

Desarrollo y evaluación de un parche con metronidazol para aplicación en mucosa oral a partir de productos naturales

Norma Noguez, Marlone Gacuta, Carlos Quirino, Susana Macín y Alejandro Rubio

N. Noguez, M. Gacuta, C. Quirino, S. Macín y A. Rubio
Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos, Departamento de Atención a la Salud. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México.
Instituto Tecnológico de Querétaro. Departamento de Ciencia Básica. Av. Tecnológico s/n esq. Mariano Escobedo. Col. Centro Querétaro, Qro. CP 76000
nanoguez@correo.xoc.uam.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) .Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

The periodontal disease (PD) are in our time a worldwide public health problem especially in developing countries. While the treatment of the PD is based mainly on the mechanical removal or scaling and root planing of the subgingival biofilm on the surface and root colonized, the systemic administration of antibiotics contributes an improvement and additional benefits of the patient's clinical condition. Recently, the development of patches has received increased attention in the administration of oral drugs. With this background it is proposed the use of a rubber extracted from the Cactus for the design of a patch containing metronidazole for use as a possible pharmaceutical form to assist in the treatment of periodontal disease.

10 Introducción

Las infecciones bacterianas mixtas que afectan a la cavidad bucal pueden clasificarse en dos grupos, en función de su localización: a) odontológicas, dentro de las cuales se incluyen: la caries, la pulpitis, el absceso, la gingivitis, la periodontitis y la pericoronaritis; b) las no odontológicas, dentro de las que se incluyen las infecciones de la mucosa oral y de las glándulas salivales (Maestre,2002). La enfermedad se desarrolla como resultado de la respuesta inflamatoria del huésped mediada por una biopelícula bacteriana que residen en las bolsas periodontales (Scheres y col. 2010). Los factores inflamatorios (innato) e inmunitario (específico) se desarrollan en respuesta al gran número y variedad de microorganismos presentes en la superficie dentaria muy cerca de las encías, estas son las características predominantes en la génesis de la enfermedad periodontal (EP).

El término enfermedad periodontal suele referirse a una enfermedad inflamatoria del tejido de soporte y de recubrimiento de los dientes, que es iniciada por sustancias producidas por la biopelícula bacteriana subgingival (o biofilm); son un grupo de afecciones inflamatorias, debido a una etiología bacteriana mixta que afecta las estructuras de soporte de los dientes, encía, ligamento periodontal y hueso alveolar (Cochran, 2008). Histológicamente, la enfermedad periodontal se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias en el tejido conectivo gingival (Secretaría de Salud, 2008), casi siempre se asocia significativamente al sobre crecimiento de un determinado número de especiespolimicrobianas en la placa subgingival por lo que debe considerarse una enfermedad infecciosa bacteriana crónica.

Las EP son en nuestro tiempo un problema de salud pública a nivel mundial especialmente en los países en vías de desarrollo (Negroni,2009). El conocimiento que se tiene de ellas han ido evolucionando sobre la base de los hallazgos de estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones identificándose factores de riesgo para la condición de salud del paciente: como la enfermedad cardíaca, coronaria, el nacimiento prematuro de niños con bajo peso el accidente cerebrovascular e infecciones pulmonares que afectan órganos y/o sistemas (Jiménez, 2009).

Del mismo modo, el reconocimiento de las amenazas que plantean las enfermedades periodontales a las personas con enfermedades crónicas como la diabetes, las enfermedades respiratorias y la osteoporosis (Seymour, 2007).

Los factores de riesgo, biológicos y de comportamiento en las EP son de características individuales (susceptibilidad del huésped) esto puede ser de dos tipos, modificables (factores sistémicos, por ejemplo: los niveles de bacterias patógenas) e inmutables de comportamiento, por ejemplo: las características genéticas, o ambientales como son el tabaquismo y el estrés; que cuando están presentes resultan directamente en un aumento de probabilidad que la persona padezca la enfermedad.

Según el concepto actual de la etiología multifactorial de la EP, se producen por la interacción de un agente antimicrobiano, único o múltiple y un huésped susceptible a factores ambientales que influyen sobre ambos (Echeverría, 2003).

