



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DESARROLLO DE UN CHICLE BIODEGRADABLE
INHIBIDOR DEL *Streptococcus mutans* INVOLUCRADO
EN LA FORMACIÓN DE LA CARIES

TESIS

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

MARA NIETO HERNÁNDEZ

ASESORA: DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE

COASESORA: IQ. GUADALUPE FRANCO RODRIGUEZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
EXÁMENES PROFESIONALES



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo Profesional

Desarrollo de un chicle biodegradable inhibidor del Streptococcus mutans involucrado en la formación de la caries

Que presenta la pasante: Mara Nieto Hernández

Con número de cuenta: 304285509 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
VOCAL	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
SECRETARIO	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
1er. SUPLENTE	M. en C. Titis Nopal Guerrero	
2do. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Amaya León	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIA

Dedico esta tesis:

A mi papá **Francisco**, que siempre me apoyó incondicionalmente, con todo el amor de un excelente padre.

A mi mamá **Imelda**, que siempre estuvo presente en los momentos importantes y me demostró el amor indescriptible que solo una madre sabe dar.

A mi hermana y mejor amiga **Merari**, que siempre confió en mí y me regaló momentos invaluable que quedarán grabados en mi corazón.

“Llevo tu corazón conmigo, lo llevo en mi corazón”

A mi esposo y amor de mi vida **Josué**, que siempre me ha apoyado y amado de todas las maneras posibles.

A mi abuelita **Quetita**, que siempre me ha recibido en su casa con los brazos abiertos, con unos pambazos o con un pan rosado.

A mi amiga **Mayra**, que me ha enseñado el valor de la amistad, como una verdadera hermana.

Y a mis angelitos **Arisai, Juanito, Amalia y Pancho (Q.E.P.D)**, siempre están en mi corazón y pensamientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente:

A **DIOS** nuestro creador y Rey del Universo por darme la vida, amarme, escucharme y darme la paz que sobrepasa todo entendimiento.

A la **Dra. Clara Inés Álvarez Manrique** por apoyarme y creer en mí todo el tiempo, desde mi servicio social hasta mi examen profesional.

A la **I.Q Guadalupe Franco Rodríguez** por ayudarme en todo momento, con la planeación, experimentación y redacción de mi tesis.

Al **M.C. Víctor Manuel Ávalos Ávila** por apoyarme en uno de los momentos más difíciles de mi carrera.

A la **Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz** por su dedicación y apoyo como coordinadora de la carrera y profesora de LEM 1.

Al **Sr. Alejandro Rivera Salazar** por ser un enorme apoyo durante la experimentación de mi tesis.

A mis suegros **Elizabeth Zepeda y Gerardo Cuevas**, por recibirme siempre con los brazos abiertos.

Al **Mtro. Patricio Méndez Garrido** por ser uno de los mejores maestros que he conocido en la vida.

Contenido

Índice de Tablas	4
Índice de Figuras.....	6
Resumen.....	8
Introducción	9
1. Antecedentes.....	12
1.1. La contaminación ambiental.....	12
1.1.1. Polímeros sintéticos no biodegradables que producen contaminación ambiental .	13
1.2. Degradación	14
1.2.1 Biodegradación	15
1.3. La caries dental	15
1.3.1. Etiología de la caries dental	16
1.3.2. La placa dental bucobacteriana	17
1.3.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	18
1.3.2.1.1. Nutrición y condiciones del crecimiento del <i>Streptococcus mutans</i>	19
1.3.2.1.2 Identificación del <i>Streptococcus mutans</i>	20
1.3.2.1.3 El <i>Streptococcus mutans</i> y su papel en la formación de la caries	20
1.3.3. Formas de prevenir la caries	21
1.3.3.1. Estrategia mecánica	22
1.3.3.2. Disciplina con el azúcar	22
1.3.3.3. Selladores de cavidades y fisuras	23
1.3.3.4. Control químico de la placa	23
1.3.3.4.1. Inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> por medio de <i>Lactobacillus spp</i>	24
1.3.3.4.1.1. Lactobacilos	26
1.4. Microencapsulación	27
1.5. <i>Stevia rebaudiana</i>	28
1.5.1. Actividad inhibitoria de la stevia rebaudiana sobre el <i>Streptococcus mutans</i>	29
1.6. El chicle tradicional	29
1.6.1. Formulación del chicle tradicional	30

1.6.2.	Proceso de elaboración del chicle tradicional.....	32
1.7.	El chicle biodegradable.....	33
1.7.1.	Zeína	33
1.7.2.	Papaína.....	35
1.7.2.1.	Efectos antimicrobianos de la papaína.....	36
1.7.3.	Formulación del chicle biodegradable.....	36
1.7.4	Elaboración del chicle biodegradable.....	38
1.7.4.1.	Puntos críticos presentes en la polimerización enzimática a partir de compuestos degradables como la zeína	38
1.7.5.	Caracterización del chicle biodegradable	39
1.7.5.1.	Análisis del perfil de textura	39
1.7.5.2.	Actividad de agua	41
1.7.5.3.	Temperatura de transición vítrea	43
2.	Objetivos	45
2.1	Objetivo general	45
2.2	Objetivo particular 1	45
2.3	Objetivo particular 2	45
2.4	Objetivo particular 3	45
2.5	Objetivo particular 4	45
3.	Metodología experimental	47
3.1	Cuadro metodológico	47
3.2	Desarrollo de la formulación del chicle	49
3.3	Caracterización del chicle	53
3.3.1	Análisis de textura	53
3.3.2	Cálculo de densidad	54
3.3.3	Determinación de la actividad de agua	55
3.3.4	Cálculo de la temperatura de transición vítrea	56
3.4	Evaluación de la capacidad de biodegradación del chicle	57
3.5	Estudio bacteriológico del <i>Streptococcus mutans</i>	59
3.5.1.1	Recolección de muestra de placa dental bucobacteriana	59
3.5.1.2	Siembra bacteriana de la placa dental bucobacteriana recolectada	59

3.5.1.3 Identificación del <i>Streptococcus mutans</i> mediante las pruebas bioquímicas correspondientes	61
3.5.2 Estudio bacteriológico de <i>Lactobacillus spp</i>	64
3.5.2.1 Siembra bacteriana de lactobacilos	64
3.5.2.2 Identificación de lactobacilos mediante las pruebas bioquímicas	65
3.5.3 Prueba de inhibición	65
3.5.4 Microencapsulación	66
3.5.5 Elaboración del centro líquido del chicle biodegradable	67
4. Resultados y análisis de resultados	71
4.1 Desarrollo de la formulación del chicle	71
3.1 Caracterización del chicle	74
3.1.1 Análisis de textura	74
3.1.2 Cálculo de la densidad	79
3.1.3 Evaluación de la actividad de agua	82
3.1.4 Cálculo de la temperatura de transición vítrea	84
3.2 Evaluación de la capacidad de biodegradación del chicle	87
3.2 Estudio bacteriológico del <i>Streptococcus mutans</i>	93
3.3 Estudio bacteriológico de <i>Lactobacillus reuteri</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	96
Conclusiones	101
Referencias	103

Índice de Tablas

Tabla 1. Productos elaborados con polímeros no biodegradables	13
Tabla 2. Mecanismos de degradación	14
Tabla 3. Clasificación de <i>Streptococcus mutans</i>	19
Tabla 4. Artículos que concluyen las propiedades inhibitorias de <i>Lactobacillus spp</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i>	25
Tabla 5. Clasificación de <i>Lactobacillus spp</i>	26
Tabla 6. Ingredientes básicos del chicle tradicional	30
Tabla 7. Composición porcentual aproximada de una goma base	31
Tabla 8. Composición porcentual de aminoácidos de la zeína del maíz	34
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de la zeína	35
Tabla 10. Funcionalidad de cada ingrediente en la elaboración del chicle biodegradable ...	37
Tabla 11. Definición de los parámetros mecánicos	40
Tabla 12. Dseño de experimentos factorial 2^2	49
Tabla 13. Formulación del medio Mitis salivarius	60
Tabla 14. Formulación del medio Tripticasa soya con sacarosa y extracto de levadura	60
Tabla 15. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Streptococcus mutans</i>	61
Tabla 16. Fundamentos de las pruebas bioquímicas utilizadas	63
Tabla 17. Composición del medio Rogosa	64
Tabla 18. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Lactobacillus spp.</i>	65
Tabla 18. Formulación del centro líquido del chicle	67
Tabla 20. Formulaciones del chicle de acuerdo al diseño de experimentos	71
Tabla 21. Formulación final del chicle biodegradable	72
Tabla 22. Resultados obtenidos en el texturómetro para los parámetros de dureza y elasticidad	74
Tabla 23. Prueba t estadística para el parámetro de dureza	75
Tabla 24. Prueba t estadística para el parámetro de elasticidad	75
Tabla 25. Resultados de densidad	79
Tabla 26. Prueba estadística t para densidad	79
Tabla 27. Resultados para actividad de agua	82

Tabla 28. Prueba estadística t para actividad de agua.....	82
Tabla 29. Temperatura de transición vítrea de cada componente.....	85
Tabla 30. Resultados de temperatura de transición vítrea	86
Tabla 31. Pérdida de peso en agua de lago	87
Tabla 32. Pérdida de peso en la simulación de relleno sanitario	88
Tabla 33. Resultados del porcentaje de mineralización.....	89
Tabla 34. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación del <i>Streptococcus mutans</i>	94
Tabla 35. Tasa de mortalidad y sobrevivencia de <i>Streptococcus mutans</i> después de 2 horas del contacto con los metabolitos de <i>Lactobacillus spp</i>	97
Tabla 36. Tasa de mortalidad y sobrevivencia de <i>Streptococcus mutans</i> después de 4 horas de contacto con los metabolitos de <i>Lactobacillus spp</i>	97
Tabla 37. Tasa de mortalidad y sobrevivencia de <i>Streptococcus mutans</i> después de 8 horas de contacto con los metabolitos de <i>Lactobacillus spp</i>	97
Tabla 38. Tasa de mortalidad de <i>Streptococcus mutans</i> después de 24 horas del contacto con los metabolitos de <i>Lactobacillus spp</i>	98

Índice de Figuras

Figura 1. Cavidad ocasionada por la caries	16
Figura 2. Triada de Keyes modificada.....	17
Figura 3. Partes de la semilla del maíz	33
Figura 4. Curva típica de fuerza-deformación	41
Figura 5. Curvas de sorción	42
Figura 6. Diagrama de bloques del proceso.....	51
Figura 7. Texturómetro universal	53
Figura 8. Geometría esfera de 1/4.....	54
Figura 9. Higrómetro marca AQUALAB	55
Figura 10. Calorímetro diferencial.....	56
Figura 11. Montaje del relleno sanitario y la trampa de CO ₂	58
Figura 12. Montaje del agua de lago y la trampa de CO ₂	58
Figura 13. Diagrama de inoculación bacteriana	60
Figura 14. Diagrama de bloques para el proceso del centro líquido.....	68
Figura 15. Gráfico comparativo para el parámetro dureza	76
Figura 16. Gráfico comparativo para el parámetro elasticidad.....	77
Figura 17. Gráfico comparativo de densidad.....	80
Figura 18. Gráfico comparativo para actividad de agua	83
Figura 19. Termogramas de los componentes principales del chicle biodegradable.....	84
Figura 20. Termogramas del potenciador de sabor, saborizante, glucosa y edulcorante.....	82
Figura 21. Termogramas del colágeno hidrolizado, colorante y aceite parcialmente hidrogenado.....	82
Figura 20. Curvas de gravimetría para las distintas formulaciones después de ser expuestos a agua de lago	88
Figura 21. Curvas de gravimetría para las distintas formulaciones después de ser expuestas a la simulación de relleno sanitario	89
Figura 22. Gráfico comparativo de porcentajes mineralización	90
Figura 23. Tinción de gram para el <i>Streptococcus mutans</i>	95

Figura 24. Curvas de supervivencia de *Streptococcus mutans* ante la acción metabólica de *Lactobacillus spp* 98

Resumen

La presente investigación propone una alternativa para reducir dos problemáticas actuales como son la contaminación ambiental y la caries dental. Esta propuesta es por medio del desarrollo de un chicle biodegradable inhibidor del *Streptococcus mutans* involucrado en la formación de la caries dental.

El trabajo de investigación inicia con una recopilación bibliográfica tanto de la contaminación ambiental como de la caries dental, abarcando sus causas, consecuencias y algunas propuestas de control. Para el control de la caries dental se propone la inhibición del *Streptococcus mutans* a través de la acción metabólica de lactobacilos; asimismo para el caso de la contaminación ambiental se propone la creación de un chicle biodegradable formulado a partir de la polimerización de proteínas de productos naturales como la zeína del maíz.

Se realizaron 4 diferentes chicles a partir de la zeína del maíz, cada uno de ellos con distintas formulaciones; cada formulación se sometió a diversas pruebas, incluyendo la prueba de capacidad de biodegradación. Por otro lado, se evaluó “in vitro” la capacidad de inhibición del *Streptococcus mutans* a través de la acción metabólica de 3 diferentes lactobacilos.

Tras realizar algunos cálculos, las formulaciones evaluadas mostraron ser capaces de desaparecer en menos de 6 meses; a su vez los lactobacilos evaluados fueron capaces de reducir considerablemente el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Por lo tanto se pudo concluir que es factible el desarrollo de un chicle biodegradable y preventivo de la caries dental para su posterior industrialización y/o comercialización.

Introducción

El chicle es un polímero masticable que sufre diversos cambios hasta obtener una estructura gomosa de sabor agradable. Fue descubierto en la época prehispánica por los mayas quienes se dieron cuenta que la resina de árbol se podía mascar, sin embargo, actualmente la mayoría de los chicles que se encuentran en el mercado están hechos a base de polímeros sintéticos que causan contaminación ya que tardan de 5 a 30 años en degradarse. Además los chicles y otros polímeros provienen del petróleo y este es un recurso no renovable que se estima que desaparecerá en aproximadamente 50 años, lo que se convierte en una problemática actual (Meneses y Corrales, 2001).

A mediados del siglo pasado, fracciones proteicas del maíz combinadas con plastificantes como glicoles y amidas empezaron a usarse en la elaboración de polímeros como películas comestibles, películas fotográficas, microesferas (Shukla y Munir, 2001) o gomas de mascar (Mc Gowan y Padua, 2005) debido a su gran capacidad de gelación. Cuando existe la acción de alguna enzima proteolítica con las fracciones proteicas del maíz, una temperatura y un pH adecuado, ocurre una reacción que permite obtener polímeros como el chicle (Shukla y Munir, 2001).

La caries dental es otra problemática actual que se define como una enfermedad crónica e infectocontagiosa que afecta al 90% de la población mundial. La caries es causada por una serie de factores interrelacionados entre sí. Estos factores son: el tiempo, la dieta y los microorganismos como el *Streptococcus mutans*, principalmente. Loesche la definió como una de las infecciones más caras que tienen que afrontar las personas a lo largo de su vida (Loesche, 1986).

Ishihara realizó un estudio en donde concluyó que bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir al *Streptococcus mutans*, ayudando en la prevención de la caries dental (Ishihara e Hikoro, 1985).

Por esta razón, se propone que el chicle antes mencionado apoye a la prevención de la caries por medio de la inhibición del *Streptococcus mutans* por acción de *Lactobacillus reuteri* o *Lactobacillus casei*, estos lactobacilos tienen propiedades básicas que los hacen

apropiados para ser usados en la inhibición del *Streptococcus mutans*, ya que no causan enfermedad por sí mismos, mantienen estabilidad genética durante mucho tiempo, poseen características fenotípicas que actúan sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans* e impide su colonización (Ishihara y Hikoro, 1985). .

Además el chicle, al ser formulado con una fracción proteica del maíz, tiene características semejantes a las de los chicles convencionales y ofrece características biodegradables, ya que tarda aproximadamente 6 meses en degradarse.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1. Antecedentes

1.1. La contaminación ambiental

La contaminación ambiental es uno de los más graves problemas que afecta a la humanidad. Se produce cuando se incorporan en el ambiente, de manera artificial o natural, elementos biológicos, químicos o físicos que lo alteran, perturbando el equilibrio ecológico, poniendo en peligro a la supervivencia de miles de especies y afectando de manera adversa la salud humana (Ríos y Pimentel, 2003).

Entre sus causas más importantes, se encuentran la utilización de combustibles impuros, el parque vehicular y la deficiencia en su mantenimiento, la intensidad energética en los procesos industriales, la falta de reglamentos eficaces en materia de calidad del aire y la presencia de materiales extraños no biodegradables.

La contaminación ambiental tiene grandes consecuencias que dañan la naturaleza de manera drástica, muchas veces de forma irreversible. Algunas de sus consecuencias son:

- Lluvia ácida: Es toda aquella precipitación que contiene ácidos disueltos. Daña los bosques, cosechas, materiales de construcción y se relaciona con la pérdida de la biodiversidad.
- Efecto invernadero: Es el calentamiento de la atmósfera debido a la excesiva concentración de gases. Una de sus principales consecuencias es el calentamiento global de la tierra.
- Destrucción de la capa de ozono: La destrucción de la capa de ozono permite el aumento de radiación UV y afecta la biodiversidad, ya que la mayoría de organismos son vulnerables a la exposición de dichos rayos.
- Smog fotoquímico: Se produce cuando las moléculas contaminantes son alteradas por la radiación solar, por lo que se vuelven muy reactivas. La presencia de smog fotoquímico reduce la visibilidad y provoca irritación en los ojos (Ríos y Pimentel, 2003).

