother* 47(1): 317-323.
- Weber, B., F. Harms, et al. (1992). "Improvement of rotavirus isolation in the cell culture by immune peroxidase staining." *J Virol Methods* 38(2): 187-194.
- Weir, E., A. Lawlor, et al. (2008). "The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization." *Analyst* 133(7): 835-845.
- Witkowski, J. A. and L. C. Parish (1985). "Candidiasis: the isomorphic response." *Acta Derm Venereol* 65(4): 355-358.
- Xiang, D., Y. Zheng, et al. (2013). "Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo." *Int J Nanomedicine* 8: 4103-4113.
- Yoshida, A., T. Ansai, et al. (2005). "LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation." *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2372-2380.
- Yue, H., P. S. Eastman, et al. (2001). "An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression." *Nucleic Acids Res* 29(8): e41.
- Zhukova, L. V., J. Kiwi, et al. (2012). "TiO₂ nanoparticles suppress *Escherichia coli* cell division in the absence of UV irradiation in acidic conditions." *Colloids Surf B Biointerfaces* 97: 240-247.
- Zijngel, V., M. B. van Leeuwen, et al. (2010). "Oral biofilm architecture on natural teeth." *PLoS One* 5(2): e9321.
- Zlenko, A. S., V. M. Mashinsky, et al. (2012). "Mechanisms of optical losses in Bi:SiO₂ glass fibers." *Opt Express* 20(21): 23186-23200.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

RESUMEN CURRICULAR

René Hernández Delgadillo

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: ACTIVIDAD BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA Y ANTIVIRAL DE
NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO CONTRA PATÓGENOS ORALES

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, hijo de René Hernández González y Margarita Delgadillo Hernández. Casado con Angela Ramírez de Mingo; un hijo, Marcos Hernández Ramírez

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2009.

Número de publicaciones: 3 internacionales

Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm

Rene Hernandez-Delgadillo¹
Donaji Velasco-Arias²
David Diaz²
Katiushka Arevalo-Niño¹
Marianela Garza-Enriquez¹
Myriam A De la Garza-Ramos¹
Claudio Cabral-Romero¹

¹Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDICS, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, UANL, Monterrey, Nuevo Leon, ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México

Background and methods: Despite continuous efforts, the increasing prevalence of resistance among pathogenic bacteria to common antibiotics has become one of the most significant concerns in modern medicine. Nanostructured materials are used in many fields, including biological sciences and medicine. While some bismuth derivatives has been used in medicine to treat vomiting, nausea, diarrhea, and stomach pain, the biocidal activity of zerovalent bismuth nanoparticles has not yet been studied. The objective of this investigation was to analyze the antimicrobial activity of bismuth nanoparticles against oral bacteria and their antibiofilm capabilities.

Results: Our results showed that stable colloidal bismuth nanoparticles had 69% antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* growth and achieved complete inhibition of biofilm formation. These results are similar to those obtained with chlorhexidine, the most commonly used oral antiseptic agent. The minimal inhibitory concentration of bismuth nanoparticles that interfered with *S. mutans* growth was 0.5 mM.

Conclusion: These results suggest that zerovalent bismuth nanoparticles could be an interesting antimicrobial agent to be incorporated into an oral antiseptic preparation.

Keywords: zerovalent bismuth nanoparticles, antimicrobial agent, biofilm, *Streptococcus mutans*

Introduction

Bacteria in nature do not grow in nutrient-rich medium nor in individual form. These microorganisms live in association within communities containing other microorganisms in a cooperative form, known as biofilm. Biofilms can form on all kinds of surfaces and interfaces, including the human body.¹ The most common biofilm is dental plaque in the oral cavity, with *Streptococcus mutans* being the main etiological agent of dental caries worldwide.^{2,3} *S. mutans* has also been identified in cases of endocarditis, where it colonizes the endocardium and cardiac valves, probably due to an ability to adhere to solid surfaces and form a biofilm.⁴

Despite continuous efforts on the part of the pharmaceutical industry, increasing resistance of microorganisms to common antibiotics has become an important issue in current medicine.⁵ The absence of new alternatives to treat multidrug-resistant pathogenic bacteria efficiently is a real problem, and there is an urgent need to synthesize new broad-spectrum drugs to fight antimicrobial resistance.

Bismuth is a metallic element of the VA group, together with nitrogen, phosphorus, antimony, and arsenic. Its oxidation numbers are +3 and +5. It is found in the same proportions as silver in the Earth's crust, and it occupies the 73rd place in abundance.

Correspondence: Claudio Cabral-Romero
Universidad Autónoma de Nuevo Leon, UANL, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDICS, Gonzalitos Norte y Carlos Canseco, Mitras Centro, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, CP 64460
Tel +52 818 3294 000 ext 1816
Fax +52 832 94000 ext 1727
Email claudiohubble@hotmail.com

Typically, it is found as bismuthinite (bismuth sulfide), bismite (bismuth oxide), and bismuthite (bismuth carbonate).⁶ Mexico is the second most important producer of bismuth worldwide after China. Bismuth is used in the manufacture of pharmaceutical products, cosmetics, catalysts, pigments, electronics, and alloys. In medicine, bismuth subsalicylate has been used as an antidiarrheal agent to treat nausea, vomiting, and stomach pain.⁷

Recently, zerovalent bismuth nanoparticles have attracted interest because of their potential application in electronic devices and magnetic sensors.^{8,9} Nanoparticles have an increased surface area and therefore have increased interaction with biological targets. However, the potential for use of zerovalent bismuth nanoparticles in medicine is currently unknown. In this work, we present early evidence of the inhibitory antimicrobial effect of bismuth nanoparticles against growth of *S. mutans* and its capability to form a biofilm. The biocidal activity of bismuth nanoparticles was very similar to that obtained with chlorhexidine, a commonly used oral antiseptic.

Materials and methods

Synthesis of zerovalent bismuth nanoparticles

The following chemical reagents and methods were used for the synthesis of zerovalent bismuth nanoclusters: bismuth nitrate pentahydrate [$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 98%, Sigma, St Louis, MO], sodium citrate dihydrate [$\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma], sodium borohydride (NaBH_4 , 99%, Sigma), dimethyl sulfoxide (Baker, 99.02%, Avantor, Phillipsburg, NJ), methanol (99.8%, Merck, Whitehouse Station, NJ), argon (99.99%, Praxair Inc, Biddeford, ME), and 4 Å molecular sieves (Linde, Tulsa, OK). All reagents were used as received. For a typical preparation of stable colloids, zerovalent bismuth nanoparticles were synthesized by reduction of bismuth nitrate $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and were then stabilized by sodium citrate $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Specifically, 0.0148 g of $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ were dissolved in 100 µL of water and 24 mL of dimethyl sulfoxide was added. Next, 0.0242 g of $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ were added to the mixture. The mixture was fizzed with argon for 15 minutes, and 1 mL of sodium borohydride in methanol 0.2 M NaBH_4 was added as reducing agent. The final concentrations of each $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ were 2×10^{-3} M.