Si bien el tratamiento de las EP se basa principalmente en la eliminación mecánica o raspado y alisado radicular (SRP, por sus siglas en inglés) de la biopelícula subgingival en la superficie y raíz colonizada, con el fin de detener y controlar los procesos inflamatorios, impidiendo nuevamente la recolonización y desarrollo microbiano. La administración sistémica de antibióticos aporta una mejoría y beneficios adicionales del estado clínico del paciente ya que a través del suero pueden acceder de manera fácil, a las zonas más profundas del periodonto enfermo (Shaddox, 2010). Los principios generales en el tratamiento de las EP se muestran en la tabla 1.

Tabla 10 Principios generales del tratamiento de la enfermedad periodontal

- Control de la placa bacteriana
- Establecimiento de una encía sana que permita el control de la placa
- Minimización de la pérdida de tejido periodontal
- Uso de antibióticos en casos seleccionados
- Cirugía mucogingival en casos seleccionados

Para el tratamiento de esta enfermedad se sugiere, la administración de antibióticos utilizados como un complemento con SRP .

Vía de Administración bucal

La cavidad oral es un sitio atractivo para la entrega de medicamentos.

A través de esta ruta mucosa (efecto local) y transmucosa (efecto sistémico) es posible la administración de fármacos. En el primer caso, el objetivo es lograr una liberación específica del fármaco en la mucosa, mientras que en el segundo caso consiste en la absorción del fármaco a través de la barrera de la mucosa para llegar a la circulación sistémica.

Recientemente, la formulación de parches ha recibido una mayor atención en la administración bucal de fármacos, porque presenta mayor facilidad de cumplimiento posológico por parte del paciente en comparación con los comprimidos, debido a menores molestias por su flexibilidad física.

Generalmente los parches son laminados y consisten en un par de capas: una como refuerzo impermeable (superficial) y otra que contiene fármaco (con propiedades mucoadhesivas) en la cual, el fármaco se libera (Rossi y col. 2005).

Bioadhesión y mucoadhesión

El término de bioadhesión describe la capacidad de ciertas macromoléculas, sintéticas o biológicas, de adherirse a los tejidos del organismo sobre todo a las mucosas, gracias a la naturaleza viscosa de la capa que la recubre sin que en ello intervenga ligazones específicos propios del polímero y del tejido.

Por tanto no habrá bioadhesión real sin que se establezca una interrelación entre algunas agrupaciones químicas concretas de los polímeros y los tejidos biológicos o interpenetración de cadenas (Rodríguez, y col. 2000).

Teniendo en cuenta que la mayoría de las vías de administración de fármacos están revestidas de una capa de mucus, surgió la idea de adaptar el fenómeno de adhesión (unión durante un tiempo suficientemente prolongado de dos superficies por fuerzas interfaciales de tipo físico y/o químico) a la fijación de la forma farmacéutica a una zona concreta del cuerpo, desde donde se liberará el fármaco.

Esto corresponde a un fenómeno de bioadhesión (una de las superficies adheridas es de naturaleza biológica) y más específicamente de mucoadhesión, dado que una de las superficies es una membrana mucosa (capa celular), o bien a la capa de mucina que recubre esta membrana superficial.

La investigación actual sobre formas de administración mucoadhesivas se encuentra en una etapa relativamente avanzada, ejemplo de ello es el conocimiento, con exactitud, de la naturaleza de las interacciones que ocurren en la interface tejido-mucoadhesivo y la especificidad mucoadhesiva.

- a) Especificidad del polímero mucoadhesivo por la mucina, lo que contribuiría a limitar su adherencia sobre otras superficies.
- b) Especificidad por el lugar de adhesión, lo que significa reconocimiento del lugar óptimo que permitiría dirigir a la forma farmacéutica al blanco (estómago, duodeno, colon, etc.) aumentando al máximo la eficacia terapéutica

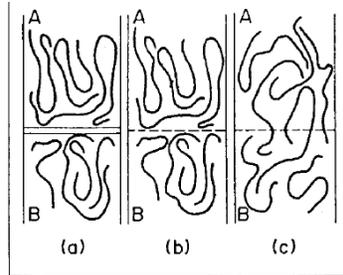
Interacciones en Bioadhesión

La dilucidación de los mecanismos de interacción entre el substrato biológico y los polímeros bioadhesivos son fundamentales para el desarrollo de estos sistemas farmacéuticos.

La mayor parte de los autores destacan dos tipos de interacciones.