1.1.1. Polímeros sintéticos no biodegradables que producen contaminación ambiental

En la actualidad, existe un gran número de polímeros que produce contaminación ambiental. Esto es debido a su baja biodegradabilidad y por consiguiente su alta generación de residuos.

Los polímeros son macromoléculas de gran estabilidad estructural, es por esta razón que son muy resistentes a las agresiones climáticas y ambientales (Meneses y Corrales, 2007).

Durante los últimos años, la industria de los polímeros ha tenido un crecimiento acelerado, llegando a tener una producción mayor que la industria del aluminio y del acero juntas (Bower, 2002). En los años sesenta, cuando los polímeros sintéticos salieron al mercado, una de sus características era su durabilidad; más con el paso del tiempo, esta característica se fue convirtiendo en un problema, debido a que dichos polímeros podían tardar más de 500 años en degradarse (Ruíz *et al*, 2009).

Otro problema que presentan los polímeros es que la mayoría de ellos son derivados del petróleo, dependen en su totalidad de este recurso no renovable que se estima que desaparecerá en 50 años (Meneses y Corrales, 2007). A continuación se muestran algunos ejemplos de productos de consumo cotidiano elaborados a base de polímeros sintéticos y el tiempo que cada uno tarda en degradarse (Ríos y Pimentel, 2003):

Tabla 1. Productos elaborados con polímeros no biodegradables.

Producto de consumo cotidiano	Polímero con que está elaborado	Tiempo en que desaparece
Chicles	Polivinilacetato	5 años
Botellas	Politereftalato.	100 años
Juguetes	Polivinilo	300 años
Unicel	Poliestireno	500 años

1.2. Degradación

La degradación corresponde a un proceso en donde la materia sufre cambios químicos en su estructura, los cuales a la vez producen una pérdida de sus propiedades. Estos cambios se realizan debido a la acción de un agente de degradación que puede ser temperatura, luz UV o microorganismos. Finalmente la materia que ha sido degradada provoca restos en el medio ambiente.

Para que exista la degradación de un material, debe haber 3 componentes fundamentales:

- Sustrato (sustancia química o materia orgánica)
- Agente que efectúe la degradación
- Ambiente de características específicas (Castillo *et al*, 2005)

La siguiente tabla muestra los mecanismos de degradación. Cada uno de los mecanismos tiene diferentes agentes degradantes, efectos en la materia y restos en el medio (Castillo *et al*, 2005).

Tabla 2. Mecanismos de degradación de los materiales

Mecanismo de degradación	Agente degradante	Efecto en la materia	Restos en el medio
Termodegradación	Temperatura	Pérdida de color y de propiedades físicas	Compuestos fenólicos tras la degradación
Fotodegradación	Luz UV	Cambios en las propiedades físicas	Óxidos de Zn, Fe, Mg de los aditivos
Degradación química	Todos a la vez	Toxicidad en el medio no controlable	Compuestos químicos de toxicidad variable
Biodegradación	Hongos, algas y bacterias	CO ₂ + H ₂ O + Humus	Residuo asimilable por plantas

1.2.1 Biodegradación

La biodegradación es el resultado de asimilación, metabolización y digestión de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos y otros organismos.

Puede llevarse a cabo en presencia o en ausencia de oxígeno. La primera es más completa debido a que libera energía, dióxido de carbono y agua. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía.

Los agentes degradantes que participan en la biodegradación, es decir, los hongos, bacterias y algas que degradan la materia a fragmentos más pequeños y de menor peso molecular, requieren de ciertos factores para metabolizar sustratos: humedad, oxígeno, pH, temperatura adecuada. Finalmente son las enzimas las ejecutoras de la degradación (Castillo *et al*, 2005).

1.3. La caries dental

La palabra caries proviene del latín y significa degradación. Es sencillamente la degradación o ruptura de los dientes (Silverstone *et al*, 1985). Según la OMS es “aquella lesión patológica que reblandece los tejidos duros del diente y que llega a formar una cavidad en estos tejidos” (Huerta, 1975). Loesche la definió como una de las infecciones más caras que tienen que afrontar las personas a lo largo de su vida (Loesche, 1986). Joklik, a su vez, la describió como una enfermedad crónica infectocontagiosa que afecta al 90% de la población (Joklik *et al*, 1987).

La cavidad ocasionada por la caries dental comienza en la superficie del esmalte, llegando a la segunda capa del diente llamada dentina y en procesos muy profundos afectando la pulpa o parte vital, formada por un tejido conectivo donde se encuentra el nervio (Silverstone *et al*, 1985).

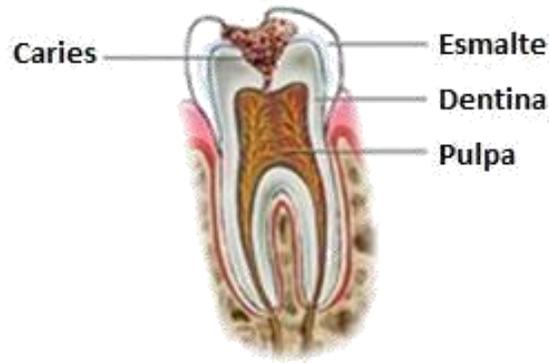


Figura 1. Cavidad ocasionada por la caries

A menos que se reciba un tratamiento satisfactorio, el diente afectado puede perderse y posteriormente conducir a un deterioro estético y alteraciones del habla y de la función masticatoria. Estas consecuencias influyen en la calidad de vida del individuo y por lo tanto dicha enfermedad no debe subestimarse (Silverstone *et al*, 1985).

1.3.1. Etiología de la caries dental

La caries es una enfermedad multifactorial que ocurre únicamente cuando existen tres factores a la vez:

- Factores de substrato o de la dieta consumida, principalmente carbohidratos.
- Factores propios del huésped representado por los dientes.
- Factor microbiano, principalmente el *Streptococcus mutans*.

Estos tres factores son los factores primarios que inciden en la producción de la caries dental y representan la clásica “Triada de Keyes”, a la que posteriormente se le agregó un factor más que es el tiempo, estableciendo así la “Triada de Keyes modificada” (Joklik *et al*, 1987).

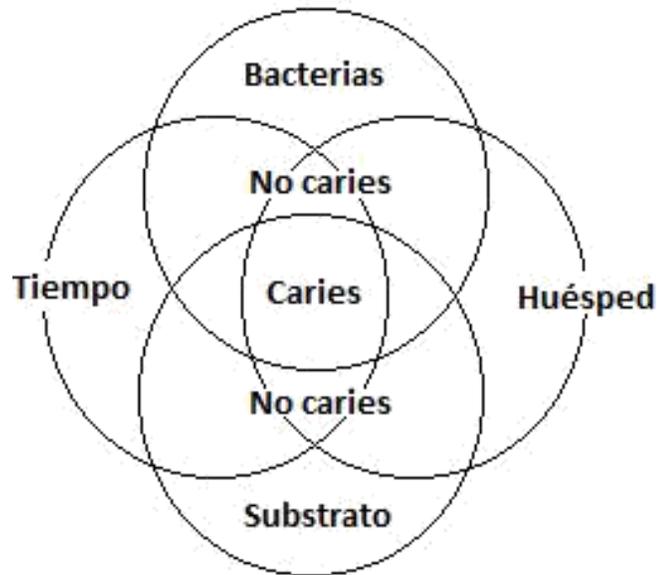


Figura 2. Triada de Keyes modificada

Para que se desarrolle la caries dental estos factores no solo deben estar presentes, sino que también deben interactuar en condiciones óptimas (Joklik *et al*, 1987).

1.3.2. La placa dental bucobacteriana

La placa dental bucobacteriana se define como una masa blanda, tenaz y adherente de colonias bacterianas que se coleccionan sobre la superficie de los dientes y otras superficies bucales.

La OMS la define como “Una entidad bacteriana proliferante, enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria y que por su actividad bioquímicamente metabólica ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries”

Las bacterias que la forman, desarrollan unas sustancias llamadas adheninas que se encargan de unirse a receptores glucosídicos que se encuentran en una película que se forma en el esmalte del diente minutos después de tener higiene bucal (Poyato *et al*, 2001).

La película adquirida es una delgada cutícula de aproximadamente 10 µm de espesor que recubre todas las superficies dentarias expuestas al medio bucal.

La composición de esta película consiste en proteínas presentes en la saliva como son amilasa, lisosima, albúmina y además la enzima bacteriana glucosiltransferasa, que juega un papel importante en la aparición de la caries dental (Poyato *et al*, 2001).

Los principales microorganismos que componen la placa dental bucobacteriana son los del grupo de los *Streptococcus viridans*, al cual pertenece el *Streptococcus mutans*, principal responsable de la caries (Silverstone *et al*, 1985).

1.3.2.1 Streptococcus mutans

Streptococcus mutans es una especie bacteriana cococaea, gram positiva, catalasa negativa y microaerofílica que se presenta en pares o cadenas cortas. Su diámetro va de 0.5 a 1 µm (Joklik *et al*, 1987).

El nombre *mutans* se le dio debido a que el microorganismo cambia de manera característica de un coco a un bastón, bajo ciertas condiciones de cultivo, como por ejemplo un pH bajo.

Streptococcus mutans es capaz de fermentar una amplia variedad de sustratos de carbohidratos produciendo un pH terminal de 4.2 a 4.6 (Silverstone *et al*, 1985). Por esta razón se considera de importancia particular en la etiología de la caries dental.

La clasificación del *Streptococcus mutans* se encuentra en la siguiente tabla (Konemann, 1999):

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Streptococcus mutans*

Dominio	Bacteria
Filo	<i>Firmicutes</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Streptococcaceae</i>
Género	<i>Streptococcus</i>
Especie	<i>Streptococcus viridans</i>
Grupo	<i>Streptococcus mutans</i>
Serotipo	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus cricetus</i> , <i>Streptococcus ratus</i> , <i>Streptococcus fenus</i> , <i>Streptococcus macacae</i>

1.3.2.1.1. Nutrición y condiciones del crecimiento del *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es una especie exigente en sus requerimientos nutricionales, por lo que para poder desarrollarse “in vitro”, el medio de cultivo debe ser rico en proteínas y azúcares.

Los medios más usados en el cultivo de *Streptococcus mutans* son los siguientes (Medina *et al*, 2005):

- Mitis Salivarius
- Infusión Cerebro Corazón
- Tripticasa Soya con extracto de Levadura y Sacarosa
- Todd Hewitt

El primer medio es un medio selectivo. Debido a la presencia de colorantes, permite distinguir fácilmente las colonias ya que estas crecen con un color azul; si se añade bacitracina a la formulación puede haber inhibición de otros microorganismos. Los otros medios son usados para purificación del microorganismo.

La incubación del *Streptococcus mutans* debe ser a una temperatura de 37°C durante un tiempo de 48 horas, con un pH aproximado de 7.4. Preferentemente debe existir anaerobiosis y presencia de CO₂ (Bojanich *et al*, 2003).

1.3.2.1.2 Identificación del *Streptococcus mutans*

Las colonias de *Streptococcus mutans* se identifican en base a la siguiente batería de pruebas bioquímicas: gram, catalasa, rojo de metilo, Vogues Proskauer, fermentación de manitol, sorbitol, rafinosa y arabinosa (Sánchez y Acosta, 2004).

1.3.2.1.3 El *Streptococcus mutans* y su papel en la formación de la caries

Durante la formación de la caries, *Streptococcus mutans* actúa como agente etiológico de la siguiente manera:

- Se adhiere el microorganismo a la película formada debido a las proteínas de la saliva debido a las adheninas que este produce.
- En presencia de sacarosa, *Streptococcus mutans* separa el disacárido en sus dos monosacáridos: glucosa y fructosa, debido una a hidrólisis por acción de la dextrasacarosa celular.
- *Streptococcus mutans*, realiza la vía glucolítica para la degradación de la glucosa.
- El piruvato obtenido en la vía glucolítica se reduce a ácido láctico debido a una fermentación homoláctica por acción de la enzima láctica deshidrogenasa

- El ácido láctico producido reduce el pH de la cavidad bucal hasta 5.4 y por este descenso se debilita la membrana del esmalte.
- La glucosa se sintetiza por medio de la enzima glucosiltransferasa contenida en la película formada debido a la saliva y se producen dextranos que provocan aún más adherencia que las adheninas (Poyato *et al*, 2001)

1.3.3. Formas de prevenir la caries

La caries es una enfermedad que puede prevenirse de forma absoluta, por medios relativamente simples. Pueden hacerse intentos para prevenir la caries, controlando cualquiera de los factores que interactúan en la formación de la misma:

- Control de factores del substrato
- Control de factores propios del huésped
- Control del factor microbiano (Silverstone *et al*, 1985).

Harris y García propusieron cuatro estrategias generales para prevenir la caries:

1. Estrategia mecánica
2. Disciplina con el azúcar
3. Uso de selladores de cavidades y fisuras
4. Control químico de la placa (Harris y García, 2005).

Estas cuatro estrategias generales engloban el control de cada uno de los tres factores etiológicos.

Las estrategias anteriores pueden complementarse con dos requerimientos administrativos también propuestos por Harris y García:

1. Educación y promoción de la salud.
2. Establecer acceso a centros dentales en donde se presten los servicios de diagnóstico, restaurativos y preventivos (Harris y García, 2005).

1.3.3.1. Estrategia mecánica

La placa dental bucobacteriana y los restos de alimentos deben ser retirados diariamente por métodos mecánicos como el cepillado y el uso de hilo dental.

Un especialista también puede retirar la placa dental mediante un método mecánico como parte de una profilaxis oral; sin embargo resulta más eficaz el retiro cotidiano de la misma (Harris y García, 2005).

Es importante que el cepillado dental se lleve a cabo diariamente, por lo menos dos veces al día. De no ser así, el diente quedará más susceptible a la caries dental debido a que los residuos no retirados servirán de sustrato para los microorganismos orales (Poyato *et al*, 2001).

1.3.3.2. Disciplina con el azúcar

Los azúcares son considerados como el factor alimentario más importante en la aparición de la caries dental debido a que a partir del metabolismo de la sacarosa el *Streptococcus mutans* produce ácido láctico, el cual desciende el pH del diente y por ende ocasiona una debilitación del esmalte (Joklik *et al*, 1987).

Una reducción de carbohidratos en la dieta, disminuiría la aparición de caries, debido a que los microorganismos tendrían menor cantidad de sustrato y por ende el pH no descendería tanto como para debilitar el esmalte.

Asimismo, la sacarosa puede ser sustituida por edulcorantes no cariogénicos (Harris y García, 2005) como la sucralosa, la sacarina, el aspartame (Badui, 2006) o la *stevia* (De Paula *et al*, 2003).

1.3.3.3. Selladores de cavidades y fisuras

La disponibilidad de selladores ofrece posibilidades de restauración. Con la utilización de una capa delgada de un plástico las cavidades dentales se aíslan de una manera eficaz respecto al ambiente oral.

Durante el tiempo de permanencia de los selladores, ninguna bacteria puede afectar las superficies selladas (Harris y García, 2005).

1.3.3.4. Control químico de la placa

El control químico de la placa engloba:

- El uso de fluoruros para inhibir la desmineralización y promover la remineralización
- El uso de agentes antimicrobianos para suprimir las bacterias cariogénicas

El flúor al ser aplicado en los dientes aumenta la resistencia del esmalte y favorece la remineralización. El ion fluoruro junto con el calcio contenido en los dientes forma fluoruro de calcio y esto hace que el esmalte sea más fuerte. El flúor a su vez aumenta el pH del diente ya que después de la fermentación de los azúcares, este es sumamente ácido. Al ser el pH mayor, se previene la desmineralización del diente (Poyato *et al*, 2001).

Existen agentes antimicrobianos como la clorhexidina que elimina de manera severa al *Streptococcus mutans* (Harris y García, 2005), sin embargo también se puede optar por otras formas de inhibición como la inhibición del *Streptococcus mutans* por medio de *Lactobacillus spp* (Caglar *et al*, 2007)

Inhibición de *Streptococcus mutans* por medio de *Lactobacillus spp*

Para el caso específico del *Streptococcus mutans*, existen estudios que concluyen que los microorganismos que tienen las propiedades básicas requeridas para inhibirlo son las bacterias ácido lácticas puesto que producen ácidos orgánicos y otros metabolitos como peróxido de hidrógeno, compuestos aromáticos, derivados deshidratados del glicerol o reuterina, enzimas bacteriolíticas, y bacteriocinas (Ishihara e Hikoro, 1985; Nikawa *et al*, 2004; Caglar *et al*, 2007 y Caglar *et al*, 2006).

Las bacterias ácido lácticas poseen la capacidad de inhibir al *Streptococcus mutans* debido a que cuentan con las siguientes características:

- No causan enfermedad por sí mismas.
- Mantienen estabilidad genética durante mucho tiempo.
- Poseen características fenotípicas que actúan sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans* (Hillman y Socransky, 2000).

Además los lactobacilos poseen un mayor potencial de colonización que el *Streptococcus mutans*: Un estudio realizado por Martínez y Rodríguez concluyó que por cada inoculación de *Streptococcus mutans* crece un promedio de 15 cepas (Martínez y Rodríguez, 2009), mientras que Cabezas Alarcón concluyó en su investigación que por cada inoculación de *Lactobacillus spp* crecen alrededor de 120 cepas (Cabezas, 2009).

En la tabla siguiente se muestran algunos artículos que concluyen que los lactobacilos son capaces de inhibir al *Streptococcus mutans*.