Characterization of zerovalent bismuth nanoparticles

The size, distribution, and morphology of the zerovalent bismuth nanoparticles were determined by high-resolution

transmission electron microscopy (TEM) using a JEM 2010 FasTem microscope equipped with Digital Micrograph 1.2 software and a high angle annular dark field detector as well as energy-dispersive and GIF spectrophotometers, at a voltage of 200 kV. Conventional high-resolution TEM images were obtained in a Scherzer defocused condition. A drop of the colloidal nanoparticles was deposited onto 200 mesh copper grids coated with a carbon/collodion layer. The bismuth rhombohedral phase identification was obtained by x-ray diffraction patterns, recorded on a Bruker D-8 Advance diffractometer using $\text{Cu K}\alpha$ radiation (20 mA, 40 kV, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

Antimicrobial activity against *S. mutans*

The antimicrobial effect of the bismuth nanoparticles on growth of *S. mutans* (strain AU130, ATCC 700611, Manassas, VA) was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Biotium, Hayward, CA),^{10,11} following the instructions of the manufacturer. *S. mutans* was grown in trypticase soy broth (BD Difco, Sparks MD) at 37°C overnight in aerobic conditions. The bacteria were counted using a Neubauer chamber, and 1×10^4 cells were inoculated in 100 µL of trypticase soy broth medium in a 96-well polystyrene plate. Three wells with only trypticase soy broth medium were used as controls for growth of *S. mutans*. Chlorhexidine 0.12% (Ultradent Products, South Jordan, UT) was used as a positive antimicrobial control. We used 2 mM of zerovalent bismuth nanoparticles to interfere with bacterial growth. The 96-well plate was incubated at 37°C overnight. Next, 10 µL of MTT was added to each well, and the plate was protected against light and incubated at 37°C for 2 hours. Next, 200 µL of dimethyl sulfoxide was added to dissolve the reduced MTT. The amount of live cells was determined using a microplate absorbance reader (Biorad, Philadelphia, PA) at 595 nm. The experiment was repeated three times, and the measured optical density was analyzed by descriptive statistics.

Antibiofilm activity

The antibiofilm activity of the bismuth nanoparticles was determined by fluorescence microscopy, following the methodology described above. To observe the biofilm, SYTO 9 green dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added at a final concentration of 20 µM.^{12,13} The 96-well plate was incubated for 30 minutes at room temperature and protected against light. The *S. mutans* biofilm was visualized using a Carl Zeiss Z1 Axio Inverter microscope (Thornwood, NY) at 485 nm.

Determination of MIC for zerovalent bismuth nanoparticles

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as previously described.¹⁴ Briefly, it was obtained by dilution of a 5 tube in the McFarland scale with 1×10^9 colony-forming units. *S. mutans* was grown in trypticase soy broth agar and incubated at 37°C for 24 hours. One colony was inoculated in 5 mL of trypticase soy broth medium and incubated at 37°C for 24 hours. The bacteria count was determined with a Neubauer chamber. Tubes with a final concentration of 1×10^6 colony-forming units were obtained by dilution of a 5 tube in the McFarland scale. The bismuth nanoparticle solution was diluted to final concentrations of 2, 1.5, 1, 0.5, 0.25, and 0.125 mM. Next, 1 mL of zerovalent bismuth nanoparticles was mixed as a bacterial suspension and incubated at 37 °C for 18 hours. The MIC was determined from the presence or absence of turbidity in the different tubes containing the nanoparticles. Chlorhexidine 0.12% was used as a positive control for inhibition.

Results

Synthesis of zerovalent bismuth nanoparticles

The colloidal dispersions of zerovalent bismuth nanoparticles prepared from 2×10^{-4} M $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4×10^{-4} M $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 4×10^{-4} M NaBH_4 in dimethyl sulfoxide showed a narrow size distribution and a spherical form, with an average size of 3.3 ± 0.97 nm (see Figure 1 for a typical particle). This mean size is the smallest reported in the literature.

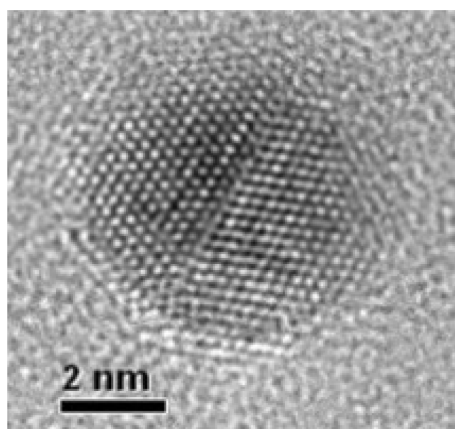


Figure 1 High-resolution transmission electron microscopic image of an isolated zerovalent bismuth nanoparticle.

Notes: The colloidal sample to obtain this image was prepared a few minutes before the microscopy session. Final concentrations of the chemical reagents are 2×10^{-3} M $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4×10^{-4} M $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 4×10^{-4} M NaBH_4 in dimethyl sulfoxide.

Antimicrobial activity against *S. mutans*

To explore the possible antimicrobial activity of zerovalent bismuth nanoparticles, their effect on *S. mutans* growth was determined. The results show that these nanoparticles reduced the number of bacteria by 69%, in comparison with bacteria grown in medium alone (Figure 2). Similarly, treatment with 0.12% chlorhexidine (inhibition control) achieved a 63% reduction in the number of bacteria when compared with nontreated cells (Figure 2). To rule out any antimicrobial effect of dimethyl sulfoxide, it was added to the *S. mutans* cultures and no antimicrobial effect was detected after overnight incubation under our experimental conditions (data not shown). It is important to emphasize that zerovalent bismuth nanoparticles were stable to temperatures lower than 50 °C following their characterization. Because all experiments were performed at 37 °C, no additional controls were used to determine the stability of zerovalent bismuth nanoparticles.

Inhibitory effect on biofilm

In the previous experiment, we measured the antimicrobial activity of zerovalent bismuth nanoparticles. In order to analyze for possible biofilm inhibition of *S. mutans* by bismuth nanoclusters, the antibiofilm activity of the nanoparticles was determined by fluorescence microscopy. The results show complete inhibition of biofilm formation by chlorhexidine (Figure 3B) and zerovalent bismuth nanoparticles (Figure 3C), compared with controls (Figure 3A). The results did not change when the zerovalent bismuth nanoparticles were added at different post-inoculation times. We tested the inhibitory activity on biofilm at 6 and 18 hours post-inoculation, and obtained similar results (data not shown).

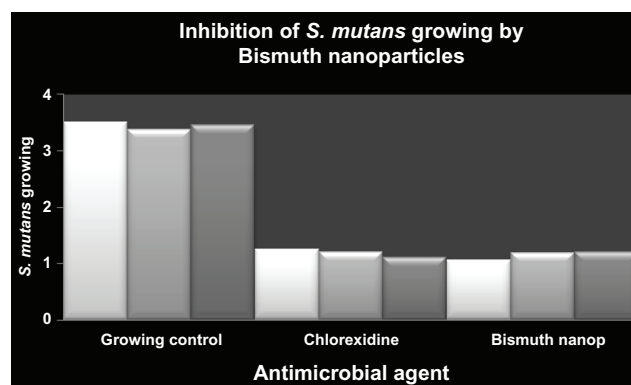


Figure 2 Antimicrobial activity of zerovalent bismuth nanoparticles against *Streptococcus mutans* growth.

Notes: The y axis shows the optical density units of *S. mutans* growth. *S. mutans* culture without any inhibitor was used as growing control and chlorhexidine 0.12% as a positive inhibition control. Zerovalent bismuth nanoparticles were used at a final concentration of 2 mM.