- a) Interacciones físicas o mecánicas. Se producen a través del contacto íntimo entre el polímero bioadhesivo (A) y la superficie irregular del mucus (B), ver fig. 1

Figura 10 Modelo representativo de la interpenetración molecular de polímero bioadhesivo A, con las glicoproteínas del mucus B: (a), (b) y (c) representan sucesivos estadios de acercamiento, contacto superficial e interpenetración polímero mucoadhesivo/glicoproteínas del mucus. (Imagen tomada de Rodríguez I C, Cereso A, Salem LL. 2000. Sistemas de liberación bioadhesivos. *ArsPharmaceutica*. 41; vi: 115-28)



En la interface de contacto se origina una interpenetración de las moléculas del polímero en el gel del mucus y al contrario, dando lugar a uniones semipermanentes, no específicas, que suponen una primera fase que promueve la posterior interacción química propiamente bioadhesiva.

Biopolímeros

Actualmente se han estudiado nuevos materiales con los que se busca obtener propiedades físicas y químicas especiales (resistencia, compatibilidad biológica o reactividad química). Entre los diferentes materiales que se han estudiado existe un gran interés hacia los polímeros, específicamente los biopolímeros, debido a la versatilidad para ser empleados en diferentes sectores como: a) sustitutos de polímeros no biodegradables, b) implantes ortopédicos, c) dispositivos de liberación controlada de fármacos. Los materiales poliméricos presentan diversas posibilidades de aplicaciones farmacéuticas.

Sin embargo, el uso de polímeros como potenciales transportadores de sustancias a través de matrices y como barreras en forma de películas, debe considerar entre otros: i) la compatibilidad con ambientes fisiológicos, ii) la estabilidad de los polímeros durante el tiempo que tarda la liberación, iii) las propiedades mecánicas cuando se encuentran cargadas con un fármaco, iv) la posibilidad de no presentar hinchamiento apreciable en medios acuosos y a temperaturas de 37°C; v) la facilidad para su manufactura y vi) el costo frente a otros sistemas terapéuticos farmacéuticos (Moreno, 2011).

Polímeros Bioadhesivos

Todo sistema bioadhesivo debe sus propiedades a la inclusión de uno o varios tipos de moléculas poliméricas que, en condiciones apropiadas son capaces de establecer interacciones con la superficie biológica, determinando así la forma de liberar al fármaco.

Las moléculas estudiadas como mucoadhesivos son numerosas, entre las que se incluyen las clásicas formadoras de hidrocoloides: goma de tragacanto, goma guar, goma de karaya, alginato sódico, gelatina, quitosano; derivados de la celulosa como metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietil celulosa, hidroxipropilcelulosa y otras. Polietilenglicoles, alcohol polivinílico, carbopol, polímeros y copolímeros del ácido acrílico y metacrílico, polialquilcianoacrilatos, policarbofil, etc. Otros han sido sintetizados específicamente para alcanzar óptimos resultados de bioadhesividad y se han formulado combinaciones precisas de polímeros cuya composición cuali y cuantitativa ha sido objeto de patentes^[19].

Así mismo, en la industria alimentaria y farmacéutica las pectinas extraídas de los nopales son utilizadas ampliamente como agentes hidrocoloides o gomas, ya que forman geles en medios ácidos en presencia de cantidades grandes de azúcar (Aza y Méndez, 2011).

Parches Mucoadhesivos.

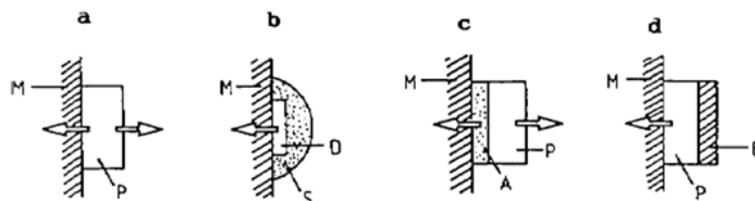
Los parches mucoadhesivos (formas de liberación bucal), se presentan como sencillos discos adhesivos o bien sistemas compuestos por láminas superpuestas, que serán convenientemente fijados a la membrana mucosa durante un tiempo prolongado. La tecnología de los parches bucales es relativamente reciente y su diseño está muy vinculado a la tecnología de los polímeros.