Tabla 4. Artículos que concluyen las propiedades inhibitorias de *Lactobacillus spp* sobre *Streptococcus mutans*

Autor/Año	Título	Grupo	Resultados
Ishihara e Hikoro, 1985	“Growth Inhibition of <i>Streptococcus mutans</i> by Cellular Extracts of Human Intestinal Lactica Acid Bacteria”	<i>Lactobacillus casei</i>	Los extractos de células de las bacterias ácido lácticas tienen efectos inhibitorios en el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i>
Nikawa <i>et al</i> , 2004	“ <i>Lactobacillus reuteri</i> in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci”	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> inhibió en un 90% al <i>Streptococcus mutans</i>
Caglar <i>et al</i> , 2007	“Effect of chewing gums containing xilitol or probiotic bacteria on salivary <i>mutans streptococci</i> and lactobacilli”	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Después de tres semanas de ingerir bacterias probióticas o xilitol en gomas de mascar, se pueden reducir los niveles de <i>Streptococcus mutans</i>
Caglar <i>et al</i> , 2006	“Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestión of the probiotic bacterium <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730 by straws or tablets”	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Hubo una significativa reducción de <i>Streptococcus mutans salivarius</i> después de tres semanas de ingerir las tabletas

1.3.3.4.1.1. Lactobacilos

Los lactobacilos son bacterias gram positivas, catalasa negativa y microaerofílicas. Sus cepas son en forma de bacilos cortos que se presentan en cadenas y tienen poca motilidad. Las colonias son pequeñas de aproximadamente 2 a 5 μm , también son convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos (Bergey *et al*, 2001).

La mayoría de cepas de lactobacilos son aerotolerantes, su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se sabe que un incremento en la concentración de CO_2 puede estimular el crecimiento.

La mayoría de los lactobacilos son mesófilos, crecen a una temperatura de 30°C a 40°C , aunque su rango oscila entre 5°C a 53°C (Marín *et al*, 1993).

La clasificación de los lactobacilos se encuentra contenida en la siguiente tabla (Bergey *et al*, 2001):

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Lactobacillus spp*

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Lactobacillus</i>
Grupo	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus casei</i>

Los lactobacilos requieren carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, por lo tanto el medio Rogosa es el más utilizado para la purificación de los mismos (Ishihara e Hikoro, 1985).

El pH óptimo para el crecimiento de los lactobacilos va de 5.5 a 6.2, su crecimiento se logra mejor en condiciones anaeróbicas y en presencia de CO₂, a una temperatura de 37°C durante 48 horas (Bergey *et al*, 2001).

Las pruebas bioquímicas usadas para su identificación son gram, catalasa, fermentación de manitol, rafinosa y arginina (Mac Faddin, 2003).

1.4. Microencapsulación

La microencapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar la interacción de los materiales encapsulados con factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad (Borgogna *et al*, 2010).

Una microcápsula se define como una membrana esférica, semipermeable, delgada y fuerte que rodea un núcleo sólido o líquido, la microcápsula tiene un diámetro que varía de pocos micrones a 1000 µm. El núcleo que compone la microcápsula es denominado fase interna o principio activo y a la membrana se le puede nombrar fase externa o matriz (Saez *et al*, 2007).

Los hidrocoloides han sido usados como matriz debido a su fácil manipulación y su facilidad para absorber agua. Los alginatos son hidrocoloides que poseen tanto las características anteriores como propiedades gelificantes y estabilizantes

El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes donde el ion calcio es el más utilizado en la industria alimentara. La gelificación se produce mediante la unión física de dos moléculas de alginato a través del ion calcio (Villena *et al*, 2009).

El alginato es descrito como un polisacárido lineal poliónico e hidrofílico que proviene de algas marinas. Entre las sales de alginato más usadas en la industria alimentaria se han encontrado las sales de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y su característica transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ion calcio (Funami *et al*, 2009).

Algunas de las aplicaciones de la microencapsulación dentro de la industria alimentaria son la adición de vitaminas, minerales, microorganismos, ácidos grasos, probióticos, proteínas, aminoácidos, fibras y enzimas (Villena *et al*, 2009).

1.5. Stevia rebaudiana

La *Stevia rebaudiana* es un pequeño arbusto nativo del norte de Paraguay y de las zonas cercanas a Brasil. Fue descubierto en 1887 por Anthony Bertony. Las hojas de dicha planta han sido utilizadas por la tribu de los Guarani para endulzar alimentos (Martínez, 2002).

El sabor dulce que contienen sus hojas se debe al contenido de glicósidos, de los cuales el esteviósido se halla en mayor proporción. El esteviósido es un glicósido pequeño cuya fórmula es $C_{18}H_{60}O_{18}$. Este esteviósido tiene un poder edulcorante 200 veces mayor que el del azúcar, mientras las hojas en su forma natural son de 10 a 15 veces más dulces que él. Además del esteviósido, la hoja contiene cuatro glicósidos dulces presentes en menor porcentaje; a estos glicósidos se les conoce como rebaudiósidos (Soto y Del Val, 2002).

Estos compuestos no son metabolizados por el organismo, por lo tanto la stevia no aporta calorías y es una alternativa saludable para sustituir la sacarosa en la dieta (Borda *et al*, 2009).

Además la investigación ha demostrado que estabiliza la presión arterial, no provoca cáncer y está aprobada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria como edulcorante natural (De Paula *et al*, 2003).

1.5.1. Actividad inhibitoria de la *stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*

Algunos estudios han demostrado que la *stevia* también posee un potencial anticariogénico y este la hace ideal como componente de enjuague bucal y pasta dental.

Vitery concluyó que el extracto de *stevia* disuelto en agua con una concentración mínima de 400 mg/ml produce un efecto inhibitorio para el *Streptococcus mutans*, después de 48 horas (Vitery *et al*, 2010).

1.6. El chicle tradicional

El chicle es un polímero sintético o natural masticable el cual sufre diversos cambios hasta obtener una estructura gomosa de sabor agradable. Fue descubierto en la época prehispánica por los mayas, quienes se dieron cuenta que la resina de árbol se podía mascar (Chanfón *et al*, 2005).

Años más tarde, el empresario Thomas Adams vio al general Antonio López de Santa Anna mascando la resina y únicamente añadiéndole colorante y saborizante comenzó a comercializarla. Para el año 1867, el mismo Thomas Adams instaló en los Estados Unidos la primera fábrica de chicles (Chanfón *et al*, 2005).

La industria del chicle creció durante las guerras mundiales debido a que este era considerado un calmante y por esa razón se les daba a los soldados.

Durante el gobierno de Lázaro Cárdenas se organizaron cooperativas que hasta la fecha existen en México (Chanfón *et al*, 2005).

Hoy en día la mayoría de los chicles tradicionales están elaborados por polímeros sintéticos altamente contaminantes que tardan de 5 a 30 años en desaparecer. Además los chicles y otros polímeros provienen del petróleo y este es un recurso no renovable que se estima que desaparecerá en aproximadamente 50 años (Meneses y Corrales, 2001).

1.6.1. Formulación del chicle tradicional

El chicle tradicional está hecho a partir de 5 ingredientes básicos: goma base, saborizantes, conservadores, colorantes y estabilizantes (Asociación Internacional de la Goma de mascar, 2007).

La composición porcentual aproximada de un chicle tradicional se muestra en la siguiente tabla (Jackson, 1996):

Tabla 6. Ingredientes básicos del chicle tradicional

Azúcares	77.9%
Goma base	18%
Saborizante	1.2%
Estabilizantes	2 %
Colorantes	0.8%
Conservadores	0.1%

- Goma base: La goma base se define como la sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético, coaguladas o concentradas, adicionadas de un ablandador o plastificante, antioxidante y en su caso de un controlador de polimerización considerado como el ingrediente principal de la mezcla. Es una combinación de polímeros de grado alimenticio, ceras y estabilizantes que dan al chicle la textura deseada. (Asociación Internacional de la Goma de mascar, 2007).

Las gomas base se dividen en naturales y sintéticas. Las naturales están hechas a base de resina de árboles como níspero, perillo y pino; mientras que las sintéticas están hechas a base de derivados de petróleo como el polivinilacetato. En la actualidad la mayoría de las gomas base son sintéticas y causan severos daños al medio ambiente (Edwards, 2000).

Los componentes principales de las gomas bases son sustancias sintéticas masticables o resina, plastificantes, emulsificantes o suavizantes, coadyuvantes insolubles en agua y antioxidantes (Cadbury-Adams, 2003).

En la siguiente tabla se muestra la composición porcentual aproximada de una goma base (YSA mexicana):

Tabla 7. Composición porcentual aproximada de una goma base

Sustancias sintéticas masticables o resina	40 – 50%
Emulsificante	15 – 30 %
Plastificante	5 – 10%
Coadyuvante	3 – 10%
Antioxidante	3 – 5%

- Saborizantes: Los saborizantes no solo dan sabor a la goma de mascar, sino que también sirven como estabilizantes y tienen efecto en la textura del chicle ya que funcionan también como plastificantes. Los saborizantes regularmente están compuestos de aceites y estos mismos resultan los mejores plastificantes dentro de la goma de mascar. El saborizante siempre se encuentra en menor porcentaje que el azúcar y que la goma base.
- Conservadores: Los conservadores usados en el chicle generalmente son los ácidos orgánicos. Además de ser conservadores, los ácidos orgánicos mejoran el sabor de la goma.
- Colorante: La adición de colorantes tiene un papel importante en la percepción del sabor y del olor. La mayoría de las gomas si se fabrican sin color tendrían un matiz amarillo o naranja. Para que un colorante pueda ser usado en confitería debe ser estable al calor, a la luz y a los azúcares reductores y debe ser soluble en agua.
- Estabilizantes: Los estabilizantes sirven para mantener la suavidad del chicle. Su función es mantener la humedad del mismo a pesar de que el medio

ambiente sea seco. Los estabilizantes más usados son la glicerina y el sorbitol. La composición de estabilizante en los chicles comunes es de 0.3 a 0.5% (Edwards, 2000).

1.6.2. Proceso de elaboración del chicle tradicional

El proceso de elaboración de un chicle tradicional es básicamente el siguiente:

1. La goma base es fundida a una temperatura próxima a los 115°C. hasta obtener un fluido con comportamiento viscoelástico, el cual se debe de mantener en su punto de ablandamiento o flexión.
2. La goma fundida es mezclada con los demás ingredientes. La temperatura debe mantenerse arriba de los 80°C, de lo contrario podría ocasionarse una degradación de sabor.
3. La mezcla es enfriada hasta llegar a una temperatura mínima de 4°C con el fin de que el chicle tradicional alcance la firmeza óptima.
4. La mezcla es llevada al extrusor y posteriormente es cortada en porciones individuales. Esta operación determina la textura y elasticidad del chicle.
5. Finalmente la goma es laminada, es decir, pasa a través de un par de rodillos que se encargan de dar la forma deseada al chicle tradicional (Cadbury- Adams, 2003).

1.7. El chicle biodegradable

Un chicle biodegradable y no contaminante, puede formarse a partir de la zeína del maíz. La zeína es la proteína más abundante en el maíz, pertenece al grupo de las prolaminas. Comprende alrededor del 50% de la proteína total de este (Shukla y Munir, 2000).

A mediados del siglo pasado, la zeína, combinada con plastificantes como glicoles y amidas empezó a usarse en la elaboración de polímeros como películas comestibles, películas fotográficas, microesferas (Shukla y Munir, 2001) o gomas de mascar (Mc Gowan y Padua, 2005) debido a su gran capacidad de gelación.

Cuando existe la acción de alguna enzima proteolítica con la zeína de maíz y en presencia de un plastificante, a una temperatura y pH adecuados, ocurre una reacción que permite obtener polímeros como el chicle (Shukla y Munir, 2001).

1.7.1. Zeína

La zeína es la principal proteína dentro de la composición del maíz. Se encuentra generalmente a una distancia de $1\mu\text{m}$ entre el endosperma y el citoplasma de grano de 5 a $35\mu\text{m}$ y se extrae usando alcohol etílico (Duvick, 1961).

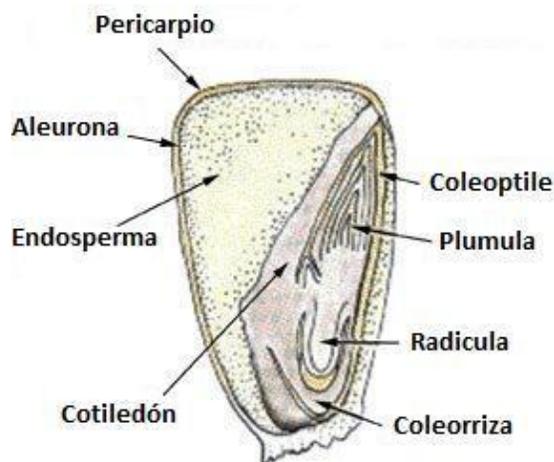


Figura 3. Partes de la semilla del maíz

La zeína es rica en ácido glutámico, leucina, prolina y alanina; pero es deficiente en dos aminoácidos principales que son la lisina y el triptófano (Shukla y Munir, 2000).

En la siguiente tabla se muestra la composición en aminoácidos de la proteína más abundante del maíz:

Tabla 8. Composición porcentual de aminoácidos de la zeína del maíz

Clase	Aminoácido	(Mosse y Laundri, 1980)	(Pomes, 1971)
No polares	Glicina	0	0.7
	Alanina	10.52	8.3
	Valina	3.98	3.1
	Leucina	21.1	19.3
	Isoleucina	5	6.2
	Fenilalanina	7.3	6.8
	Triptófano	0.16	---
	Prolina	10.53	9
-OH	Serina	7.05	8.7
	Tirosina	3.45	2.7
	Triptófano	5.25	5.1
-S	Metionina	2.41	2
	Cisteína	0.83	0.8
Básicos	Lisina	---	---
	Arginina	4.71	1.8
	Histidina	1.32	1.1
Ácidos	Ácido aspártico	4.61	---
	Ácido glutámico	26.9	21.4

Las características fisicoquímicas de la zeína son las siguientes (Lawton, 2002):

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de la zeína

Temperatura de desnaturalización	190° C
Punto isoeléctrico	6.2
Constante dieléctrica	5

Su alto contenido en algunos aminoácidos y su deficiencia en otros, provocan su insolubilidad en agua pero su solubilidad en alcohol (Lawton, 2002). Sin embargo, la solubilidad de la zeína puede verse modificada ante la presencia de enzimas (Shukla y Munir, 2001).

Otra característica de la zeína es su nivel de capacidad de gelación. La velocidad de gelación de la zeína depende de otras condiciones como la temperatura, pH y factores mecánicos que ayudan a la desnaturalización de la misma. La gelación puede ser un resultado de una desnaturalización de la zeína (Lawton, 2002)

1.7.2. Papaína

La papaína es una enzima similar a la pepsina humana; se extrae de la papaya y es una de las enzimas proteolíticas más importantes de origen vegetal por ser comercial y barata. Esta enzima se caracteriza por actuar en baja dosis y tener poca especificidad; hidroliza proteínas y péptidos actuando preferentemente sobre aminoácidos básicos (Badui, 2006).

La papaína es activada por cisteína, tiosulfato y glutatión, es inhibida por iones metálicos, oxidantes y ácido ascórbico (Robles, 2001). Esta enzima es capaz de agilizar cicatrizaciones de úlceras, mejora el ritmo cardiaco, digiere proteínas muertas y disminuye infecciones gastrointestinales y de las vías respiratorias (Udod *et al*, 1983). Otros estudios han demostrado que la papaína reduce el crecimiento del *Streptococcus mutans* (Castro, 2003).

1.7.2.1. Efectos antimicrobianos de la papaína

La papaína ha demostrado propiedades antimicrobianas sobre diferentes bacterias, ya sea gram positivas o gram negativas.

Doughari evaluó la capacidad inhibitoria de la papaína sobre bacterias como *Streptococcus pyogens*, *Bacillus cereus* y *Proteus mirabillis*, entre otras. En este estudio Doughari concluyó que efectivamente la papaína tiene un gran rango de efectos antibacteriales (Doughari, 2007).

A su vez, Castro evaluó la capacidad antibacteriana de la papaína sobre el *Streptococcus mutans*, concluyó que la enzima proteolítica es capaz de reducir mas no inhibir al microorganismo. La reducción del *Streptococcus mutans* se dio a partir de una concentración del 1% de papaína (Castro, 2001). Sin embargo, Ferreira asegura que con una concentración del 0.4% se logra la inhibición completa del *Streptococcus mutans* (Ferreira *et al*, 1999).

1.7.3. Formulación del chicle biodegradable

Los componentes principales del chicle biodegradable elaborado a base de proteína del maíz son los siguientes: zeína, papaína, un plastificante ya sea algún polialcohol como el propilenglicol, un glicol como la glicerina o el glicerol, o una grasa como el ácido oleico, algún potenciador de sabor, un aceite, algún ácido orgánico, colágeno hidrolizado, al menos un edulcorante, un saborizante y un colorante.