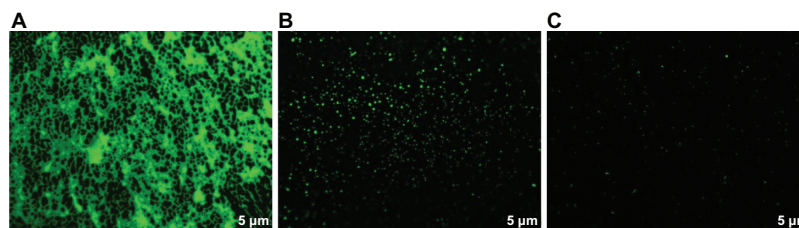


Figure 3 Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm detected by fluorescence microscopy.

Notes: *S. mutans* culture without any inhibitor was used as growing control and chlorhexidine 0.12% as a positive inhibition control. Zerovalent bismuth nanoparticles were used at a final concentration of 2 mM.

These data indicate that zerovalent bismuth nanoparticles had antibiofilm activity which was as effective as that of chlorhexidine.

Determination of MIC

In order to characterize the antimicrobial activity of the bismuth nanoclusters, we determined the MIC of the zerovalent bismuth nanoparticles. The result obtained was 0.5 mM. This result is important in terms of knowing the minimal effective quantity of zerovalent bismuth nanoparticles required to inhibit *S. mutans* growth.

Discussion

Nanotechnology is a new discipline with many applications in fields like biological sciences and medicine. Nanomaterials are applied as coating materials, as well as in treatment and diagnosis.¹⁵ Nanoparticles of titanium, silver, diamond, iron oxide, carbon nanotubes, and biodegradable polymers have been studied for their use in diagnosis and treatment. Nanoparticles with antimicrobial activity have been reported, including ones containing silver, copper oxide, and selenium.^{16–18} The advantages of nanoparticles are their high surface-to-volume ratios, their quantum confinement, and their nanoscale sizes, which allow more active sites to interact with biological systems, including bacteria. This is the most important difference between nanoparticles and typical antimicrobial agents, and could minimize the risk of developing antimicrobial resistance.

The mechanism of antimicrobial activity for nanoparticles is not completely understood, and their precise mechanism of action against bacteria remains to be fully elucidated. Several studies have shown that a positive charge on the metal ion is critical for antimicrobial activity, allowing for electrostatic attraction between the negative charge on the bacterial cell membrane and the positive charge on the nanoparticle.¹⁹ It has been reported that silver nanoparticles can damage DNA, alter gene expression, and affect membrane-bound respiratory enzymes.^{20–22}

Here we present early evidence of the antimicrobial activity of zerovalent bismuth nanoparticles. Their efficacy in inhibiting *S. mutans* growth was comparable with that of chlorhexidine. The MIC of zerovalent bismuth nanoparticles for bacterial growth inhibition was 0.5 mM, which should be taken into account if they are to be incorporated into a mouthwash. Our results indicate that these nanoparticles as antimicrobial agents are as good as chlorhexidine, which is the most commonly used oral antiseptic agent. Previously it has been reported that silver, copper oxide, and selenium nanoparticles have antimicrobial activity.^{16–18} In fact, silver nanoparticles have been used to prevent biofilm formation on surfaces for both biomedical and more general use.²³

In order to determine if zerovalent bismuth nanoparticles have the potential to interfere with *S. mutans* biofilm formation, we studied the antibiofilm activity of these nanoparticles. Surprisingly, they completely prevented biofilm formation. This effect was unexpected, given that zerovalent bismuth nanoparticles would only reduce cell growth and not completely inhibit it. We hypothesize that, since 69% of cells were inactivated by these nanoparticles, cell survival was not sufficient to form a biofilm. Survival bacteria were probably stressed due to the presence of zerovalent bismuth nanoparticles and it is possible that they were lost during washing out of the excess dye. In the presence of chlorhexidine and zerovalent bismuth nanoparticles, we only observed cellular debris on a dark background, comprising mainly DNA from dead bacteria with accumulation of dye. Morphologically, these dye accumulations differ from bacterial biofilm.

In this work, we focused on the effectiveness of zerovalent bismuth nanoparticles in inhibiting growth of *S. mutans*. Overall, the experimental data suggest that these nanoparticles could be an interesting alternative to combat bacterial infections underlying biofilms. The properties of these nanoparticles could be used in oral health, supporting the antimicrobial activity of oral antiseptics. Further experiments

will be necessary to determine the possible toxicity of such nanoparticles in human fibroblast culture and to analyze their potential use in humans. In conclusion, we report that bismuth nanoparticles have antimicrobial activity against growth of *S. mutans*, as well as antibiofilm activity.

Acknowledgments

The authors wish to thank P Santiago-Jacinto and L Rendon from the Institute of Physics of National Autonomous University of Mexico (IF-UNAM) for obtaining TEM images. D Velasco-Arias and R Hernandez-Delgadillo wish to thank CONACyT for a scholarship. D Diaz and C Cabral-Romero also wish to thank CONACyT for financing the projects 132094 and 141616. This work was also supported by further grants from PROMEP-SEP (103.5/11/6627) and PAICYT-UANL-2011 to CCR.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*. 1995;15(3):137–140.
2. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;11(3–4):217–221.
3. Jenkinson HF. Adherence and accumulation of oral streptococci. *Trends Microbiol*. 1994;2(6):209–212.
4. Guntheroth WG. How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *Am J Cardiol*. 1984;54(7):797–801.
5. Falagas ME, Fragoulis KN, Karydis I. A comparative study on the cost of new antibiotics and drugs of other therapeutic categories. *PLoS One*. 2006;1:e11.
6. Kirk RE, Othmer DF. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3rd ed. New York, NY: Chichester, Wiley; 1980.
7. Figueroa-Quintanilla D, Salazar-Lindo E, Sack RB, et al. A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *N Engl J Med*. 1993;328(23):1653–1658.
8. Zhang Z, Yu K, Bai D, Zhu Z. Synthesis and electrochemical sensing toward heavy metals of bunch-like bismuth nanostructures. *Nanoscale Res Lett*. 2009;5(2):398–402.
9. Chen R, So MH, Yang J, Deng F, Che CM, Sun H. Fabrication of bismuth subcarbonate nanotube arrays from bismuth citrate. *Chem Commun (Camb)*. 2006;21:2265–2267.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
11. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 1997;69(2):581–593.
12. Yue H, Eastman PS, Wang BB, et al. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(8):E41.
13. Frey T. Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry*. 1995;21(3):265–274.
14. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48 Suppl 1:5–16.
15. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol*. 2003;21(10):1166–1170.
16. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004;275(1):177–182.
17. Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(6):587–590.
18. Tran PA, Webster TJ. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1553–1558.
19. Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007;3(1):95–101.
20. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):662–668.
21. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7589–7593.
22. Bragg PD, Rainnie DJ. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*. 1974;20(6):883–889.
23. Sambhy V, MacBride MM, Peterson BR, Sen A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *J Am Chem Soc*. 2006;128(30):9798–9808.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation

Rene Hernandez-Delgadillo¹
Donaji Velasco-Arias³
Juan Jose Martinez-Sanmiguel²
David Diaz³
Inti Zumeta-Dube³
Katiushka Arevalo-Niño¹
Claudio Cabral-Romero²

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, UANL, Monterrey, Mexico; ²Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, UANL, Monterrey, México; ³Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, UNAM, Distrito Federal, México