El sistema puede estar concebido de modo que el fármaco que se va liberando sea simultáneamente absorbido a través de la mucosa bucal, este tipo, denominado sistema de liberación unidireccional, libera el producto activo solo hacia la zona de mucosa bucal a la que esté adherida consiguiendo así una actividad sistémica. Los sistemas de liberación bidireccionales permiten la liberación del fármaco en dos sentidos, es decir hacia la zona mucosa ocupada por el bioadhesivo y en dirección opuesta, hacia la cavidad oral o la saliva, permitiendo una acción localizada. La incorporación del fármaco a la saliva puede conducir a pérdidas sustanciales debido a la involuntaria deglución de la saliva, aunque también es cierto que de esta manera toda la superficie de la cavidad oral está disponible para la absorción. Los sistemas unidireccionales disminuyen la pérdida de fármaco en saliva mediante capas protectoras adhesivas o impermeables.

Los esquemas de la fig. 2 muestran diferentes disposiciones de parches adhesivos bucales, propuestos Merkle et al, (1986) para liberación de péptidos. El tipo a, es un disco de polímero con el péptido, de liberación bidireccional desde el parche adhesivo por disolución o difusión.

El tipo b, libera unidireccionalmente desde el depósito de fármaco que se encuentra encastrado en la capa protectora adhesiva. En el tipo c, constituido por la superposición de dos capas, la adhesiva que lo fija a la mucosa y la capa externa portadora de fármaco, su liberación es bidireccional. Tipo d es una bicapa que adhiere la cara polimérica que sustenta el péptido a la mucosa y por medio de una lamina protectora o soporte impermeable convierte al parche en un sistema de liberación unidireccional.

Figura 10.1 Esquema de cuatro tipos de parches adhesivos para liberación bucal de péptidos. M. mucosa, P. polímero con péptido, D. depósito de fármaco, S. protector adhesivo, A. capa adhesiva, B. capa impermeable de refuerzo (Imagen tomado de Rodríguez I C, Cereso A, Salem LL. 2000. Sistemas de liberación bioadhesivos. *ArsPharmaceutica*. 41; vi: 115-28)



El polímero adhesivo puede desempeñar la función de portador de fármaco (tipo a y d), actuar como vínculo adhesivo entre la capa cargada de fármaco y la mucosa (tipo c) o, bien, el disco que contiene el fármaco puede estar fijado a la mucosa por medio de una capa protectora adhesiva (tipo b).

El polímero utilizado como mucoadhesivo puede ser alguno de los habituales para comprimidos o geles (hidroxipropilcelulosa, ácido poliacrílico, combinación de ambos, polimetacrilatos, otros derivados de la celulosa, etc.).

El tamaño del sistema es variable oscilando desde 10–15 cm², prefiriéndose la forma elipsoidal que se coloca únicamente en posición central de la mucosa bucal, hasta de 1-3 cm² mucho más convenientes y confortables, de aplicación en diversas zonas: labial, bucal, sublingual y gingival.

La aceptación por el paciente se mejora si al tamaño moderado se añade una alta flexibilidad, prerequisite para perfeccionar la adhesión y prevenir molestias locales.

El límite de tamaño y grosor determina que el fármaco a formular en parche mucoadhesivo tenga alta actividad farmacológica o bajo requerimiento de dosis, hasta 25 mg/día.

Además de las condiciones de dosis, las siguientes propiedades harán que un fármaco se convierta en un candidato apropiado para los parches bucales: vida media biológica relativamente corta (2-8 horas), disolución/absorción limitada en la zona estomacal o intestinal y susceptibilidad a la degradación por enzimas digestivo/ intestinales.

El metronidazol es un fármaco perteneciente al grupo de nitroimidazoles, que ejerce su efecto sobre tricomonas, espiroquetas y microorganismos anaeróbicos. Son numerosos los trabajos clínicos y bacteriológicos que han estudiado la acción del metronidazol en el tratamiento de la enfermedad periodontal(Gordillo, y col. 2005)

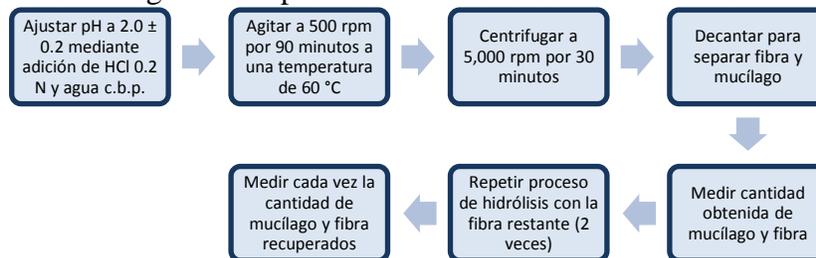
Con base en esto el objetivo de esta investigación fue diseñar y elaborar un parche que libere eficientemente al metronidazol para el tratamiento de una EP y que permanezca estable al sustituir los polímeros convencionales por biopolímeros como los polisacáridos extraídos de nopal.