En la siguiente tabla se muestra la funcionalidad de cada uno de los ingredientes dentro de la formulación y elaboración del chicle biodegradable (Liu, 2005):

Tabla 10. Funcionalidad de cada ingrediente en la elaboración del chicle biodegradable

Zeína	Participa de manera directa en la reacción de polimerización
Plastificante	Optimiza la elasticidad Actúa por separado, es decir, no actúa con otro plastificante
Enzima proteolítica	Mejora la suavidad y la masticabilidad de la goma Incrementa la solubilidad de la zeína.
Potenciador de sabor	Abre los enlaces para que exista una mejor aceptación de edulcorantes y glucosa.
Aceite parcialmente hidrogenado	Disminuye la dureza Aumenta la adhesión Disminuye la flexibilidad
Colágeno hidrolizado	Disminuye la adhesión Aumenta la flexibilidad Disminuye el sabor amargo que dejan los plastificantes
Ácido orgánico	Actúa como conservador Disminuye la dureza Disminuye la adhesión Aumenta la flexibilidad
Edulcorante	Da estabilidad al chicle Aumenta el volumen
Saborizante	Sirve como estabilizante Da sabor al chicle
Colorante	Da color al chicle

1.7.4 Elaboración del chicle biodegradable

El chicle de zeína se elabora de una manera muy distinta a los chicles tradicionales. Se han propuesto distintas metodologías. El principal factor dentro de la elaboración del chicle biodegradable, consiste en la solubilización de la zeína antes de comenzar con el proceso. Mc Gowan propuso la siguiente metodología:

1. Homogenizar durante 2 minutos a 120 rpm la zeína, la enzima proteolítica y el plastificante junto con alcohol etílico.
2. Agregar el edulcorante, saborizante y colorante y volver a homogenizar a las mismas condiciones.
3. Calentar hasta 70°C durante 20 minutos para lograr la evaporación del alcohol.
4. Agregar el conservador y calentar a una temperatura de 80 ° C durante 5 minutos para inactivar la enzima proteolítica.
5. Enfriar a una temperatura de 4.5°C.
6. Amasar a temperatura ambiente (McGowan y Padua, 2005).

1.7.4.1. Puntos críticos presentes en la polimerización enzimática a partir de compuestos degradables como la zeína

Cuando existe una reacción de polimerización a partir de proteínas como la zeína de maíz, se encuentran presentes en el proceso los siguientes puntos críticos:

- **Gelatinización:** es una semicristalización que se da cuando ocurre un incremento de temperatura y la proteína se encuentra en presencia de un disolvente. El disolvente penetra la estructura granular de la proteína y hace que se incremente la viscosidad de la misma, rompiendo puentes de hidrógeno.
- **Retrogradación:** ocurre cuando existe un descenso de temperatura y corresponde al incremento espontáneo del estado del orden. Los puentes de

hidrógeno se reorganizan, existe una reorientación de cadenas moleculares. La solubilidad en el disolvente disminuye.

- Transición vítrea: es un cambio inducido por el calor. Corresponde al momento en el que el polisacárido pasa de sólido y frágil a quebradizo y flexible.
- Desestructuración: ocurre cuando hay un aumento final y drástico de temperatura y corresponde a una deformación completa del material (Meneses y Corrales, 2001).

1.7.5. Caracterización del chicle biodegradable

Para evaluar las propiedades del chicle biodegradable, es recomendable aplicarle al producto las siguientes pruebas: análisis de textura, evaluación de la actividad de agua y cálculo de la temperatura de transición vítrea.

1.7.5.1. Análisis del perfil de textura

La textura puede definirse como el conjunto de atributos mecánicos, geométricos y de superficie de un producto que son perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles, visuales y auditivos (Rosenthal, 2001).

El método más utilizado para evaluar los atributos mecánicos es el denominado análisis del perfil de textura. Este método trata de simular las condiciones con que se encuentra un alimento en la boca, por lo cual es un método de tipo imitativo (Pavia *et al*, 1999).

Los parámetros mecánicos que pueden determinarse mediante el “Análisis del perfil de textura” son los siguientes (Rosenthal, 2001):

Tabla 11. Definición de los parámetros mecánicos

Parámetro	Definición sensorial
Dureza	Fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares
Elasticidad	La extensión a la que un alimento comprimido retorna a su tamaño original cuando se retira la fuerza
Adhesividad	El trabajo requerido para retirar el alimento de la superficie
Cohesividad	La fuerza que los enlaces internos hacen sobre el alimento
Fragilidad	La fuerza a la que el material se fractura. Los alimentos frágiles nunca son adhesivos
Masticabilidad	La energía requerida para masticar un alimento sólido hasta que está listo para ser tragado
Gomosidad	La energía requerida para desintegrar un alimento semisólido

El análisis del perfil de textura (ATP) consiste en comprimir la muestra dos veces consecutivas y mediante un graficador obtener una gráfica de dos picos. El primer pico representa la dureza del alimento, la cual también puede ser medida en base al área bajo la primera curva que corresponde al trabajo de compresión; la relación entre la altura del primer y segundo pico denota la cohesividad. También pueden obtenerse los índices de elasticidad, gomosidad, adhesividad entre otros (Anzaldúa, 1994).

Con un texturómetro universal se puede obtener la curva típica fuerza-deformación:

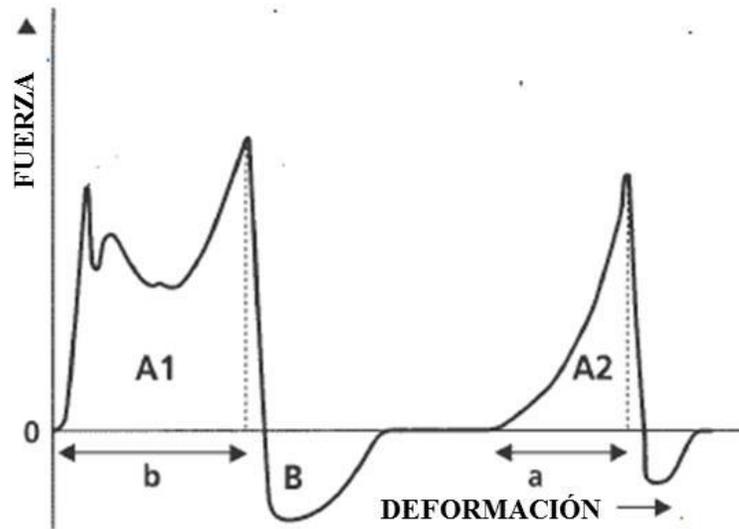


Figura 4. Curva típica de fuerza-deformación

Los parámetros mecánicos son significativos dentro de la caracterización de los alimentos, debido a que reflejan otras propiedades como durabilidad, uniformidad, tensión, fuerza y resistencia a la abrasión (Rosenthal, 2001).

1.7.5.2. Actividad de agua

La actividad de agua corresponde a la fracción del agua contenida en los alimentos, que es capaz de intervenir en los procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos de los mismos. Representa el grado de interacción del agua con el resto de los constituyentes o la porción que está disponible en un producto para sustentar las reacciones ya mencionadas (Badui, 2006).

Puede ser descrita en su forma más simple como la relación de la presión parcial de vapor de agua del alimento dividida entre la presión de vapor del agua pura, ambas medidas a la misma temperatura (Welti y Vergara, 1997).

La actividad de agua se relaciona de manera no lineal con el contenido de humedad mediante las curvas o isotermas de adsorción y desorción (Badui, 2006). Una isoterma de sorción es la curva que indica en el equilibrio y para una temperatura determinada, la cantidad de agua retenida por el alimento en función de la atmósfera que lo rodea; o si se requiere inversamente, la presión parcial de vapor ejercida por el agua del alimento en función del contenido de agua del mismo (Gómez, 1992).

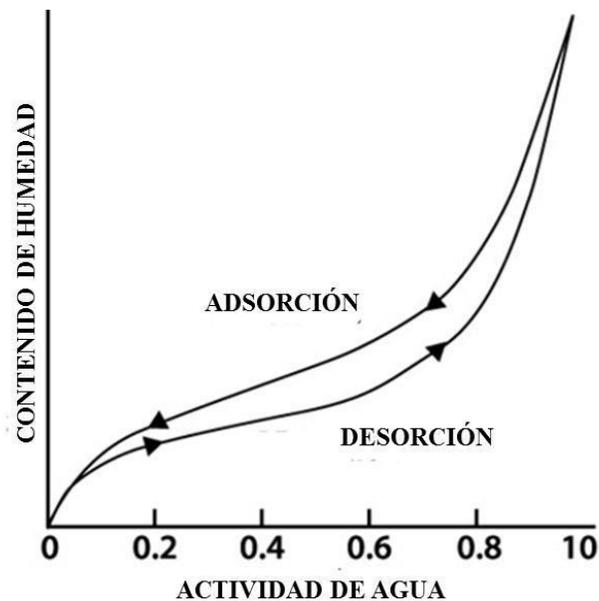


Figura 5. Curvas de sorción

Para su elaboración se requiere calcular el contenido de humedad y la actividad de agua del alimento. Para determinar la actividad de agua puede usarse el higrómetro electrónico que es un instrumento con un sensor que se basa en un electrolito generalmente de cloruro de litio que mide el cambio de la conductividad eléctrica producida por el cambio de humedad relativa de una cámara en donde se encuentra en la muestra (Gómez, 1992).

La medida del valor de actividad de agua, es comúnmente una predicción de la estabilidad física, química, fisicoquímica, microbiológica y por consiguiente una aproximación de la vida útil de los alimentos (Labuza, 1999).

El agua es un componente importante en los chicles ya que contribuye en gran manera a características texturales, de apariencia y de sabor. Asimismo el agua participa en el deterioro de los alimentos debido al papel que desempeña en reacciones químicas y enzimáticas, así como en el desarrollo microbiano (Welti y Vergara, 1997).

1.7.5.3. Temperatura de transición vítrea

El estado en el que algunos sistemas con bajo contenido de agua se encuentran, depende si la temperatura está por encima o por debajo de la temperatura de transición vítrea. Cuando la temperatura del chicle está debajo de la temperatura de transición vítrea este presentará un estado sólido, a su vez cuando la temperatura se encuentra por encima de la temperatura de transición vítrea, este se presentará en estado de tipo gomoso (Zaritzky, 1997).

El estudio de las transiciones en los polímeros es realizado a través de la calorimetría que significa la cantidad de energía intercambiada en forma de flujo entre dos sistemas en un periodo de tiempo.

El análisis calorimétrico diferencial (DSC) es una técnica que se utiliza para estudiar qué sucede a los polímeros cuando son calentados. Este análisis proporciona energía con una rapidez variable a la muestra y a la referencia para mantener sus temperaturas iguales, obteniendo así los diagramas de tiempo-temperatura denominados termogramas (Mathot, 1994). Por este método el área bajo la curva puede relacionarse con los cambios de entalpía que ocurran (Rodríguez, 1984).

Para que el alimento sea estable siempre debe de encontrarse almacenado por debajo de su temperatura de transición vítrea.

La determinación de la temperatura de transición vítrea ayuda a determinar las propiedades del producto y cambios que ocurren durante el proceso (Edwards, 2000).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

A partir de una fracción proteica del maíz y variando el plastificante y la concentración de la enzima proteolítica que provoca la polimerización, desarrollar la formulación de un chicle con centro blando, que tenga características biodegradables y además sea capaz de inhibir al *Streptococcus mutans* involucrado en la formación de la caries, mediante el empleo de *Lactobacillus spp.*

2.2 Objetivo particular 1

Evaluar diferentes formulaciones de polímeros base hechos a partir de una fracción proteica del maíz, variando el plastificante y la concentración de la enzima proteolítica.

2.3 Objetivo particular 2

Caracterizar el chicle mediante el perfil de textura, la densidad, la temperatura de transición vítrea y la actividad de agua.

2.4 Objetivo particular 3

Evaluar la capacidad de biodegradación del chicle mediante la acción metabólica de microorganismos presentes en agua de lago y tierra.

2.5 Objetivo particular 4

Evaluar “in vitro” la capacidad de inhibición del *Streptococcus mutans* por acción de diferentes cepas de *Lactobacillus spp* para posteriormente encapsularlo y agregarlo a un centro blando del chicle biodegradable

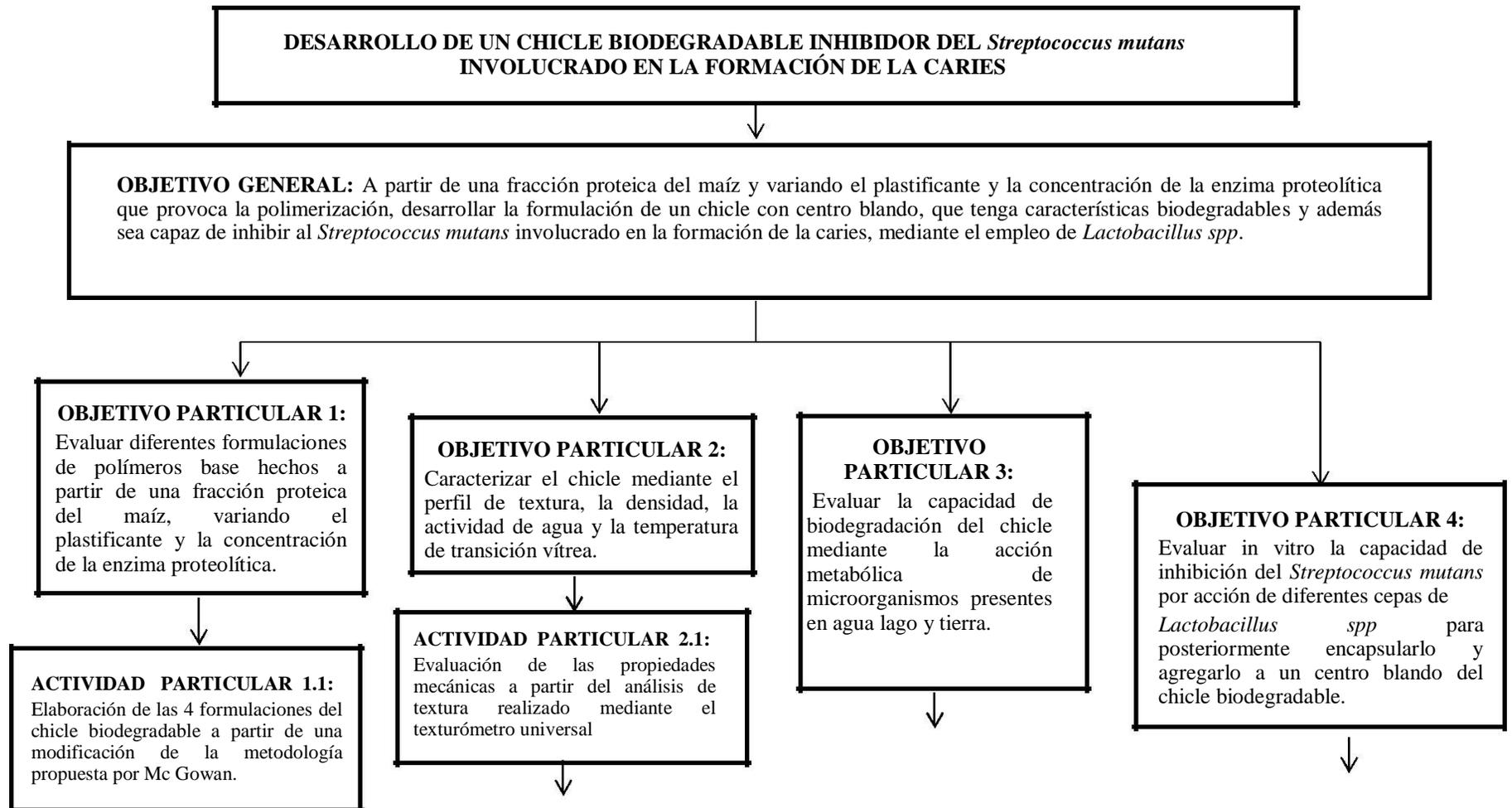
CAPÍTULO 3

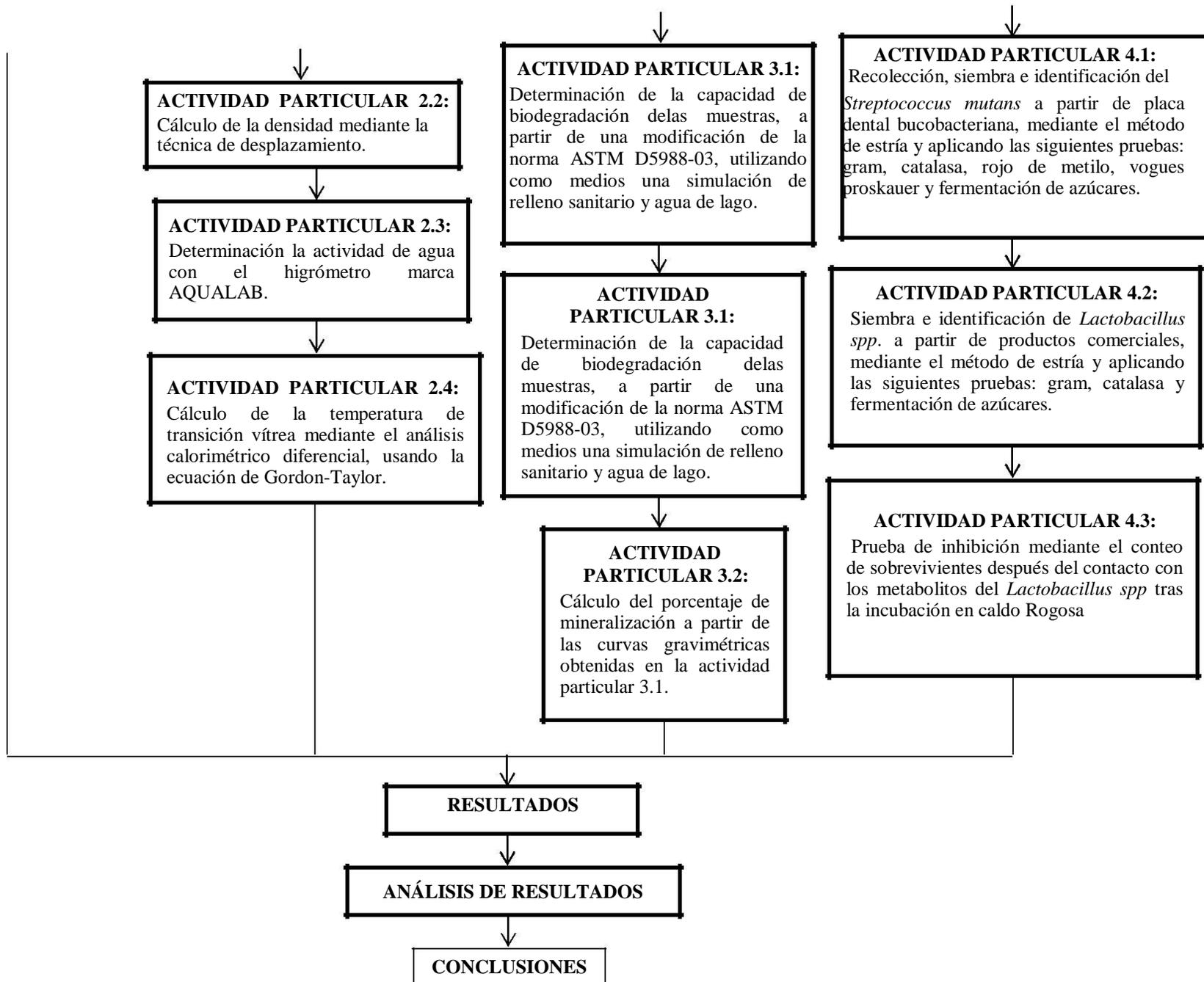
METODOLOGIA

EXPERIMENTAL

3. Metodología experimental

3.1 Cuadro metodológico





3.2 Desarrollo de la formulación del chicle

El chicle se elaboró a partir de la reacción de polimerización que realiza la fracción proteica del maíz con el plastificante cuando se activa la enzima proteolítica (papaína).