Correspondence: Claudio Cabral-Romero
Universidad Autónoma de Nuevo Leon, UANL, Facultad de Odontología, Dr E Aguirre Pequeño and Silao s/n Mitras centro, Monterrey, Nuevo Leon CP 64460, Mexico
Tel +52 818 3294 0000 ext 3153
Email claudiohubble@hotmail.com

David Diaz
Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Facultad de Química, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacan, Mexico City CP 04510, Mexico
Tel +52 55 5622 3813
Email david@unam.mx

Abstract: Multiresistance among microorganisms to common antimicrobials has become one of the most significant concerns in modern medicine. Nanomaterials are a new alternative to successfully treat the multiresistant microorganisms. Nanostructured materials are used in many fields, including biological sciences and medicine. Recently, it was demonstrated that the bactericidal activity of zero-valent bismuth colloidal nanoparticles inhibited the growth of *Streptococcus mutans*; however the antimycotic potential of bismuth nanostructured derivatives has not yet been studied. The main objective of this investigation was to analyze the fungicidal activity of bismuth oxide nanoparticles against *Candida albicans*, and their antibiofilm capabilities. Our results showed that aqueous colloidal bismuth oxide nanoparticles displayed antimicrobial activity against *C. albicans* growth (reducing colony size by 85%) and a complete inhibition of biofilm formation. These results are better than those obtained with chlorhexidine, nystatin, and terbinafine, the most effective oral antiseptic and commercial antifungal agents. In this work, we also compared the antimycotic activities of bulk bismuth oxide and bismuth nitrate, the precursor metallic salt. These results suggest that bismuth oxide colloidal nanoparticles could be a very interesting candidate as a fungicidal agent to be incorporated into an oral antiseptic. Additionally, we determined the minimum inhibitory concentration for the synthesized aqueous colloidal Bi₂O₃ nanoparticles.

Keywords: antimycotic agent, antifungal, cytotoxicity

Introduction

The occurrence of microorganisms living in cooperative, aggregated communities is called a biofilm. Biofilms can form on many kinds of surfaces and interfaces, including the human body.¹ The most common biofilms associated with human disease episodes are the fungi of the genus *Candida*, most notably *Candida albicans*, which causes both superficial and systemic disease. *C. albicans* biofilm is commonly found in children and elderly persons with a deficient immune system, and it is the etiological agent of oral moniliasis; the mortality of patients with invasive candidiasis can be as high as 40%.^{2,3} Fungal infections are difficult to eradicate, requiring high quantities and longtime exposure to an antimycotic agent to efficiently eliminate the etiological pathogen.⁴

Multiresistance among pathogen microorganisms has become one of the most important problems in current medicine.⁵ Since early reports in 1980, new evidence has suggested the emergence of multiresistant strains of *Candida*, suggesting that multiresistance is not an exclusive phenomenon of bacteria.^{6,7} The absence of new alternatives to efficiently treat these multiresistant microorganisms is a real problem,

and it is urgent to synthesize new broad spectrum drugs to fight antimicrobial resistance.

Typically, bismuth is found as bismuthinite (bismuth sulfide), bismite (bismuth oxide [Bi_2O_3]), and bismuthite (bismuth carbonate).⁸ In medicine, bismuth, in the form of bismuth subsalicylate, has been employed as an antidiarrheal to treat nausea, vomiting, and stomach pain.⁹

The chemistry of the binary oxides of bismuth is dominated by the +3 oxidation state. Most of the work on bismuth, concentrates on Bi_2O_3 . Bi_2O_3 shows a distinctive polymorphism, including the following solid state phases: α - Bi_2O_3 , β - Bi_2O_3 , γ - Bi_2O_3 , δ - Bi_2O_3 , and the recently characterized ϵ - Bi_2O_3 .¹⁰ The α - Bi_2O_3 is the most thermodynamically stable phase at room temperature and pressure. So, under standard reaction conditions in aqueous solutions, the α - Bi_2O_3 is formed, a poorly water-soluble specie that carries surface hydroxyl groups.¹¹ α - Bi_2O_3 is a basic oxide and its Bi-O bonds are predominantly ionic;¹² it is a p-type semiconductor material.¹⁰

Bi_2O_3 is a derivative of great technological importance, and it is used in the manufacture of glass and ceramic products, and also, as catalyst in the oxidation of hydrocarbons. It is widely used in applications, such as microelectronics, and sensor and optical technology.^{13,14}

Nanoparticles (NPs) have large surface areas, and therefore, they have increased interactions with biological targets. We recently demonstrated the antibacterial effectiveness of zero-valent bismuth NPs at inhibiting the growth of *Streptococcus mutans*;¹⁵ however, at the present time the antimycotic potential of bismuth nanostructured derivatives are not known. In this report, we present evidence of the antimycotic properties of Bi_2O_3 NPs against the growth of *C. albicans* and its capability to eliminate the fungal biofilm – the biocidal activity of Bi_2O_3 NPs was very similar to that obtained with chlorhexidine, a commonly used oral antiseptic and commercial antifungals as nystatin and terbinafine. Additionally, the *C. albicans* antifungal capacities of bulk Bi_2O_3 material and bismuth nitrate, the precursor salt used in the Bi_2O_3 colloidal NPs synthesis, are compared.

Materials and methods

Synthesis of Bi_2O_3 NP

For the synthesis of Bi_2O_3 nanoclusters (Bi_2O_3 NCs), the following chemical reagents were used: bismuth nitrate pentahydrate ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 98% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); Bi_2O_3 , 99.999% trace metals basis (Sigma-Aldrich); potassium hydroxide (KOH), 85% (Meyer,

Tlahuac, Mexico City, Mexico); argon (Ar), 99.998% (Praxair Inc, Danbury, CT, USA); and deionized water, 18.2 Ω (Milli Q[®]; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). These chemical substances were used as they were received.

We used a typical preparation method for the production of the Bi_2O_3 NP colloids, as follows: First, all water to be used in the synthesis was boiled and after cooling to room temperature, was bubbled with argon gas for 15 minutes in order to prevent carbonation. Subsequently, 0.0274 g of $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ were dissolved in 24.5 mL of the prepared water. This solution was heated, under vigorous magnetic stirring, at 80°C. Then, 0.5 mL of an aqueous solution of KOH 0.032 M were added to the $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution. The final concentrations of bismuth and hydroxide ions were 2×10^{-3} M and 6×10^{-3} M, respectively. It is worth noting that during the entire process of dissolution and mixing of the reagents, a weak stream of argon was blowing over the surface of the reaction mixture. The newly synthesized yellowish Bi_2O_3 powder NPs were isolated by centrifugation at 14,000 rpm, for 30 minutes. Afterwards, they were washed with previously decarbonated water, three times. Finally, the powdered Bi_2O_3 NPs were once again resuspended in water and stored at room temperature for approximately 30 minutes, until their use. In order to prove the reproducibility of this synthesis method, these colloids were prepared in triplicate.

Characterization of Bi_2O_3 NPs

The needle-shaped morphology of Bi_2O_3 NPs was determined by transmission electron (TEM) micrographs obtained using a JEOL 1200-EXII (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) of 40–120 KV. Single drops of the ethanol nanoparticle suspension were deposited onto 200 mesh copper grids coated with a carbon/collodion layer.