10.1 Materiales y métodos

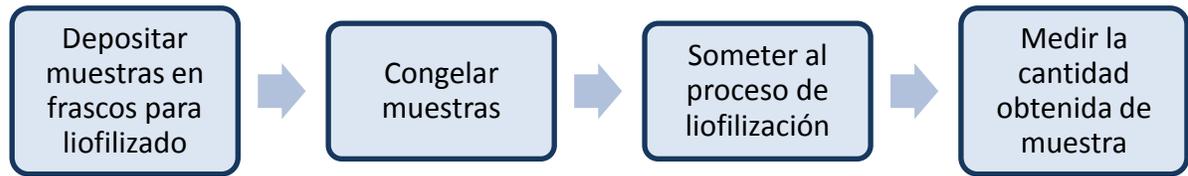
Las metodologías de extracción del mucilago cambian según la fuente (cladodio o fruto) y la parte concreta de la que se extraerá el hidrocoloide (piel, pulpa o semillas); en función de esto se obtienen diferentes grados de pureza (Abraján, 2008).

Existen básicamente tres métodos de extracción de pectina (mucilago): la hidrólisis ácida, la hidrolisis alcalina y la extracción enzimática. Para la obtención del mucílago para este trabajo se muestra en la fig. 3

Figura 10.2 Diagrama del proceso de hidrólisis ácida del extracto de Nopal

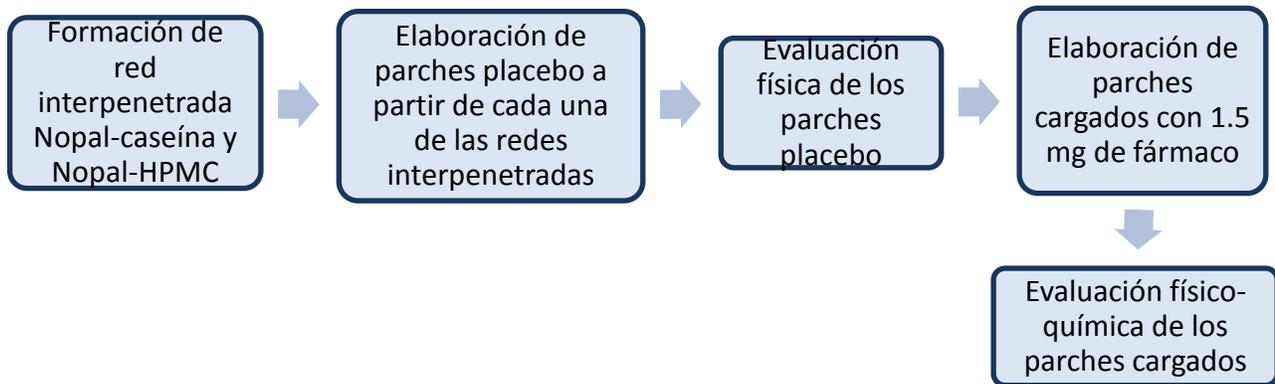


Una vez obtenida la muestra se seca para poderla emplear posteriormente, ver fig.4

Figura 10.3 Diagrama del proceso de secado de la muestra

En

la fig., se muestra el procedimiento general para la elaboración del parche.

Figura 10.4 Diagrama general para la elaboración de parches

Evaluación de las características farmacopéicas y farmacotécnicas del parche

Se desarrollaron un total de 6 formulaciones, siendo estas: formulación REF-C2/acetato, formulación REF-C2/aluminio, formulación REF-C3/acetato, formulación-D, formulación-D2 y formulación-E, a las cuales se les evaluaron: características organolépticas, variación de masa y uniformidad de contenido.