Diseño de experimentos 2^2

El diseño de experimentos que se utilizó para evaluar las diferentes formulaciones fue un diseño factorial de 2^2 :

Tabla 12. Diseño de experimentos factorial 2^2

Variable	Nivel 1	Nivel 2
Concentración de papaína	0.2%	0.4%
Plastificante	Propilenglicol	Glicerina

Formulación

Los porcentajes de cada grupo de componentes fueron definidos en base a las siguientes reivindicaciones propuestas por Liu (Liu, 2004):

- La composición de la fracción proteica debe de ser menor al 25 %.
- La composición del aceite parcialmente hidrogenado debe de ser menor al 12%.
- La composición del colágeno hidrolizado debe estar entre el 10% y 15%.
- La composición del ácido orgánico debe encontrarse entre el 1.9% y 2.1%.
- El potenciador de sabor debe estar entre el 3% y 7%.
- La concentración del colorante debe ser menor al 0.7%.

Metodología

La metodología utilizada para la elaboración del chicle biodegradable, fue una modificación de la metodología descrita por Mc Gowan (Mc Gowan y Padua, 2005).

A continuación se describe brevemente dicha modificación:

1. Homogenizar durante 2 minutos a 120 rpm la zeína, la enzima proteolítica y el plastificante junto con alcohol etílico.
2. Agregar el edulcorante, saborizante y colorante y volver a homogenizar a las mismas condiciones.
3. Calentar hasta 70°C durante 20 minutos para lograr la evaporación del alcohol.
4. Agregar el conservador y calentar a una temperatura de 80 ° C durante 5 minutos para inactivar la enzima proteolítica.
5. Enfriar a una temperatura de 4.5°C.
6. Amasar a temperatura ambiente

El chicle biodegradable se realizó en base al siguiente diagrama de proceso:

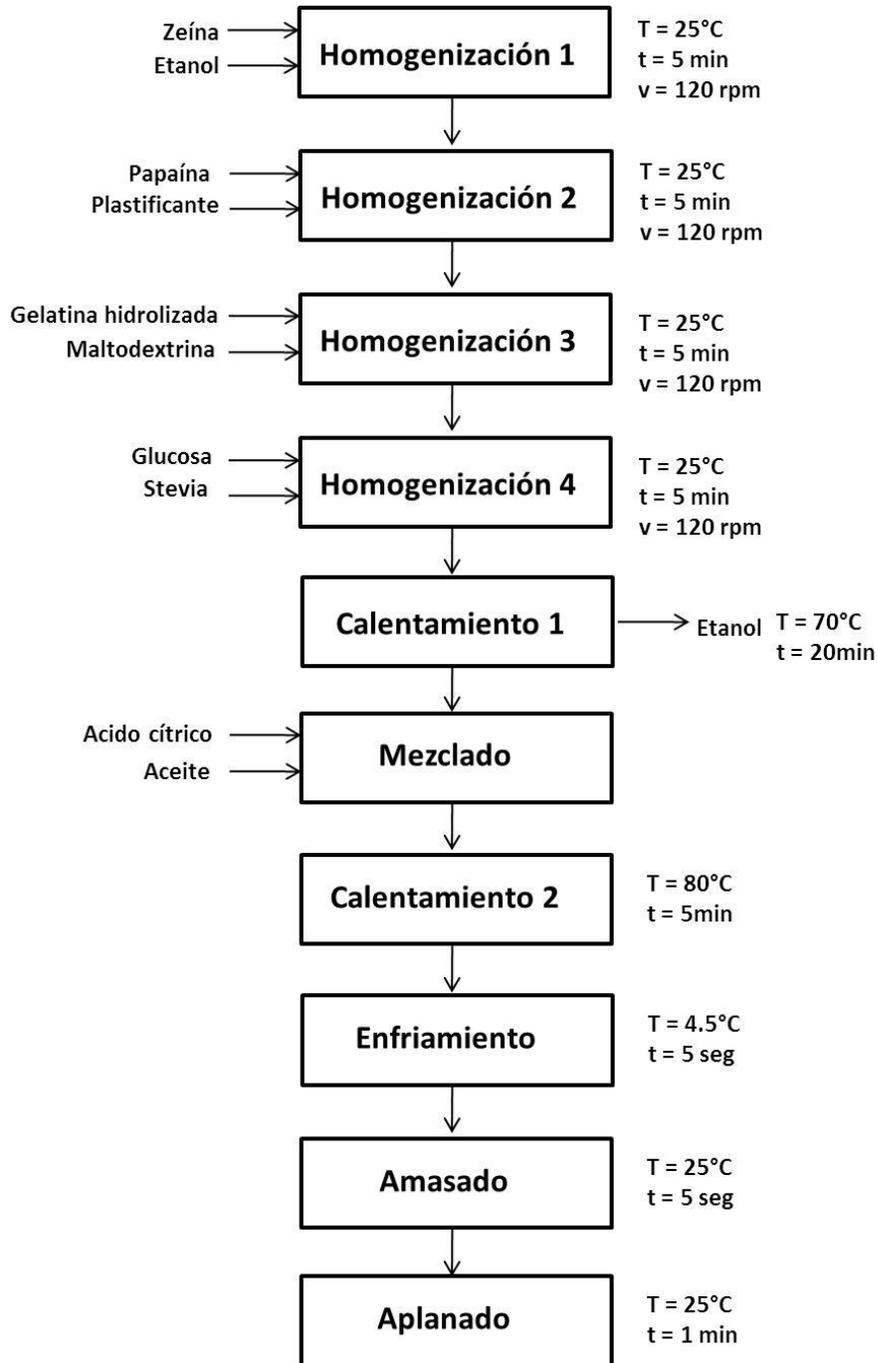


Figura 6. Diagrama de bloques del proceso

Descripción del diagrama de proceso

- Homogenización 1: Esta operación tiene como finalidad solubilizar la fracción proteica en etanol. La disolución zeína-etanol se realiza a una concentración del 13%. Posteriormente se homogeniza a temperatura ambiente durante 5 minutos y a una velocidad de 120 rpm.
- Homogenización 2: El propósito de esta operación es obtener una nueva solución añadiendo el plastificante y la enzima proteolítica a la solución anterior. La homogeneización 2 se realiza a las mismas condiciones que la homogeneización 1.
- Homogenización 3: En esta operación aumenta la viscosidad de la solución ya que se produce una reacción de gelatinización debido a la acción del potenciador de sabor. La homogenización 3 se realiza a temperatura ambiente durante 5 minutos y a una velocidad de 120 rpm.
- Homogenización 4: Esta operación tiene como principal objetivo integrar el edulcorante al resto de los componentes. La homogenización 4 se realiza a temperatura ambiente durante 5 minutos y a una velocidad de 120 rpm.
- Calentamiento 1: En esta operación se realiza la reacción de polimerización. La viscosidad se incrementa aún más, hasta dar lugar a un fluido viscoelástico que es denominado goma base. Es aquí en donde se llevan a cabo las reacciones proteína-plastificante. Esta operación también tiene como función evaporar el etanol usado para solubilizar la proteína.
- Mezclado 1: Esta operación tiene como finalidad añadir el aceite y el ácido cítrico al resto de la goma base. Se realiza a 70°C durante 2 minutos.
- Calentamiento 2: En esta operación se inactiva la enzima debido a que la temperatura aumenta hasta 80°C. El calentamiento se lleva a cabo durante un tiempo de 2 minutos.
- Enfriamiento: El polímero formado en la operación de calentamiento, se coloca en un recipiente metálico con agua a 4.5°C. En esta operación ocurre la retrogradación y se puede dar forma al polímero, además de que los ingredientes terminan de mezclarse y el etanol sobrante se separa de la goma.

- Amasado: El polímero se vuelve manejable y es en esta operación cuando se puede dar la forma deseada o incluso marcar el espacio en donde el centro líquido estará colocado posteriormente.
- Aplanado: En esta operación se da la forma deseada al chicle. Esto se pasando un rodillo encima del chicle y se realiza hasta obtener una lámina del grosor deseado.

3.3 Caracterización del chicle

3.3.1 Análisis de textura

Las propiedades mecánicas se evaluaron mediante un análisis del perfil de textura mediante el texturómetro universal. Los parámetros mecánicos que se obtuvieron fueron dureza y módulo de elasticidad. La prueba se realizó por triplicado.



Figura 7. Texturómetro universal

Metodología

1. Colocar circunferencias de muestra encima de pesafiltros y sujetarlos con cinta adhesiva.
2. Realizar el análisis de Perfil de Textura “ATP” con un analizador de textura universal usando la esfera de 1/4 y obtener los datos en una computadora mediante el programa provisto por el fabricante (Santini *et al*, 2007).

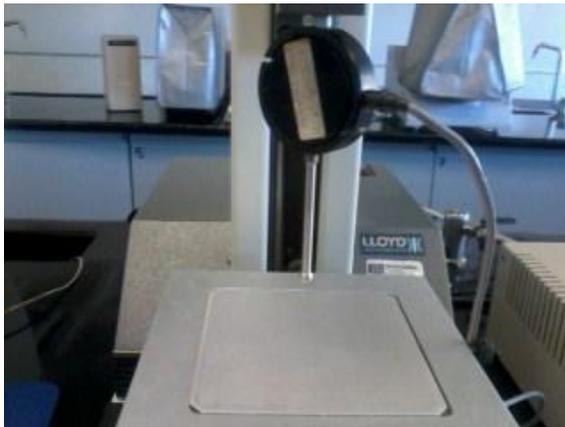


Figura 8. Geometría esfera de 1/4

3. Obtener los parámetros mecánicos de la muestra a partir de la curva de Análisis de Perfil de textura.

3.3.2 Cálculo de densidad

La densidad se calculó mediante la técnica de desplazamiento (Meneses y Corrales, 2001). La prueba se realizó por triplicado.

Metodología

1. Colocar 50 ml de agua en una probeta.
2. Pesar 10 gramos de muestra de goma base.
3. Colocar la muestra en la probeta.

4. Determinar el volumen de líquido desplazado por cada muestra.
5. Calcular el valor de la densidad mediante la siguiente ecuación:

—

En donde:

Densidad (g/ml)

Masa (g)

Volumen (ml)

3.3.3 Determinación de la actividad de agua

La actividad de agua se determinó con el higrómetro marca AQUALAB (Madeka y Kokini, 1995). La prueba se realizó por triplicado.



Figura 9. Higrómetro marca AQUALAB

Metodología

1. Colocar aproximadamente 0.3 gramos de muestra en la celda del higrómetro.
2. Colocar la celda dentro del higrómetro, en el lugar correspondiente.
3. Cerrar la puerta del higrómetro y echar a andar la prueba.
4. Esperar a que la prueba termine y el higrómetro arroje el dato de temperatura y actividad de agua.

3.3.4 Cálculo de la temperatura de transición vítrea

Se realizó el Análisis Calorimétrico Diferencial mediante un calorímetro diferencial acoplado a un termoanalizador a un calentamiento desde 20°C hasta 200°C (Madeka y Kokini, 1995). A partir de los termogramas obtenidos se obtuvo la temperatura de transición vítrea de cada uno de los ingredientes y posteriormente con la ecuación de Gordón- Taylor se calculó la temperatura de transición vítrea del chicle biodegradable (Celeghin y Rubiolo, 2002).

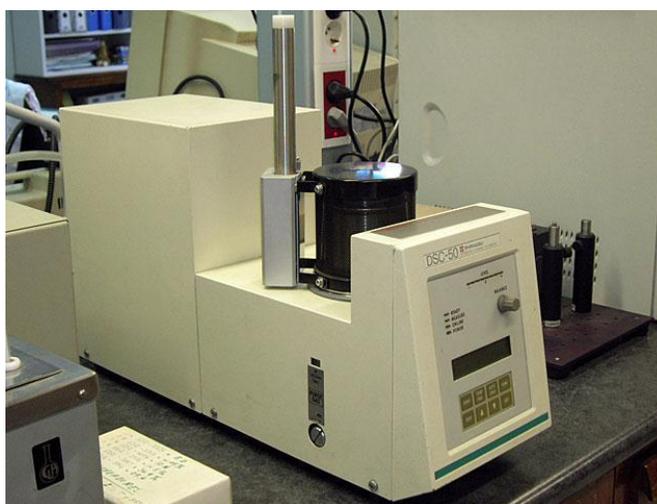


Figura 10. Calorímetro diferencial DSC-50

Metodología

1. Colocar aproximadamente 3 mg de muestra en la celda del calorímetro diferencial.
2. Cerrar la puerta de la celda y apretar el botón de inicio.
3. Esperar a que termine la prueba.
4. Obtener el termograma a partir del programa provisto por el fabricante.
5. Realizar los pasos 1, 2 y 3 para cada uno de los ingredientes que componen al chicle biodegradable.
6. A partir de los termogramas obtener la temperatura de transición vítrea de cada componente.

7. Calcular la temperatura de transición vítrea del chicle biodegradable a partir de la ecuación de Gordon-Taylor:

En donde:

Temperatura de transición vítrea

Peso en fracción de los componentes

Temperatura de transición vítrea de los componentes

3.4 Evaluación de la capacidad de biodegradación del chicle

Para determinar la capacidad de biodegradación del chicle en agua, se utilizó una modificación de la norma ASTM D5988-03 para el caso de agua dulce y el procedimiento planteado por Chiellini para el caso de una muestra introducida en un relleno sanitario (Chiellini *et al*, 2006). La prueba se realizó por triplicado.

Metodología

1. Colocar en el recipiente cerrado 300 ml del medio correspondiente: agua de lago o 300 g de relleno sanitario simulado. La formulación para el relleno sanitario simulado es la siguiente: 50 g de perlita, 150 ml de agua destilada, 500 g de tierra y 100 ml de fertilizante comercial.
2. Pesar 2 g de chicle biodegradable y colocarlo en el recipiente correspondiente.
3. Preparar en otro recipiente más pequeño una solución de NaOH 1M que actúa como trampa de CO₂.
4. Colocar en el recipiente grande la trampa de CO₂ contenida en el recipiente pequeño, tal y como se muestra en las siguientes figuras:



Figura 11. Montaje del relleno sanitario y la trampa de CO₂



Figura 12. Montaje del agua de lago y la trampa de CO₂

5. Mantener los recipientes en la obscuridad en un periodo de 80 días.
6. Medir la cantidad de CO₂ producido por medio de titulación manual a partir de la solución de NaOH 1M, utilizando HCl 1M y fenolftaleína como indicador.
7. Pesar cada muestra cada 20 días durante 80 días para obtener la pérdida de peso de cada chicle.
8. Calcular el porcentaje de mineralización a partir de la diferencia de la titulación de la muestra con la titulación del recipiente de control, divididos entre el dato teórico de la cantidad de CO₂ desprendido por el polímero.

9. Llevar una muestra de chicle tradicional de una marca comercial como control de la prueba.

3.5 Estudio bacteriológico del *Streptococcus mutans*

El estudio bacteriológico del *Streptococcus mutans* consistió en las siguientes etapas: recolección de muestra de placa dental bucobacteriana, siembra bacteriana de la muestra recolectada, aislamiento e identificación de las colonias de *Streptococcus mutans*.

3.5.1.1 Recolección de muestra de placa dental bucobacteriana

La recolección de muestra de placa dental bucobacteriana se realizó en base a una modificación de la técnica descrita por Loesche (Loesche, 1986).

Metodología

Se obtuvieron 15 muestras de placa bucobacteriana a partir de los molares. Se frotaron los molares y las encías de cada sujeto con un hispo estéril humedecido con sacarosa al 5%. La muestra se colocó en un tubo de ensayo que contenía como medio de transporte solución con sacarosa al 5% y se transportó después al laboratorio para ser procesada en menos de 2 horas.

3.5.1.2 Siembra bacteriana de la placa dental bucobacteriana recolectada

El cultivo se realizó mediante el método de estría en los siguientes medios: Mitis Salivarius para su identificación y Triplicasa soya con sacarosa y extracto de levadura para su purificación. Ambos medios se utilizaron con un pH de 7.2.