The Bi_2O_3 monoclinic phase identification was obtained from the X-ray diffraction pattern (PDF 41-1449 card), recorded on a Bruker D2-Phaser diffractometer (Bruker Corp, Billerica, MA, USA), using Cu K α radiation, 1.5406 Å (30 kV, 10 mA). The crystallite size, 77 nm, was determined using the Scherrer equation. From the X-ray diffraction pattern and the TEM images, we observed needle-shaped crystallites, which indicated a textured material (in the 120 direction) (Figure 1).

Antimycotic activity of Bi_2O_3 NPs against *C. albicans* growth

C. albicans (No 90029) was obtained from the American Type Culture Collection, (Manassas, VA, USA). The antifungal effect of Bi_2O_3 NPs on *C. albicans* growth was determined using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Biotium Inc, Hayward, CA, USA),^{16,17} following

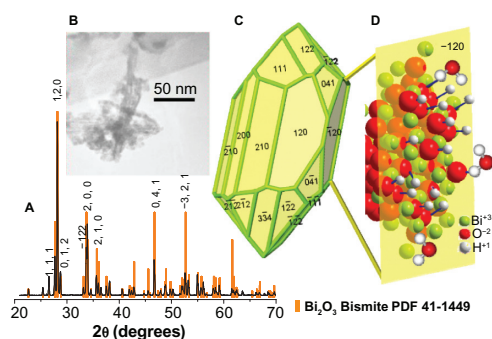


Figure 1 Structural and morphological characterization of Bi_2O_3 NPs, the crystalline habit, and the idealization of the hydroxyl ions and water molecules interactions with the -120 surface plane.

Notes: (A) Bi_2O_3 NPs X-ray diffraction pattern. This sample was synthesized in water, as described in the Materials and methods section. In this case, the observed peaks match with the α -phase (monoclinic) of Bi_2O_3 . (B) TEM image of the Bi_2O_3 NPs clearly shows the needle shape exhibited by these nanoclusters. (C) This model shows the crystal structure of a representative particle, with the respective exposed planes. (D) The images shows a (-120) plane sketch, in particular, the enhanced interaction of bismuth atoms with hydroxyl ions and water molecules.

Abbreviations: Bi_2O_3 , bismuth oxide; NP, nanoparticle; TEM, transmission electron microscope.

the instructions of the manufacturer. *C. albicans* was grown in Trypticase™ Soy Broth (TSB) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) at 37°C , overnight in aerobic conditions. The fungal cells were counted, using a Neubauer chamber, and 1×10^4 cells were inoculated in $100 \mu\text{L}$ of TSB medium, in a 96-well polystyrene plate. Three wells with only TSB medium were used as controls for growth of *C. albicans*. Chlorhexidine 2% (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, USA) was used as a positive antimicrobial control; additionally, terbinafine 1% (Novartis Pharmaceuticals Corp, Basel, Switzerland) and commercial Bi_2O_3 were used as antifungal positive controls.

Hereinafter, the concentrations given refer to the initial concentration of the respective bismuth precursor. We used $50 \mu\text{L}$ of a 2 mM of Bi_2O_3 NP dispersion, in a total volume of $150 \mu\text{L}$, to interfere with bacterial growth. As additional controls, 2 mM of Bi_2O_3 (bulk material) aqueous suspension and 2 mM of $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ aqueous solution (the precursor bismuth salt), were added separately to cells, to compare the antifungal activities of the metallic salt, bulk material, and nanostructured samples. In this research, we avoided the use of organic solvents in order to prevent possible interference with the antifungal and cytotoxic properties of the Bi_2O_3 NPs.

The 96-well plate was incubated at 37°C overnight. Next, $10 \mu\text{L}$ of MTT was added to each well, and the plate was protected against light and incubated at 37°C for 2 hours. Next, $200 \mu\text{L}$ of dimethyl sulfoxide was added to dissolve the reduced MTT species. The amount of live cells was determined using a microplate absorbance reader (iMark™; Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA), at 595 nm.

The experiments were repeated three times, and the measured optical density was analyzed by descriptive statistics.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of Bi_2O_3 NPs

The MIC was determined as described in a previous work.¹⁸ Briefly, a 5 tube in the McFarland scale, with 1×10^9 CFU, was obtained (McFarland scale are fungal solutions. There are 1–9 ranges in this scale with a specific number of microbes in each one): *C. albicans* was grown in TSB agar and incubated at 37°C for 24 hours. One colony was inoculated in 5 mL of TSB medium and incubated at 37°C for 24 hours. The fungal count was determined with a Neubauer chamber. Tubes with a final concentration of 1×10^6 CFU were obtained by dilution of the 5 tube in the McFarland scale. The Bi_2O_3 NP suspension was diluted to final concentrations of 0.25, 0.5, 1, and 1.5, from the 2 mM stock. Then, 1 mL of each Bi_2O_3 NP dispersion was mixed with a fungal culture medium and then, incubated at 37°C for 18 hours. The MIC was determined by the presence or absence of turbidity in the different tubes containing the NPs.

Biofilm inhibitory activity of Bi_2O_3 NPs

The antibiofilm activity of the Bi_2O_3 NPs was determined by fluorescence microscopy, following the methodology described above. To observe the biofilm, SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid stain (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added, to a final concentration of $20 \mu\text{M}$.^{19,20} The 96-well plate was incubated for 30 minutes at room temperature and protected against light. The *C. albicans* biofilm was visualized with a Carl Zeiss Z1 Axio Inverter microscope (Carl Zeiss Meditec, Jena, Germany), at 485 nm.

Cytotoxicity of Bi_2O_3 NPs on culture cells by fluorescence microscopy

It is important to emphasize that we did not find any report concerning cytotoxicity of common bismuth nanostructured derivatives. We found one related publication describing the stability, cytotoxicity, and potential use of $\text{KBi}(\text{H}_2\text{O})_2[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ NPs – of course, this cyano species is extremely toxic.²¹

In this research we used monkey kidney (Vero) cells to analyze the cytotoxic effect of Bi_2O_3 NPs. A confluent monolayer of Vero cells (CCL-81; ATCC) was grown in minimal essential media (MEM) (Life Technologies) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies), at 37°C with 5% of CO_2 , in a Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ System (16 wells; Thermo Fisher Scientific). This was exposed to 2 mM of Bi_2O_3 NPs for 24 hours, and the possible cytotoxic effect was detected by fluorescence microscopy. For the negative control, cells without NPs were employed. The Vero cells were

washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Abcam Inc, Cambridge, UK) was added to stain the nucleus of cells.²² Cytotoxicity was interpreted as the presence of a degraded or amorphous nucleus, observing at 365 nm with an inverter Carl Zeiss microscope.

Results

Synthesis and characterization of Bi₂O₃ NPs

The colloidal dispersions of Bi₂O₃ NPs prepared from 2×10^{-3} M Bi(NO₃)₃ · 5H₂O and 6×10^{-3} M of KOH in deionized water yielded a fine beige powder with an approximate crystallite size of 77 nm. The X-ray diffraction pattern of the Bi₂O₃ NP powder showed the presence of α -phase nanocrystallites and the absence of other possible compounds (like carbonated elements) generated during their synthesis (Figure 1). The synthesized Bi₂O₃ NPs remained stable at room temperature for 15 days, and no visible trace of carbonation was observed, since the suspended particles in water kept their yellowish color. This established that the antimycotic and antibiofilm properties were associated only with the presence of Bi₂O₃ NPs.