Características organolépticas

Se evaluó la homogeneidad de la superficie de los parches considerando los aspectos de: color, integridad y libre de burbujas. Los criterios de exclusión fueron la presencia de imperfecciones, aire atrapado y/o sabor desagradable.

Resistencia al plegado

La resistencia al doblamiento se determinó doblando los parches repetidas en el mismo número de veces de doblado sin romperse o hasta 100 veces.

Porcentaje de hinchamiento

Cada formulación de parche bucal fue calculada en función del incremento de su peso y área debido a su humectación de la siguiente manera:

Aumento de peso debido a la humectación: cada parche (1.5 x 1 cm) por cada lote fue pesado en un cubreobjetos previamente pesado, se coloca en una caja Petri y se adicionan 10 mL de buffer de fosfatos pH 6.8. Después de cada hora, el cubreobjetos se terira y se pesa. La diferencia en los pesos tomados da el aumento de peso debido a la absorción de agua.

Aumento del área debido al hinchamiento: se emplea una escala de medición calibrada para medir el incremento del área de cada parche. Se revisa el incremento del área en el diámetro de cada parche a intervalos de una hora durante 6 horas. El porcentaje en la proporción de peso y área al hincharse se calcula al partir de la medida de las tres mediciones mediante la siguiente ecuación:

$$\%S = [(X_t - X_o) / X_o] * 100$$

X_t = peso o área del parche hinchado después de un tiempo dado

X_o = peso o área original a un tiempo cero

Uniformidad de contenido

Se prepararon 12 parches de un tamaño uniforme de 1.5 x 1 cm de diámetro a partir de una sola mezcla. Cuatro de estos parches se emplearon para establecer las condiciones del proceso de sonicación, que fue necesario para la realización de la prueba.

Una vez definido el parámetro de sonicación, cada uno de los parches se fijo a la superficie de la pared interna de un vaso de precipitado de 50 mL con la ayuda de una tira adhesiva doble cara a una altura de 1 cm por encima de la base interna de éste, evitando que flotara en la solución, con 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 ± 0.1 a temperatura ambiente de $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y se sonicó durante 20 min a 50 Hz y a 90 pulsos. Transcurrido el tiempo, se procedió a filtrar la solución, desechando los primeros 5 mL y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de máxima absorción de 280 nm.

10.2 Análisis de resultados

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en relación a la evaluación de las características organolépticas de cada una de las formulaciones.

Tabla 10 Evaluación de las características organolépticas de cada una de las formulaciones del parche

Formulación del parche	Color	Apariencia	Precencia de burbujas	Superficie
REF-C2/acetato	blanco	opaco	no	rugosa
REF-C2/alumino	blanco	opaco	no	rugosa
REF-C3/acetato	blanco	opaco	no	rugosa
Formulación-D	blanco	opaco	no	lisa
Formulación-D2	blanco	transparente	no	liso-rugoso
Formulación-E	verde claro	opaco	porosidad	rugosa

La formulación-D se descartó debido a que resultó muy quebradiza, difícil de manipular

En la tablas 3 se muestran los resultados para cada formulación en relación a la prueba de resistencias al plegamiento.

Tabla 10.1 Resistencia al plegamiento

Formulación	No. De dobles
REF-C2/ acetato	>100
REF-C2/ aluminio	<100
REF-C3/ acetato	>100

Las formulaciones REF-C2/ aluminio, formulación-D2 y formulación E no pasaron la prueba debido a que los resultados obtenidos fueron menores a 100.

En la tabla 4 se muestra el resultado de la prueba de hinchamiento de las formulaciones REF-C2 y REF-C3.

Tabla 10.2 Resultados de la prueba de hinchamiento

Tiempo (h)	Formulación REF-C2/ acetato		Formulación REF-C3/acetato		
	% de aumento en peso	% de aumento en área	Tiempo (h)	% de aumento en peso	% de aumento en área
0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1	127.23	13.43	1	122.32	12.33
2	168.30	3.84	2	148.30	2.84
3	131.70	5.87	3	132.60	4.87
4	139.60	5.26	4	129.60	4.36
5	124.01	6.19	5	124.01	5.18
6	157.48	4.00	6	156.23	3.00

En la tabla 5 se muestran los resultados de la uniformidad de contenido.