Las formulaciones de los medios utilizados se muestran a continuación:

Tabla 13. Formulación del medio Mitis salivarius

Digerido pancreático de caseína	6 g
Peptona proteosa No.3	9 g
Peptona proteosa	5 g
Dextrosa	1 g
Sacarosa	50 g
Cristal violeta	0.9 mg
Agar	15 g

Tabla 14. Formulación del medio Trypticase soya con sacarosa y extracto de levadura

Cloruro de Sodio	5 g
Digerido pancreático de caseína	15 g
Digerido pancreático de soya	5 g
Sacarosa	3 g
Extracto de Levadura	3 g
Agar	15 g

Metodología

Se realizó la inoculación primaria con el hisopo que contenía la muestra, posteriormente se utilizó un asa bacteriológica para dispersar el material entre los 4 cuadrantes de la caja, girando esta misma en un ángulo de 90° en cada dispersión.

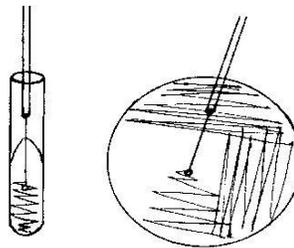


Figura 13. Diagrama de inoculación bacteriana

El asa se esterilizó entre cada estriado. Las cajas se llevaron a una temperatura de 37°C en medio anaerobio en presencia de CO₂ y se dejaron cultivadas por 24 horas (Konemann, 1999).

Finalmente se seleccionaron las colonias de acuerdo a su color, tamaño y forma para posteriormente aislarlas en el medio Mitis Salivarius para su identificación y Tripticasa soya con sacarosa y extracto de levadura para su aislamiento.

3.5.1.3 Identificación del *Streptococcus mutans* mediante las pruebas bioquímicas correspondientes

Para la identificación del *Streptococcus mutans* se utilizó la siguiente batería de pruebas: Gram, prueba de la catalasa, prueba del rojo de metilo y Vogues Proskauer; además de las pruebas de fermentación de los azúcares rafinosa, manitol, sorbitol, y arginina. (Sánchez y Acosta, 2004). Las pruebas se realizaron por triplicado.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las pruebas antes mencionadas, para que un cepa sea identificada como *Streptococcus mutans* (Konemann, 1999).

Tabla 15. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Streptococcus mutans*

Gram	+
Catalasa	-
Rojo de metilo	-
Vogues Proskauer	+
Manitol	+
Sorbitol	+
Rafinosa	+
Arabinosa	+

En la siguiente tabla se muestran los fundamentos de cada una de las pruebas bioquímicas utilizadas durante la experimentación (Forbes *et al*, 2007):

Tabla 16. Fundamentos de las pruebas bioquímicas utilizadas

Gram	La tinción de gram es una prueba de identificación primaria. Además de revelar los tipos y las cantidades relativas de los microorganismos y células huésped presentes, sirve para controlar la capacidad de las técnicas anaerobias.
Catalasa	La enzima cataliza la liberación del peróxido de hidrógeno ($H_2O_2 + catalasa = O_2$). Su positividad se determina mediante la producción de burbujas. Dicha efervescencia determina la presencia de enzima catalasa en el cultivo bacteriano.
Rojo de metilo y Vogues Proskauer	Estas dos pruebas se utilizan para determinar la capacidad de un microorganismo de generar y mantener los productos finales ácidos por fermentación de la glucosa, para superar la capacidad amortiguadora del sistema y para determinar la capacidad de algunos microorganismos para elaborar productos finales neutros a partir de la fermentación de la glucosa.
Fermentación de azúcares	La fermentación de azúcares consiste básicamente en el descenso del pH del medio, después de haber estado en contacto con una bacteria que tiene la capacidad de fermentar el azúcar en cuestión.

Metodología

Gram

1. Colocar con el asa una gota de alguna solución estéril en un portaobjetos.
2. Dispersar la colonia sospechosa en la gota antes colocada.
3. Esperar a que seque y fijara al calor.
4. Dejar enfriar.
5. Colocar cristal violeta, esperar un minuto y decantar.
6. Colocar lugol, esperar un minuto y enjuagar.

7. Colocar alcohol cetona, esperar tres segundos y enjuagar.
8. Colocar safranina, esperar un minuto y enjuagar.
9. Dejar secar y enfocar en el microscopio en el lente de 100x, usando aceite para inmersión para clarificar la observación.

Catalasa

1. Colocar una gota de H₂O₂ en un portaobjetos.
2. Con ayuda de un palillo de madera estéril coger una colonia sospechosa y ponerla en contacto con el H₂O₂.
3. Una reacción positiva ante la prueba de la catalasa será la presencia de burbujas al momento de que la bacteria hace contacto con el reactivo.

Rojo de metilo y Vogues Proskauer

1. Sembrar la cepa sospechosa en caldo RM/VP y dejar incubar 48 horas a 37°C.
2. Dividir el caldo en 2 tubos de ensayo estériles.

Prueba de rojo de metilo

3. En el primer tubo agregar tres gotas de rojo de metilo, un resultado positivo se verá cuando un color rojo intenso permanezca.

Prueba de Vogues Proskauer

4. En el segundo tubo agregar seis gotas de α -naftol y posteriormente dos gotas de hidróxido de potasio, un resultado positivo se verá cuando un color rojo se desarrolle después de 15 minutos.

Fermentación de azúcares

A cada cepa sospechosa se le realizó pruebas de fermentación de los azúcares refinosa, manitol, sorbitol, y arginina. Se prepararon caldos de rojo de metilo base con 0.5% del azúcar correspondiente, posteriormente se inocularon y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Un resultado positivo se observó si el caldo antes mencionado cambió a amarillo.

3.5.2 Estudio bacteriológico de *Lactobacillus spp*

El estudio bacteriológico del *Lactobacillus spp* consistió con las siguientes etapas: siembra bacteriana de lactobacilos a partir de productos comerciales e identificación de lactobacilos mediante las pruebas bioquímicas correspondientes.

3.5.2.1 Siembra bacteriana de lactobacilos

El cultivo se realizó mediante el método de estría en medio Rogosa a un pH de 6.9. La formulación del medio Rogosa utilizada se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 17. Composición del medio Rogosa

Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Ácido ascórbico	0.5 g
Peptona de soya	5 g
Polipectona	5 g
Acetato de sodio trihidratado	3 g
Dextrosa	5 g
Agar	15 g

Metodología

Se hizo una inoculación primaria a partir de 3 diferentes productos comerciales liofilizados, además de *Lactobacillus reuteri A* y *B* de una casa comercial. Posteriormente se utilizó un asa bacteriológica para dispersar el material entre los 4 cuadrantes de la caja, girando esta misma en un ángulo de 90° en cada dispersión. El asa se esterilizó entre cada estriado. Las cajas se llevaron a una temperatura de 37°C en medio anaerobio en presencia de CO₂ y se incubaron por 48 horas. (Konemann, 1999).

3.5.2.2 Identificación de lactobacilos mediante las pruebas bioquímicas

Las colonias separadas se sometieron a diferentes pruebas de identificación bioquímica. Las pruebas utilizadas fueron gram, prueba de catalasa y fermentación de azúcares manitol, rafinosa, arabinosa. Los fundamentos de estas pruebas bioquímicas se encuentran en la tabla 16. Cada una de las pruebas se realizó por triplicado

Tabla 18. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Lactobacillus spp.*

Prueba	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Gram	+	+
Catalasa	-	-
Manitol	-	-
Rafinosa	-	-
Arabinosa	-	-

3.5.3 Prueba de inhibición

La prueba de inhibición se evaluó “in vitro” mediante el conteo de sobrevivientes después del contacto con los metabolitos del *Lactobacillus spp* tras la incubación en caldo Rogosa (León y Totosaus, 2006). La prueba se realizó por triplicado.

Metodología

1. Sembrar el *Streptococcus mutans* en caldo Cerebro Corazón con extracto de levadura e incubarlo en medio anaerobio con presencia de CO₂ durante 48 horas a 37°C.
2. Por otra parte sembrar cada lactobacilo aislado e identificado en caldo Rogosa e incubarlo por 48 horas a 37°C en anaerobiosis y presencia de CO₂.
3. Después de 48 horas colocar en un tubo eppendorf 1 ml de caldo con *Streptococcus mutans* y centrifugarlo a 500 rpm durante 5 minutos.

4. Eliminar el sobrenadante y conservar solamente el sedimento de *Streptococcus mutans* en 1 ml de Solución Salina Fisiológica al 0.85%.
5. Tomar 0.5 ml del *Streptococcus mutans* estandarizado, colocarlo en un tubo con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica al 0.85% y agitar en el Vortex. Esta será la “solución SM” (Solución de *Streptococcus mutans*).
6. Centrifugar el cultivo de cada lactobacilo en un tubo eppendorf estéril durante 5 minutos y a 5000 rpm.
7. Tomar 4.5 ml del sobrante de lactobacilo y colocarlo en un tubo de ensayo estéril. (Solución de sobrante de *Lactobacillus spp*)
8. Adicionar 0.5 ml de la “solución SM” preparada en el punto 5 y mezclarla con la solución preparada en el punto anterior. Esta será la “solución L+S” (Solución de sobrante de *Lactobacillus spp* + *Streptococcus mutans*).
9. Incubar las soluciones “SM” y “L+S” durante el tiempo correspondiente (4, 8 y 24 horas).
10. Después de la incubación hacer las siguientes diluciones a partir de ambas soluciones: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} y 10^{-6} colocando 0.5 ml de la solución-dilución anterior más 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica al 0.85%.
11. Tomar 20 μ l de cada dilución y sembrarla en agar Cerebro corazón con extracto de levadura.
12. Incubar durante 48 horas a 37°C en medio anaerobio con presencia de CO₂ y realizar un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).
13. Utilizar como control una siembra de *Streptococcus mutans* sin metabolitos de *Lactobacillus spp*.

3.5.4 Microencapsulación

Una vez evaluada la capacidad de inhibición del *Lactobacillus spp* frente al *Streptococcus mutans* se procedió a encapsular los microorganismos. El método de microencapsulación fue la gelificación interna la cual se basa en la liberación del ion calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio (Villena *et al*, 2009).

Metodología

1. Sembrar el lactobacilo en caldo Rogosa e incubarlo por 24 horas a 37°C en anaerobiosis y presencia de CO₂.
2. Centrifugar el lactobacilo durante 5 minutos y a 5000 rpm.
3. Colocar el sobrenadante en un matraz Erlenmyer.
4. Preparar una solución de alginato de sodio al 3%.
5. Mezclar la solución de alginato de sodio con el sobrenadante de lactobacilo.
6. Extruir la solución para obtener las perlas de 1mm de diámetro.
7. Colocar las perlas en una solución de cloruro de calcio 1M.

3.5.5 Elaboración del centro líquido del chicle biodegradable

Una vez microencapsulados los lactobacilos, estos se agregaron a un centro blando que a su vez se agregarán al chicle biodegradable. La elaboración del centro blando se encuentra descrita a continuación.

Formulación

El centro líquido del chicle biodegradable se realizó en base a la siguiente formulación (Glass y Puglia, 1979):

Tabla 19. Formulación del centro líquido del chicle

Glicerina	73.6%
Agua	25%
Edulcorante	0.5%
Carboximetilcelulosa	0.5%
Saborizante	0.2%
Colorante	0.2%

Metodología

La metodología para elaborar el centro líquido del chicle biodegradable se realizó con base en una modificación de la metodología propuesta por Glass y Puglia (Glass y Puglia, 1979):

1. Homogenizar la glicerina con la carboximetilcelulosa a temperatura ambiente durante 20 minutos y a una velocidad de 120 rpm.
2. Añadir el edulcorante y calentar a una temperatura de 50°C durante 1 minuto.
3. Enfriar la solución hasta llegar temperatura ambiente.
4. Mezclar el saborizante y colorante con el resto de la solución durante 5 minutos.

El diagrama de proceso para la elaboración del centro líquido se muestra a continuación:

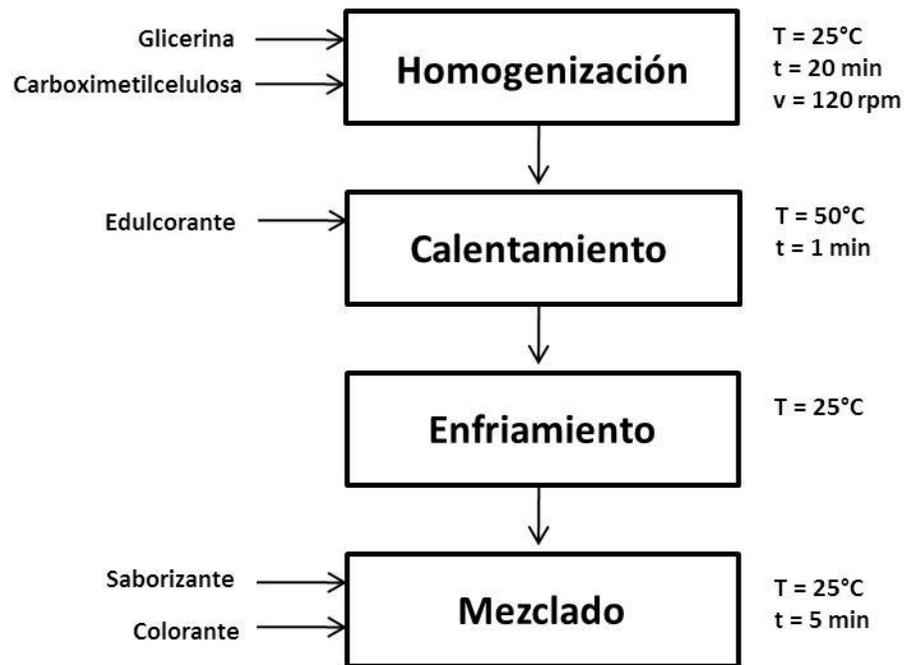


Figura 14. Diagrama de bloques para el proceso del centro líquido

Descripción del diagrama de proceso

- Homogenización: El propósito de esta operación es integrar la goma y el plastificante. La operación se realiza a temperatura ambiente, a una velocidad de 120 rpm y durante 20 minutos.
- Calentamiento: Esta operación tiene como función solubilizar completamente la goma en el plastificante. La temperatura no debe exceder los 50°C, si esto sucede el polisacárido se desnaturaliza y por tanto pierde sus propiedades funcionales; por esta razón la exposición a dicha temperatura no debe exceder a 1 minuto. Esta condición convierte a esta operación en un punto crítico de control.
- Enfriamiento: Una vez obtenida la dispersión, debe haber un enfriamiento hasta llegar a temperatura ambiente. En esta operación la dispersión aumenta su viscosidad debido al cambio de temperatura.
- Mezclado: El propósito de esta operación es incorporar el saborizante y el colorante a la dispersión. El mezclado se realiza en un tiempo de 5 minutos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y

ANÁLISIS DE

RESULTADOS

4. Resultados y análisis de resultados

4.1 Desarrollo de la formulación del chicle

Se desarrollaron diferentes formulaciones de chicle biodegradable. Esto se llevó a cabo variando los plastificantes (propilenglicol y glicerina) y la concentración de la papaína.

Para la elaboración de las diferentes formulaciones se utilizó el diseño de experimentos factorial 2^2 . De acuerdo a este diseño de experimentos se obtuvieron las 4 formulaciones que a continuación se mencionan:

Tabla 20. Formulaciones del chicle de acuerdo al diseño de experimentos

Formulación	Concentración de papaína	Plastificante
A	0.2%	Propilenglicol
B	0.2%	Glicerina
C	0.4%	Propilenglicol
D	0.4%	Glicerina

Formulación

Los ingredientes utilizados finalmente dentro de los grupos de componentes propuestos por Liu fueron los siguientes:

- Zeína de maíz como fracción proteica del maíz (Ficha técnica anexo 1)
- *Stevia* como edulcorante
- Rojo 5 como colorante
- Esencia de fresa como saborizante
- Maltodextrina como potenciador de sabor

La composición de la *stevia* fue del 0.5% debido a que se tomó en cuenta que el esteviósido obtenido de manera natural endulza 100 veces más que la sacarosa (Soto y Del Val, 2002).

La fracción proteica fue el ingrediente dentro de la formulación que se vio afectado ante las variaciones de concentración de la papaína. El resto de los ingredientes permanecieron constantes en cada una de las 4 formulaciones. La formulación final para cada uno de los diferentes prototipos, quedó de la siguiente manera:

Tabla 21. Formulación final del chicle biodegradable

Ingrediente	Porcentaje para cada formulación			
	A	B	C	D
Fracción proteica del maíz Glucosa	26.5 %	26.5 %	26.7%	26.7%
Plastificante 1	20 %	----	20 %	----
Plastificante 2	----	20%	----	20%
Colágeno hidrolizado	15 %	15 %	15 %	15 %
Aceite parcialmente hidrogenado	5%	5%	5%	5%
Potenciador de sabor	5%	5%	5%	5%
Ácido orgánico	2%	2%	2%	2%
Edulcorante (<i>stevia</i>)	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Colorante	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
Saborizante	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
Enzima proteolítica (papaína)	0.2%	0.2%	0.4%	0.4%

Las formulaciones A y C fueron elaboradas con el plastificante 1. Las formulaciones B y D se hicieron con el plastificante 2.