Antimycotic activity of Bi₂O₃ NPs against *C. albicans* growth

To explore the possible antifungal activity of Bi₂O₃ NPs, their effect on *C. albicans* growth was determined. The results showed that Bi₂O₃ NPs reduced the number of fungi by 85%, in comparison with the control fungi grown in medium. At the same time, the treatment with 2% chlorhexidine and 1% terbinafine (inhibition controls) showed a 44% and 51% of reduction in the number of fungi, respectively, when compared with nontreated cells. The antifungal effect of Bi₂O₃ NPs was two times better when compared with the bulk Bi₂O₃ material (Figure 2), suggesting that nanostructured Bi₂O₃ is more effective as an antifungal agent.

Determination of minimal inhibitory concentration of Bi₂O₃ NPs

In order to characterize the antifungal activity of Bi₂O₃ NPs, we determined their MIC. The result obtained was 1.5 mM (Figure 3). This result is important to know as it represents the minimal quantity of Bi₂O₃ NPs that is required to effectively interfere with *C. albicans* growth.

Biofilm inhibitory activity of Bi₂O₃ NPs

In the previous experiment, we measured the antimycotic activity of Bi₂O₃ NPs. In order to analyze the possible biofilm inhibition of *C. albicans* by bismuth nanoclusters,

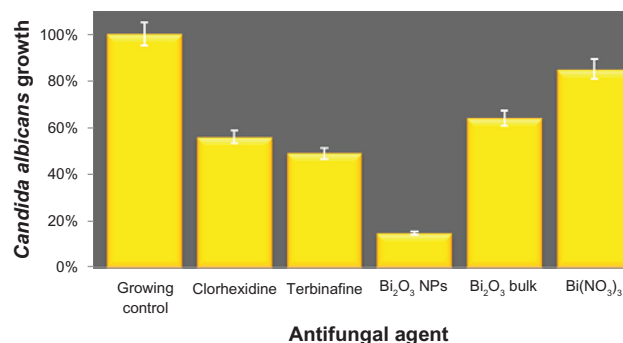


Figure 2 Antifungal activity of bismuth oxide nanoparticles against *Candida albicans* growth.

Notes: The y axis shows the optical density units of *C. albicans* growth. *C. albicans* culture without inhibitor was used as the growth control, whereas chlorhexidine 2%, terbinafine 1%, Bi₂O₃ (bulk material), and Bi(NO₃)₃ · 5H₂O were used as positive inhibition controls. For these experiments, we used a concentration of 2 mM of the respective bismuth species.

Abbreviations: Bi₂O₃, bismuth oxide; Bi(NO₃)₃ · 5H₂O, bismuth nitrate pentahydrate; NP, nanoparticle.

the antibiofilm activity of Bi₂O₃ NPs was determined by fluorescence microscopy. The results showed a complete inhibition of biofilm formation by chlorhexidine (Figure 4B), terbinafine (Figure 4C), and Bi₂O₃ NPs (Figure 4D), compared with the control (Figure 4A). The results did not change when Bi₂O₃ NPs were added at different postinoculation times – we tested the biofilm inhibitory activity at 6 and 18 hours postinoculation, obtaining similar results (data not shown). These data indicate that Bi₂O₃ NPs have an antibiofilm activity that is as effective as chlorhexidine and terbinafine.

Cytotoxicity of Bi₂O₃ NPs in culture cells, by fluorescence microscopy

The cytotoxic effect of Bi₂O₃ NPs was evaluated in monkey kidney (Vero) cells by fluorescence microscopy. The results

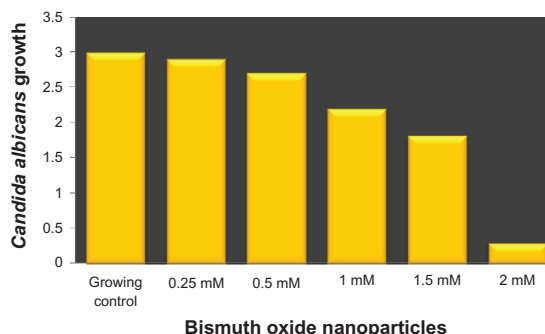


Figure 3 MIC of bismuth oxide nanoparticles against *Candida albicans* growth.

Notes: The y axis shows the optical density units of *C. albicans* growth; the x axis shows the different concentrations of Bi₂O₃ NPs analyzed. *C. albicans* culture without inhibitor was used as a growth control. Experiments were carried out three times and each time by triplicate. Average results were obtained from the three independent experiments.

Abbreviations: Bi₂O₃, bismuth oxide; MIC, minimal inhibitory concentration; NP, nanoparticle.

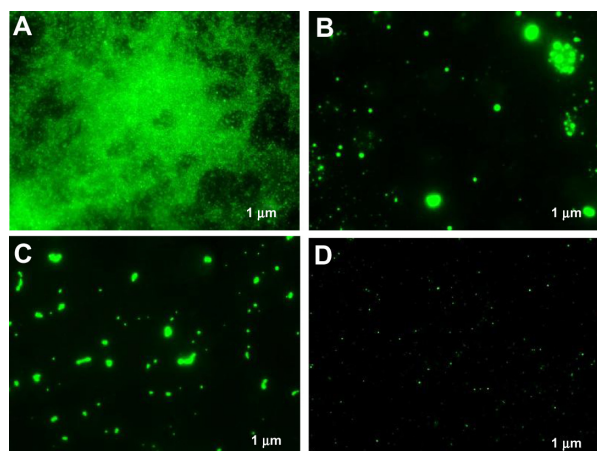


Figure 4 Inhibition of *Candida albicans* biofilm detected by fluorescence microscopy, after 24 hours. As a growth control, *C. albicans* was added to culture media; chlorhexidine 2% and terbinafine 1% were employed as positive inhibition controls. In these experiments, we used a concentration of 2 mM Bi_2O_3 NPs. (A) Growth control; (B) chlorhexidine; (C) terbinafine; and (D) Bi_2O_3 NPs.

Note: The bar indicates 1 μm .

Abbreviations: Bi_2O_3 , bismuth oxide; NP, nanoparticle.

showed that Bi_2O_3 NPs did not promote cytotoxic effects in the Vero cells at 24 hours of exposure compared with the cells without NP. The nuclei and, indeed, all the cells looked very similar in the presence or absence of Bi_2O_3 NPs (Figure 5). These results suggest the absence of cytotoxicity by Bi_2O_3 NPs, under our experimental conditions.

Discussion

In this study, we presented evidence of the antimycotic activity of Bi_2O_3 NPs. Their efficacy in inhibiting *C. albicans* growth was significantly better than that of chlorhexidine, nystatin, and terbinafine. These results indicate that Bi_2O_3 NPs are better antifungal agents than the most commonly used oral antiseptic and commercial antifungal agents. To be assured that the antifungal effect was due to the nanostructured Bi_2O_3 , this was compared with the antifungal

effect of bulk Bi_2O_3 . The Bi_2O_3 NPs were two times more effective than the polycrystalline Bi_2O_3 in inhibiting fungal growth. This result was very important because it demonstrated the effectiveness of the nanostructured material versus the same bulk compound. Bismuth salicylate, a typical molecular bismuth derivative, has been employed to treat fungal infections but was not shown to inhibit the fungal growth,²³ suggesting that it is the nanostructured particle of Bi_2O_3 that is conferred with the antimicrobial properties described earlier.¹⁵ These results suggest that Bi_2O_3 NPs could be very interesting antifungal agents. Previously, it was reported that zinc, titanium, and silver NPs have very good antifungal activity;^{24–26} however, it is not possible to establish any quantitative antibiofilm activity comparison, due to the type of published results.