Tabla 10.3 Uniformidad de contenido de metronidazol de las formulaciones de parches de nopal

Formulación REF-C2/ acetato		Formulación REF-C3/acetato	
Metronidazol recuperado (mg)	% Recuperado	Metronidazol recuperado (mg)	% Recuperado
0.568	37.84	0.566	37.73
0.520	34.66	0.518	34.53
0.663	44.19	0.660	44.00
0.817	54.47	0.814	54.26
0.557	37.12	0.553	36.86
0.920	61.36	0.917	61.13
Promedio	44.94±10.75	Promedio	44.75±10.72

10.3 Conclusiones

De las 6 formulaciones desarrolladas, sólo dos de ellas la REF-C2 y la REF-C3, conteniendo el 30 y 40 por ciento de extracto de nopal respectivamente, cumplieron parcialmente con las especificaciones farmacotécnicas, observándose lo siguiente: en relación a la prueba de hinchamiento; la relación que existe entre el aumento del área con relación al hinchamiento de este sistema de entrega nos permite suponer que no habrá un desprendimiento prematuro de la cavidad bucal a causa de una interacción con el caudal de saliva promedio en el cuerpo humano (40 mL).

Estas formulaciones mostrarán tener alta resistencia a la manipulación al obtenerse valores mayores a 100 en relación al plegado.

En cuanto a la prueba farmacopéica relacionada con la uniformidad de contenido no es lo que se esperaba, debido a que el porcentaje de fármaco cuantificado para esta presentación farmacéutica fue baja siendo 44.94 ± 10.75 para la formulación REF-C2/ acetato y de 44.75 ± 10.72 para la formulación formulación REF-C3/acetato

Estas formulaciones de parche conteniendo como excipiente a una goma extraída del nopal nos permitió observar la utilidad que este puede tener en el desarrollo de este tipo de formulaciones de liberación modificada y que son susceptibles de ser mejoradas, para después evaluar la capacidad de liberación del fármaco determinando su perfil de disolución.

10.4 Referencias

Abraján, (2008). Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucilago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Valencia; Valencia, España.

Aza y Méndez (2011). Extracción de pectina de nopal (*Opuntia Ficus-Indica*) por medio ácido aplicando dos niveles de temperatura, tiempo y estados de madurez. Tesis de Licenciatura, Universidad Técnica del Norte, Fac. de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales; Ibarra, Ecuador.

Cochran, D. (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodonto*. 2008; 7 supl.8: 1569-1576

Gordillo M, Meheris H, Ruiz Holagado N, López Miranda L, Garat J. (2005). Metronidazol en el tratamiento de peridontitis experimentales. Estudio histomorfométrico. *Acta Odontol. Venez*. 3; 43.

Jimenez, M., Krall, E. A., Garcia, R., Pantel, S., Vokonas, M. and Thomas, D. (2009) Periodontitis and incidence of cerebrovascular disease in men. *Ann Neurol*. 66(4):505-512

Maestre, J. (2002). Infecciones bacterianas mixtas de la cavidad oral. *Enferm. Infecc Microbiol Clin*. 20 Supl 2:98-101

Moreno Chaparro N. (2011). Simulación molecular del comportamiento mucoadhesivo de biopolímeros farmacéuticos en contacto con mucinas. Tesis de maestría. Bogotá Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.

Negróni, M. (2009) Microbiología: fundamentos y guía práctica. Ed. Médica Panamericana. 2da. Edición. Buenos Aires, Argentina 275-287

Rodríguez I C, Cereso A, Salem LL. (2000). Sistemas de liberación bioadhesivos. *ArsPharmaceutica*. 41; vi: 115-28).

Rossi, S, Sandri, G., Caramella, C. (2005). Bucaldrug delivery: A challenge already won?. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2:159-65

Secretaría de Salud, (2008). Programa de acción específico 2007-2012. *Salud Bucal*. Primera edición. México.

Scheres, N., Laine, M.L., DeVries, T.J., Everts, V and Van Winkelhoff, A.J. (2010)Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonasgingivalis*. *J Periodont Res*, 45:262-270

Seymour, G.(2007) Relationship between periodontal infections and systemic disease. *ClinMicrobiol Infect*. 13 Suppl. 4:3-10

Shaddox,M. y Walker, B. 2010 Treating chronic periodontitis: current status, challenges and future directions. *Clinical Cosmetics and Investigational Dentistry*, 2:79-91