La reacción más importante que ocurre en el proceso de elaboración del chicle biodegradable es la de polimerización. Esta reacción es activada por la papaína y ocurre entre la proteína y el plastificante. Durante la reacción de polimerización ocurre lo siguiente:

- ❖ Primero se rompen los enlaces peptídicos que unen la cisteína contenida en la zeína para que la papaína se una al aminoácido mediante puentes disulfuro. Esto debido a que la papaína es activada por la cisteína (Robles, 2001).
- ❖ Posteriormente, cuando la temperatura aumenta hasta los 70°C, se comienza a notar visual y texturalmente la reacción de polimerización. Esto es por que dicha reacción consiste básicamente en la desnaturalización de la proteína y bibliográficamente se sabe que las desnaturalizaciones de las proteínas se dan a altas temperaturas (Badui, 2006). Sin embargo, debido a que el proceso no alcanza la temperatura de desnaturalización de la zeína que es de 190°C (Lawton, 2002) el plastificante interviene en la reacción, cambiando la polaridad del medio e introduciendo fuerzas de Van der Waals.

Esta reacción es el fundamento para que los primeros ingredientes en ser añadidos sean la papaína, la zeína y el plastificante (propilenglicol o glicerina).

Por otro lado, los puntos críticos más importantes durante el proceso ocurren en el calentamiento 1 y el enfriamiento debido a lo siguiente:

- ❖ La temperatura del calentamiento 1 debe ser mayor a 70°C, pero menor a 80°C. Si la temperatura no alcanza los 70°C durante el calentamiento 1 no se dará la desnaturalización completa de la proteína, y si la temperatura durante el calentamiento sobrepasa los 80°C la enzima proteolítica se inactivará.
- ❖ A su vez, si la temperatura durante el enfriamiento no llega a los 4.5 °C no se dará la reorganización de los puentes de hidrógeno ni la reorientación de las cadenas moleculares (Meneses y Corrales, 2001) y a su vez no habrá retrogradación del polímero y por lo tanto los ingredientes no se mezclarán completamente.

3.1 Caracterización del chicle

3.1.1 Análisis de textura

A continuación se muestran los valores promedio de dureza y elasticidad obtenidos mediante el texturómetro universal para cada una de las formulaciones del chicle biodegradable.

Tabla 22. Resultados obtenidos en el texturómetro para los parámetros de dureza y elasticidad

Formulación	Dureza (kgf)	Elasticidad (kg/mm)
A	2.57	0.555
B	2.207	0.3008
C	1.284	0.2185
D	1.246	0.1578
Comercial	1.646	0.5311

La prueba se realizó por triplicado, los valores que se muestran en la tabla son el promedio de 3 repeticiones.

Se realizó una prueba *t* de student para cada una de cada una de las propiedades mecánicas obtenidas.

Tabla 23. Prueba t de student para el parámetro de dureza

	A	B	C	D	Chicle comercial
Media	2.57	2.207	1.284	1.246	1.646
Varianza	1.008	0.234	0.195	0.059	0.045
P (t) dos colas	2.215	2.596	1.783	3.028	---

En donde:

H_0 : No existen diferencias significativas

H_1 : Existen diferencias significativas

De acuerdo a la tabla t de student, se puede concluir que para la formulación C no existen diferencias significativas debido a que $P (T < t)$ y por lo tanto H_0 se acepta en esta formulación.

Para el caso de las formulaciones A, B y D existen diferencias significativas debido a que $P (T > t)$ y por lo tanto H_0 se rechaza. A continuación se muestran los resultados de la prueba t de student para el parámetro de elasticidad.

Tabla 24. Prueba t de student para el parámetro de elasticidad

	A	B	C	D	Chicle comercial
Media	0.055	0.3008	0.2185	0.1578	0.5211
Varianza	0.194	0.012	0.012	0.003	0.016
P (t) dos colas	0.129	3.333	4.534	6.592	---

En donde:

H_0 : No existen diferencias significativas

H_1 : Existen diferencias significativas

En esta prueba la elasticidad presenta diferencias significativas para las formulaciones B, C y D y por lo tanto se rechaza H_0 .

Para el caso de la formulación A se acepta H_0 , debido que en esta formulación el parámetro de elasticidad no presenta diferencias significativas ya que $P(T < t)$.

En las siguientes gráficas se puede observar el comportamiento de los parámetros mecánicos dureza y elasticidad.

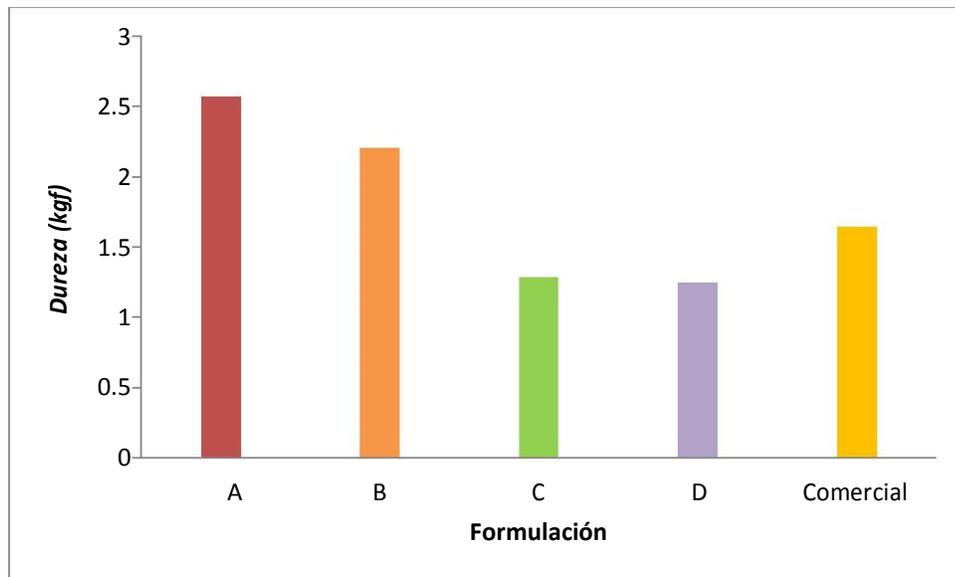


Figura 15. Gráfico comparativo para el parámetro dureza

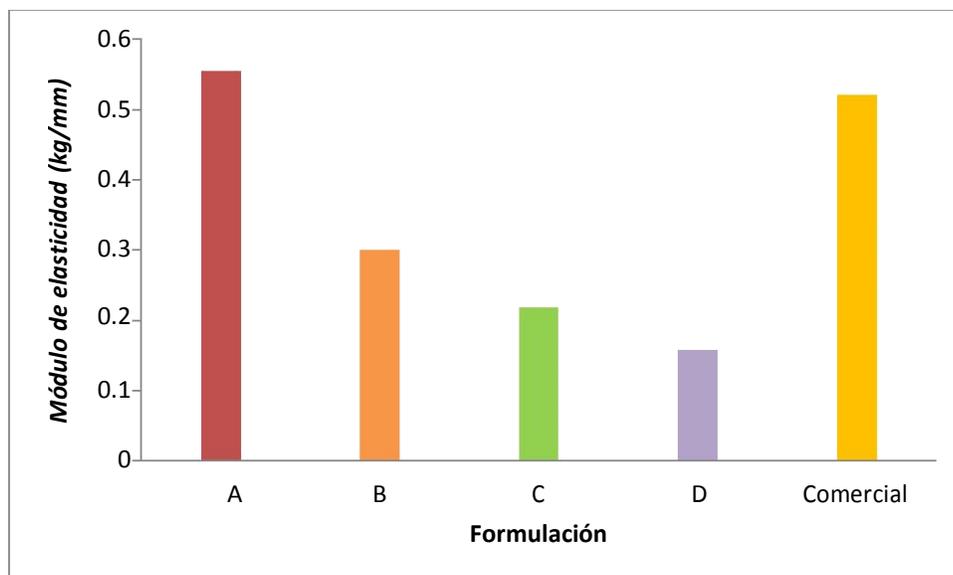


Figura 16. Gráfico comparativo para el parámetro elasticidad

Mediante los resultados presentados anteriormente y observando las gráficas que comparan los parámetros mecánicos de las formulaciones con los parámetros mecánicos del chicle comercial, se puede observar que la dureza disminuye conforme la concentración de la enzima proteolítica aumenta, en otras palabras, la dureza es inversamente proporcional a la concentración de la enzima proteolítica.

Con respecto a los plastificantes se puede observar que las formulaciones elaboradas con el propilenglicol como plastificante, mostraron una mayor dureza que las elaboradas con glicerina, esto es debido a que el propilenglicol tiene más radicales libres en el mismo átomo y por lo tanto los puentes de hidrógeno que forma con la proteína son más estables que los que forma la glicerina (Mc Gowan y Padua, 2005).

Estadísticamente se puede concluir que las formulaciones A, B y D presentan diferencias significativas en el parámetro de dureza con respecto al chicle comercial, sin embargo, la dureza de la formulación D es más cercana a la dureza del chicle comercial; a su vez el resultado de dureza de la formulación C no presenta diferencias significativas con respecto al chicle comercial. Mediante este análisis se comprueba que es la papaína el factor que está mayormente relacionado con la dureza final del producto.

Sin embargo, a pesar de que las formulaciones elaboradas con menor concentración de enzima proteolítica son las que presentan menor dureza, el valor de dureza que presentan se encuentra por debajo de la dureza requerida bibliográficamente (Cadbury- Adams, 2003) y por lo tanto también se encuentra por debajo del valor de dureza del chicle comercial evaluado.

Por otro lado la elasticidad se vio afectada cuando la enzima proteolítica aumentó, es decir, la elasticidad también resultó ser inversamente proporcional a la concentración de la enzima proteolítica.

Estadísticamente el parámetro de elasticidad no mostró diferencias significativas para la formulación A elaborada con el plastificante 1. Para las formulaciones B, C y D si existieron diferencias significativas, sin embargo, la elasticidad en la formulación B fue más cercana a la elasticidad del chicle comercial puesto que la elasticidad en las formulaciones elaboradas con la mayor cantidad de enzima se encuentran ya muy por debajo del parámetro del chicle comercial. Mediante esta prueba se puede observar que las formulaciones elaboradas con la menor concentración de enzima proteolítica (0.2%) tienen una elasticidad más aceptable comparada con el chicle comercial. También se puede ver que el plastificante 1 otorgó mayor elasticidad que el plastificante 2, esto es debido a que el primero tiene mayores propiedades de humectación que el segundo

Con el análisis de textura se puede concluir que el chicle con propiedades mecánicas más parecida a las del chicle comercial es el chicle elaborado con el plastificante 1 y con la menor concentración de enzima proteolítica (0.2%), es decir, el chicle elaborado con la formulación A. Sin embargo, el chicle de la formulación C

3.1.2 Cálculo de la densidad

A continuación se muestran los valores promedio de densidad obtenidos mediante el método de desplazamiento para cada una de las 4 formulaciones de chicle biodegradable:

Tabla 25. Resultados de densidad

Formulación	Densidad (g/cm ³)
A	6.15
B	4.314
C	6.2233
D	4.465
Comercial	6.3733

La prueba se realizó por triplicado y por lo tanto los valores que se muestran son un promedio de las 3 repeticiones.

Se realizó la prueba *t* de student para cada una de las formulaciones evaluadas.

Tabla 26. Prueba *t* de student para densidad

	A	B	C	D	Chicle comercial
Media	6.15	4.314	6.2233	4.465	6.3733
Varianza	0.005	0.049	0.021	0.076	0.260
P (t) dos colas	0.960	9.779	0.633	8.794	---

En donde:

H₀: No existen diferencias significativas

H₁: Existen diferencias significativas

En esta prueba las formulaciones que no presentaron diferencias significativas fueron las formulaciones A y C debido a que $P (T < t)$, por lo tanto se acepta H_0 para estas formulaciones y se rechaza H_0 para las formulaciones B y D, puesto que estas últimas presentaron diferencias significativas porque $P (T > t)$.

En la siguiente gráfica se puede observar la diferencia de densidad en cada una de las muestras:

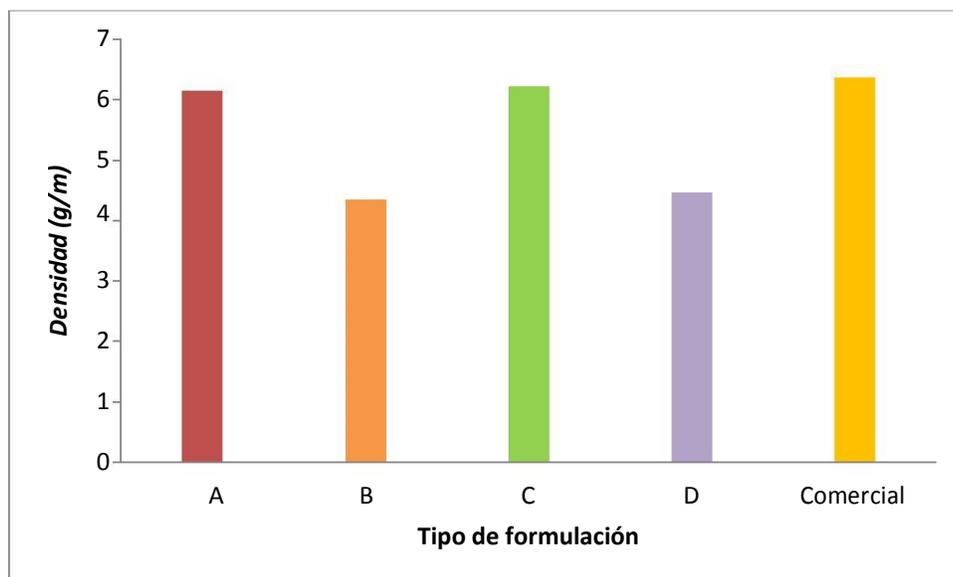


Figura 17. Gráfico comparativo de densidad

En base a la gráfica y mediante los datos estadísticos mencionados anteriormente se puede concluir una diferencia significativa con respecto al chicle comercial en las densidades de las formulaciones B y D.

Los chicles que obtuvieron las diferencias significativas fueron los chicles elaborados con la glicerina. Las densidades de estos chicles fueron claramente menores que la densidad del chicle comercial y menores que las densidades de los chicles elaborados con el propilenglicol.

La enzima proteolítica no mostró influir en la densidad final del producto puesto que no hubo diferencias significativas entre las densidades de los chicles elaborados con mayor concentración de enzima y los chicles elaborados con menor concentración de enzima. El cambio en el comportamiento de la densidad se mostró a partir del cambio del plastificante, mas no en el cambio de concentración de la papaína.

Por otro lado, ninguna de las 4 formulaciones resultó ser más densa que el chicle comercial. Esto se debe a que los ingredientes que dan lugar a la polimerización del chicle biodegradable (zeína, plastificante y papaína) tienen menor masa molar que cualquiera de los polímeros sintéticos que conforman los chicles comerciales (en este caso polivinilacetato).

Con esta prueba se puede decir que el chicle con la densidad más parecida a la del chicle comercial, es el chicle elaborado con el plastificante 1 y con la mayor concentración de enzima proteolítica (0.4%), es decir, el chicle elaborado con la formulación C.

3.1.3 Evaluación de la actividad de agua

A continuación se muestran los resultados de actividad de agua obtenidos con el higrómetro:

Tabla 27. Resultados para actividad de agua

Formulación	Actividad de agua
A	0.653
B	0.622
C	0.64
D	0.59
Comercial	0.646

La prueba se realizó por triplicado y por tanto los valores que se muestran son un promedio de las 3 repeticiones.

Se realizó la prueba *t* de student para los datos obtenidos de actividad de agua.

Tabla 28. Prueba *t* de student para actividad de agua

	A	B	C	D	Chicle comercial
Media	0.653	0.622	0.64	0.59	0.646
Varianza	0.0002	1.06E-5	1.08E-5	3.26E-5	4.06E-5
P (t) dos colas	0.886	8.209	2.132	16.121	---

En donde:

H_0 : No existen diferencias significativas

H_1 : Existen diferencias significativas

En esta prueba la actividad de agua presenta diferencias significativa para las formulaciones B y D debido a que $P(T > t)$, por lo tanto se rechaza H_0 para estas formulaciones.

Para el caso de las formulaciones A y C, se acepta H_0 puesto que no presentan diferencias significativas debido a que $P(T < t)$.

En la siguiente gráfica se puede observar la diferencia de densidad en cada una de las muestras:

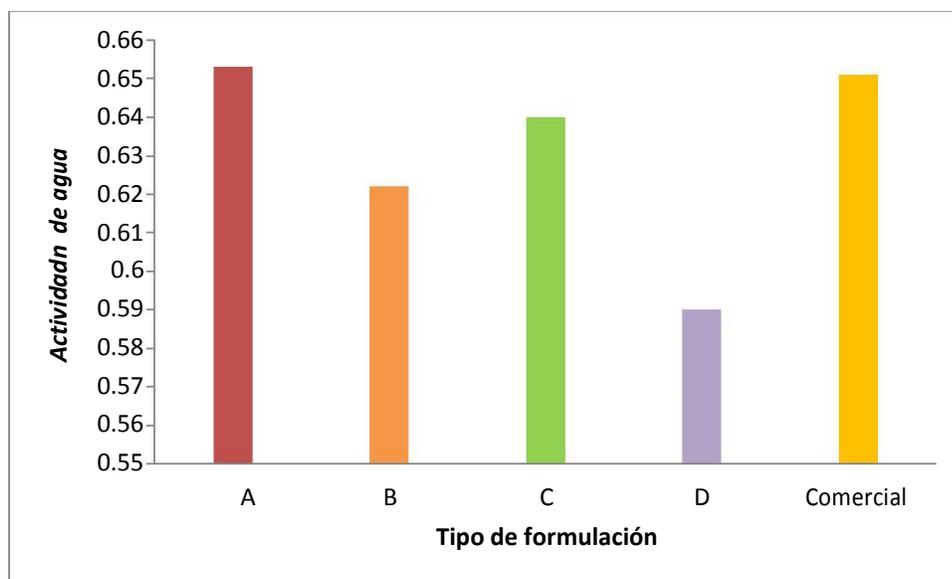


Figura 18. Gráfico comparativo para actividad de agua

Mediante los resultados presentados anteriormente y observando la gráfica que compara la actividad de agua de todas las muestras, se puede concluir que existieron diferencias significativas para los chicles formulados con la glicerina, puesto que la actividad de agua resultó ser mucho más baja que la evaluada para el chicle comercial e incluso más baja que la reportada bibliográficamente que es de 0.64 (Richardson, 1986).