Inorganic nanostructures have many applications in fields like the biological sciences and medicine. NPs have been applied as coating materials and in treatments and diagnosis.²⁷ NPs of titanium dioxide, silver, diamonds, iron oxides, carbon nanotubes, and biodegradable polymers have all been studied for their use in diagnosis and treatments. NPs of silver, copper oxides, and selenium have been reported to have antimicrobial activity.^{28–30} The advantages of inorganic NPs are their high surface-to-volume ratios, different shapes, many structural defects, (the presence of irregularities in the crystal lattice of the nanostructured bismuth oxide) and of course, their nanoscale size, which allows more active sites to interact with biological systems such as bacteria, fungi, and viruses. This is the most important difference between NPs and the typical organic molecular antimicrobial agents, and could minimize the risk of developing antimicrobial resistance.

The mechanism of the antimicrobial activity of inorganic NPs is not completely understood, and their precise mechanism of action against bacteria and fungi remains to be fully eluci-

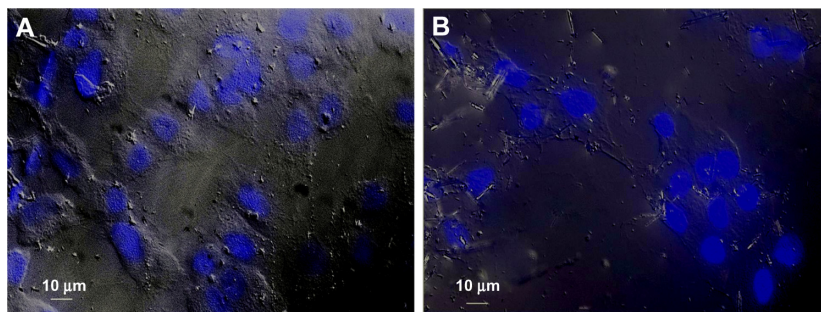


Figure 5 Cytotoxicity of bismuth oxide nanoparticles detected by fluorescence microscopy. The possible cytotoxic effect of bismuth oxide nanoparticles was evaluated in monkey kidney cells by staining the nuclei with DAPI and visualizing cell morphology with DIC. As positive control, Vero cells were used. (A) Positive control and (B) Vero cells, after interacting with bismuth oxide nanoparticles, for 24 hours.

Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIC, differential interference contrast microscopy.

dated. It has been shown that positive charges on the metal ion are critical for the antimicrobial activity, allowing for the electrostatic attraction between a negatively charged cell membrane and the positively charged NPs.³¹ It has also been reported that silver NPs can damage DNA, alter gene expression, and affect the membrane-bound respiratory enzymes.^{32–34}

As previously mentioned, Bi_2O_3 has a marked basic character, and when this compound is suspended in water, it tends to be associated with hydroxyl ions and water molecules on its surface, similar to titanium dioxide, zinc oxide, tin dioxide, and other metal oxides.^{35–39} When Bi_2O_3 is nanostructured, its ionic character is enhanced compared with the same bulk material, ie, it becomes a “harder” species with respect to its electrons (according to Pearson’s theory of hard and soft acids and bases).⁴⁰ As a consequence, when Bi_2O_3 is nanostructured, its dissociating character increases, as does the overall surface of the material. Therefore, the amount of OH^- ions and water molecules bound to the surfaces of the nanocrystallites is higher than in the same bulk material, as is sketched in (Figure 1D). Thus, Bi_2O_3 NPs dispersed in water are a chemical species with a highly negative surface electric potential; subsequently, these nanostructured species are strongly basic aggregation points, conferring them with a lethal character for the immersed *C. albicans* fungi. It has been reported that several microorganisms are very sensitive to alkaline media, among them, *C. albicans*.⁴¹ We suggest that this is the basis for the fungicidal character of Bi_2O_3 nanoclusters. Additionally, we cannot discard antifungal activity mechanisms involving free radicals, due to the presence of CO_2 in the culture media⁴² and the inherent $\alpha\text{-Bi}_2\text{O}_3$ NPs photocatalytic properties.⁴³ However, more experimental evidences are needed to support these hypotheses.

In parallel to their antifungal activity, the Bi_2O_3 NPs had the potential to interfere with biofilm formation of *C. albicans*. This antibiofilm activity of the Bi_2O_3 NPs was also studied. Surprisingly, the antibiofilm formation effect was complete in the media with the Bi_2O_3 NPs. This effect was unexpected since Bi_2O_3 NPs only reduced cell growth and did not completely inhibit it. To explain this observation, we suggest that 85% of cells were inactivated during inoculation with Bi_2O_3 NPs and that surviving cells were insufficient to build a biofilm. It may be that they went into planktonic and stress states due the presence of the Bi_2O_3 NPs, and it is possible that they were lost during the wash of dye excess. In the presence of chlorhexidine and Bi_2O_3 NPs, we only observed (via fluorescence microscopy) cellular debris on a dark background – mainly DNA of dead fungus with accumulates of dye. Morphologically, these dye accumulates clearly differed from fungal biofilm.

It is noteworthy that there are published reports of fungal growth inhibition, including inhibition of *C. albicans*, where inorganic NPs, such as diamond-, silver-, gold-, platinum-, and palladium-based NPs, were used as antifungal agents.⁴⁴ Particularly, silver (Ag) NPs have also been shown to inhibit yeast growth,³¹ and their antifungal activity against certain species of *Candida*⁴⁵ is well documented. These studies show evidence for the molecular mechanism of Ag NPs activity, whereby Ag NPs act on and inhibit a number of oxidative enzymes, such as yeast alcohol dehydrogenase, through the generation of reactive oxygen species.³¹ Ag NPs have been demonstrated to exhibit a desirable and promising antifungal effect in several studies, with no serious side effects to the host.⁴⁶ However, the results and the experimental conditions used in the aforementioned studies are not comparable with those of this research.

The possible cytotoxic effect of Bi_2O_3 NPs was explored in monkey kidney (Vero) cells by fluorescence microscopy. No change was detected in the morphology of the nuclei or, indeed, of all cells in the presence or absence of Bi_2O_3 NPs, suggesting the lack of cytotoxic effect after 24 hours of exposure. Earlier, the toxicity of metal oxide NPs, mainly Ag oxide (Ag_2O), zinc oxide (ZnO), and iron oxide (Fe_2O_3),⁴⁷ was reported. The possible toxicity of Bi_2O_3 NPs was analyzed using the same concentration of NPs as was employed in those antifungal assays. The preliminary results of this study reveal no cytotoxicity of colloidal Bi_2O_3 NPs, at least under the experimental conditions previously described. This lack of cytotoxicity can be attributed to the very small amount of inorganic nanomaterial that interacted with the Vero cells. The total Bi_2O_3 nanocluster mass and doses of 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ introduced were not enough to cause cell damage.

For particle toxicity, three factors are crucial: size, shape, and chemical composition. A reduction in the size of a nanosized particle results in an increase in the specific surface area of the nanostructured powder. Therefore more chemical species may attach to its surface, which enhances its reactivity and results in an increase in its toxic effects.^{48,49}

In this case, the colloidal Bi_2O_3 NPs had a relatively small size; however, the number of nanoclusters introduced into the Vero cell culture medium, was significantly low compared with the total loads of the other two derivatives of bismuth (Bi_2O_3 in bulk form and bismuth nitrate).

In this work we focused on the effectiveness of Bi_2O_3 NPs in inhibiting the growth of *C. albicans*. All together, the experimental data suggest that Bi_2O_3 NPs could be an interesting alternative to combat the fungal infections at the origin of biofilms. The property of Bi_2O_3 NPs could be used in

oral health, supporting the antifungal activity of oral antiseptics. Further experiments will be necessary to determine the possible toxicity of Bi₂O₃ NPs and analyze the genotoxicity (apoptosis, DNA fragmentation, DNA damage) in human fibroblasts cultures and analyze their potential use in humans.

In conclusion, Bi₂O₃ NPs of 77 nm average size have an antimycotic activity inhibiting the growth of *C. albicans*, as well as an antibiofilm activity. This behavior is different from the one of the corresponding bulk material; so, the observed activity is a size-dependent property, an explanation that was proposed first time. Additionally, our results suggest that the Bi₂O₃ NPs, under the experimental tested conditions and concentrations, do not exhibit cytotoxicity.

Acknowledgments

The authors wish to thank Vilma Suarez-Martinez and Myriam De la Garza-Ramos, from FO UANL, for support in growing the *C. albicans*, and Ernesto Torres, from FM UANL, for providing the Vero cell line. Donaji Velasco-Arias and Rene Hernandez-Delgadillo thank CONACyT for the Ph D scholarships. Claudio Cabral-Romero wishes to thank the Research Department-UANL for financial support (Paicyt CN-775-11) and CONACyT for financing the project (No 183825). Also, David Diaz wants to express his gratitude to DGAPA-UNAM and CONACyT, for their financial support (projects PAPIIT IN 101009 and SEP-CB-132094, respectively). Finally, Inti Zumeta-Dubé is grateful for the postdoctoral fellowship award from UE-CONACyT, BisNano project.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*. 1995; 15(3):137–140.
2. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001;183(18):5385–5394.
3. Reyes A, Reyes AC. Studies on *Candida albicans* infection in Filipino children. II. Prevalence of oral moniliasis. *Acta Med Philipp*. 1956–1957;13(1–4):151–155.
4. Fortún J. Antifungal therapy update: new drugs and medical uses. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29 Suppl 5:38–44. Spanish.
5. Falagas ME, Fragoulis KN, Karydis I. A comparative study on the cost of new antibiotics and drugs of other therapeutic categories. *PLoS One*. 2006;1:e11.
6. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 2012;120(6):1407–1414.
7. Sasse C, Dunkel N, Schäfer T, et al. The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2012;86(3):539–556.
8. Kirk RE, Othmer DF. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 5th ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc; 2004.
9. Figueroa-Quintanilla D, Salazar-Lindo E, Sack RB, et al. A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *New Engl J Med*. 1993;328(23):1653–1658.
10. Mehring M. From molecules to bismuth oxide-based materials: Potential homo- and heterometallic precursors and model compounds. *Coord Chem Rev*. 2007;251(7–8):974–1006.
11. Cox PA. *The Elements: Their Origin, Abundance, and Distribution*. Oxford: Oxford University Press; 1989.
12. Earnshaw A, Greenwood N. *Chemistry of the Elements*, 1st ed. Pergamon Press Ltd. Oxford England; 1984.
13. Adamian ZN, Abovian HV, Aroutiounian VM. Smoke sensor on the base of Bi₂O₃ sesquioxide. *Sens Actuators B Chem*. 1996;35(1–3):241–243.
14. Leontie L, Caraman M, Alexe M, Harnagea C. Structural and optical characteristics of bismuth oxide thin films. *Surface Science*. 2002; 507–510:480–485.
15. Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Diaz D, et al. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2109–2113.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
17. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 1997;69(2):581–593.
18. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48 Suppl 1:5–16.
19. Yue H, Eastman PS, Wang BB, et al. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(8):E41–E41.
20. Frey T. Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry*. 1995;21(3):265–274.
21. Perera VS, Hao J, Gao M, et al. Nanoparticles of the novel coordination polymer KBi(H₂O)₂[Fe(CN)₆] · H₂O as a potential contrast agent for computed tomography. *Inorg Chem*. 2011;50(17):7910–7912.
22. Kubista M, Akerman B, Nordén B. Characterization of interaction between DNA and 4',6'-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*. 1987;26(14):4545–4553.
23. Alharbi SA, Mashat BH, Al-Harbi NA, Wainwright M, Aloufi AS, Alnaimat S. Bismuth-inhibitory effects on bacteria and stimulation of fungal growth in vitro. *Saudi J Biol Sci*. 2012;19(2):147–150.
24. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles – the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*. 2011;22(10):105101.
25. Tatlıdil İ, Sökmen M, Breen C, Clegg F, Buruk CK, Bacaksız E. Degradation of *Candida albicans* on TiO₂ and Ag-TiO₂ thin films prepared by sol-gel and nanosuspensions. *Journal of Sol-Gel Science Technology*. 2011;60(1):23–32.
26. Hwang IS, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012;279(7):1327–1338.
27. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol*. 2003;21(10):1166–1170.
28. SonDI I, Salopek-SonDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004;275(1):177–182.
29. Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(6):587–590.
30. Tran PA, Webster TJ. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1553–1558.
31. Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007;3(1):95–101.
32. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):662–668.

33. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7589–7593.
34. Bragg PD, Rainnie DJ. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*. 1974;20(6):883–889.
35. Xu JJ, Chen MD, Fu DG. Preparation of bismuth oxide/titania composite particles and their photocatalytic activity to degradation of 4-chlorophenol. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2011;21(2):340–345.
36. Lindan PJD. Water chemistry at the $\text{SnO}_2(110)$ surface: the role of inter-molecular interactions and surface geometry. *Chem Phys Lett*. 2000;328(4–6):325–329.
37. Batzill M, Bergermayer W, Tanaka I, Diebold U. Tuning the chemical functionality of a gas sensitive material: Water adsorption on $\text{SnO}_2(101)$. *Surf Sci*. 2006;600(4):L29–L32.
38. Duncan DA, Allegretti F, Woodruff DP. Water does partially dissociate on the perfect $\text{TiO}_2(110)$ surface: A quantitative structure determination. *Phys Rev B*. 2012;86(4):045411.
39. Noei H, Qiu H, Wang Y, Löffler E, Wöll C, Muhler M. The identification of hydroxyl groups on ZnO nanoparticles by infrared spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*. 2008;10(47):7092–7097.
40. Pearson RG. Chemical hardness and density functional theory. *J Chem Sci*. 2005;117(5):369–377.
41. Guerreiro-Tanomaru JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent*. 2012;2012:469019.
42. Medinas DB, Cerchiaro G, Trindade DF, Augusto O. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life*. 2007;59(4–5):255–262.
43. Muruganandham M, Amutha R, Lee GJ, Hsieh SH, Wu JJ, Sillanpää M. Facile fabrication of tunable Bi_2O_3 self-assembly and its visible light photocatalytic activity. *J Phys Chem C*. 2012;116(23):12906–12915.
44. Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A, et al. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:1085–1094.
45. Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18(8):1482–1484.
46. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):10–24.
47. Kumar V, Kumari A, Guleria P, Yadav SK. Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2012;215:39–121.
48. Linkov I, Satterstrom FK, Corey LM. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine*. 2008;4(2):167–171.
49. Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol*. 2009;87(3):133–170.



International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.