Con respecto a la enzima proteolítica se puede decir que la actividad de agua disminuyó cuando la concentración de la papaína aumentó, en otras palabras, la actividad de agua resultó ser inversamente proporcional a la concentración de la enzima. Esto se debe a que a una concentración más alta de enzima, se generan más interacciones entre agua e ingrediente y por ende queda menos cantidad de agua libre (Badui, 2006).

Con esta evaluación se puede concluir que el chicle con actividad de agua más parecida a la del chicle comercial es el chicle elaborado con el plastificante 1 y con la menor concentración de enzima proteolítica (0.2%), es decir, el chicle elaborado con la formulación A. Este parámetro influye de manera directa en la temperatura de transición vítrea.

3.1.4 Cálculo de la temperatura de transición vítrea

A continuación se muestran los termogramas y las temperaturas de transición vítrea (T_g) obtenidas para cada uno de los componentes del chicle biodegradable.

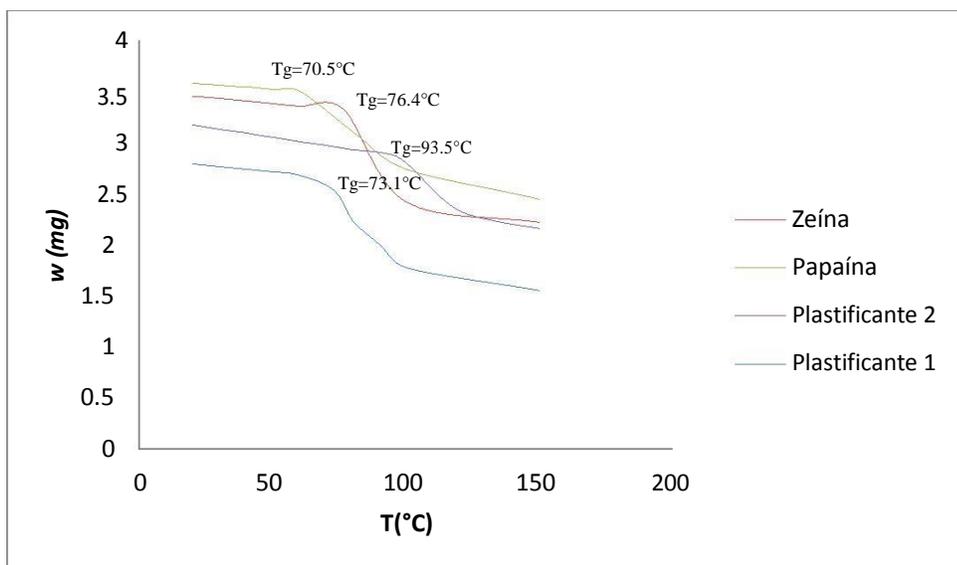


Figura 19. Termogramas de los componentes principales del chicle biodegradable (zeína, papaína y plastificantes).

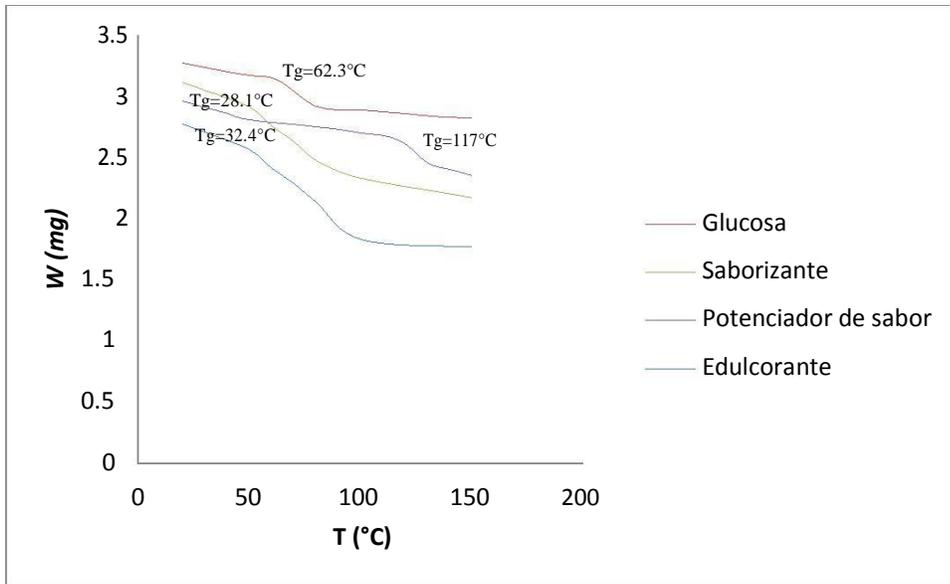


Figura 20. Termogramas del potenciador de sabor, saborizante, glucosa y edulcorante.

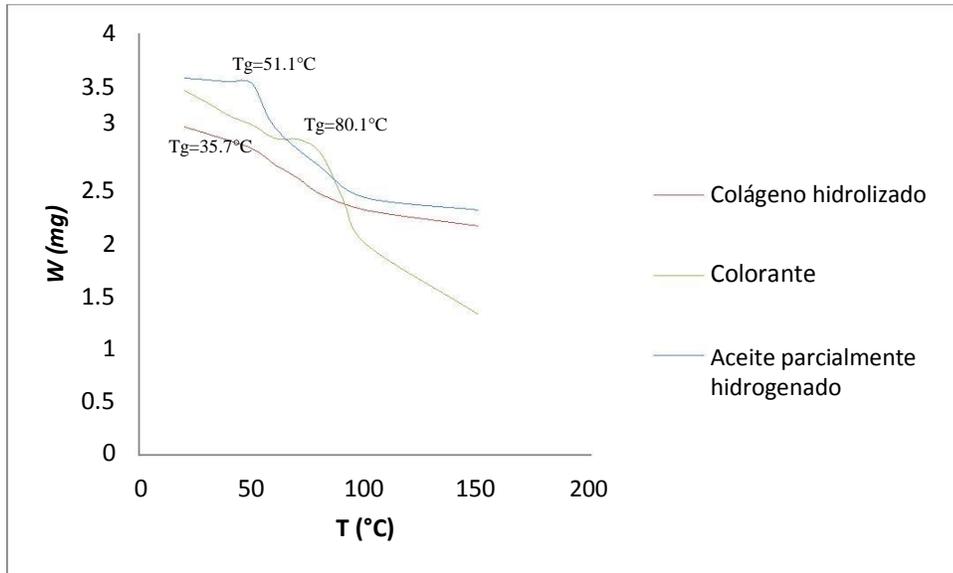


Figura 21. Termogramas del colágeno hidrolizado, colorante y aceite parcialmente hidrolizado

Tabla 29. Temperatura de transición vítrea de cada componente

Ingrediente	Tg (°C)
Fracción proteica del maíz	76.4
Glucosa	62.3
Plastificante 1	73.1
Plastificante 2	93.5
Colágeno hidrolizado	35.7
Aceite parcialmente hidrogenado	51.1
Potenciador de sabor	117.4
Edulcorante	32.4
Colorante	80.1
Saborizante	28.1
Enzima proteolítica	60.3

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la temperatura de transición vítrea (Tg) mediante la ecuación de Gordon-Taylor para cada una de las diferentes formulaciones de chicle biodegradable:

Tabla 30. Resultados de temperatura de transición vítrea

Formulación	Tg (°C)
A	60.154
B	58.79
C	60.089
D	58.728

En los resultados anteriores se puede observar que las temperaturas de transición vítrea de los polímeros son muy semejantes entre sí y a su vez muy cercanas a la temperatura de transición vítrea reportada en la bibliografía que corresponde a 60°C (Bilmeyer, 2004).

La temperatura de transición vítrea indica el momento en que el polímero pasa de un estado vítreo a un estado cauchoso, para que el chicle tenga las características texturales aceptadas. El producto al final del proceso deberá de estar en estado vítreo, de lo contrario el chicle se volverá pegajoso y el producto final será rechazado por el consumidor. Debido a esto, la temperatura de transición vítrea debe cumplir dos requerimientos importantes: debe ser mayor a la temperatura de almacenamiento y debe ser mayor a la temperatura del interior de la boca.

Mediante los presentes resultados, se puede concluir que la temperatura de transición vítrea de las 4 formulaciones del chicle biodegradable cumple con los requerimientos antes mencionados, tomando en cuenta que el almacenamiento del chicle debe ser a la temperatura ambiente y la temperatura promedio de la saliva es de 37

3.2 Evaluación de la capacidad de biodegradación del chicle

A continuación se muestran las pérdidas de peso de las muestras al cabo de 80 días:

Tabla 31. Pérdida de peso en agua de lago

Días	Peso de la muestra (g)				
	A	B	C	D	Comercial
0	2	2	2	2	2
20	1.85	1.917	1.828	1.864	1.998
40	1.402	1.512	1.372	1.5	1.952
60	0.808	0.932	0.7	0.872	1.932
80	0.592	0.792	0.552	0.704	1.908

Tabla 32. Pérdida de peso en la simulación de relleno sanitario

Días	Peso de la muestra (g)				
	A	B	C	D	Comercial
0	2	2	2	2	2
20	1.812	1.876	1.821	1.832	1.998
40	1.372	1.416	1.344	1.456	1,944
60	0.764	0.848	0.644	0.768	1.924
80	0.528	0.668	0.493	0.642	1.896

La prueba se realizó por triplicado, los valores que se muestran en la tabla son el promedio de 3 repeticiones.

La siguiente gráfica presenta las curvas de gravimetría para las formulaciones de chicle en los dos medios expuestos:

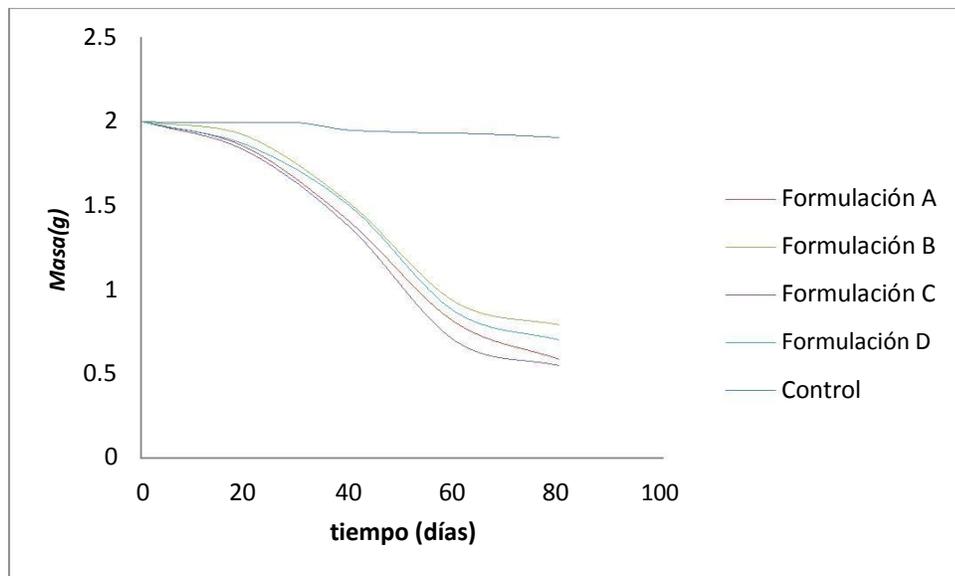


Figura 22. Curvas de gravimetría para las distintas formulaciones después de ser expuestas a agua de lago

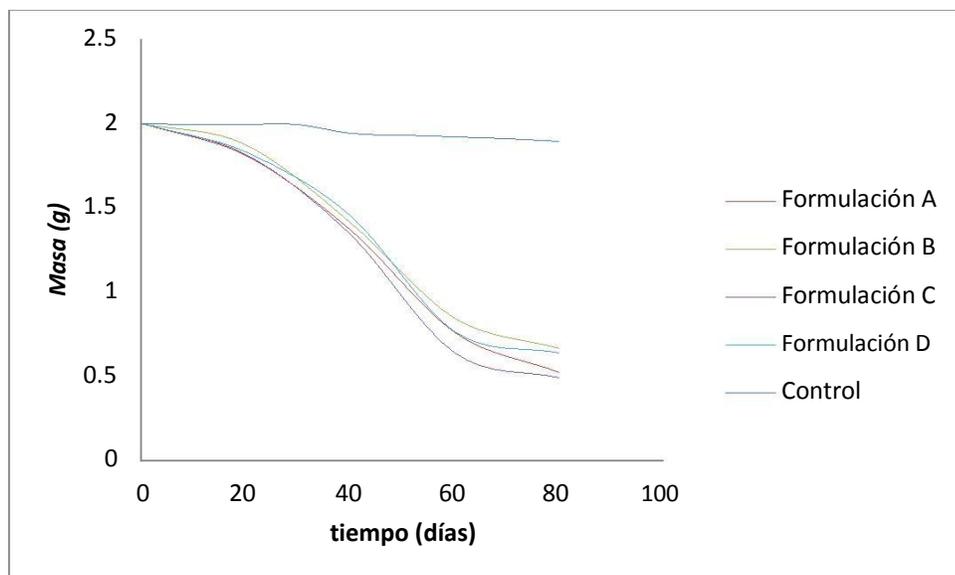


Figura 23. Curvas de gravimetría para las distintas formulaciones después de ser expuestas a la simulación de relleno sanitario

A continuación se muestran los porcentajes de mineralización después de 80 días de exposición de cada chicle al medio correspondiente. La tasa de mineralización se calculó por diferencia de la cantidad de CO₂ que se registró en el recipiente utilizado como control, este valor fue relacionado con la cantidad teórica de CO₂ que puede liberar el material y da como resultado el porcentaje de mineralización.

Tabla 33. Resultados del porcentaje de mineralización

Medio	Porcentaje de mineralización				Chicle comercial
	A	B	C	D	
Agua de lago	70.4%	60.4%	72.4%	64.8%	4.6%
Relleno sanitario	73.6%	66.6%	75.4%	67.8%	5.2%

En la siguiente gráfica se puede observar claramente el comportamiento del porcentaje final de mineralización de cada una de las formulaciones ante cada uno de los dos medios:

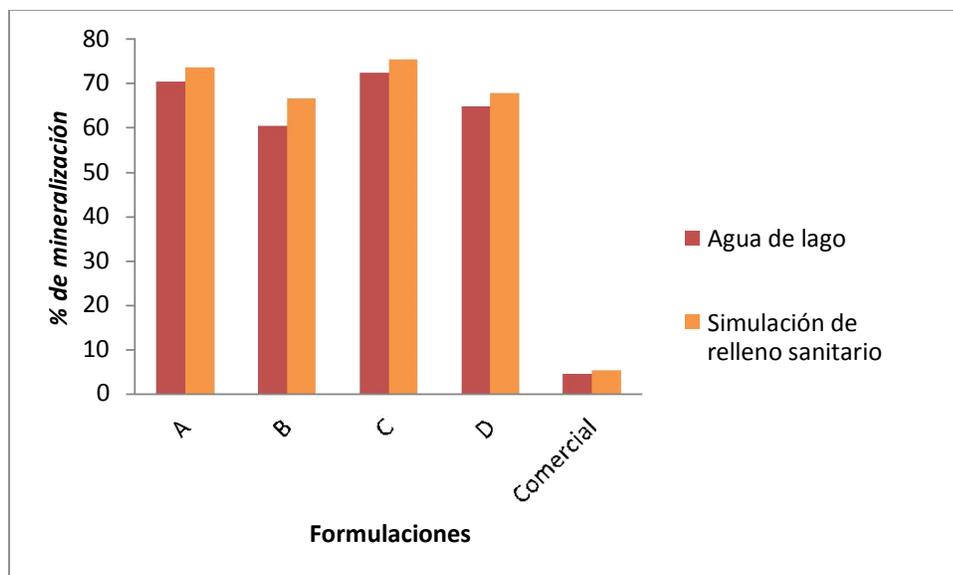


Figura 24. Gráfico comparativo de porcentajes mineralización

En las curvas de gravimetría anteriores se puede observar que la principal descomposición de las muestras ocurrió entre los días 40 y 60 para en caso del agua de lago, y entre los días 20 y 40 en el caso de la simulación del relleno sanitario, tanto para los chicles biodegradables como para el chicle comercial.

Durante los primeros 20 días de exposición a la simulación del relleno sanitario, la pérdida de peso fue poco significativa y por ende la producción de CO_2 resultó casi igual entre las muestras y el control, pero a partir del día 20 la cantidad de CO_2 empezó a aumentar en las muestras y el peso de las muestras empezó a disminuir. Ruíz obtuvo un resultado semejante al evaluar la degradación de un polímero de almidón de yuca, el autor menciona que una degradación significativa de su polímero se obtuvo a partir del día 23, en un medio semejante al relleno sanitario utilizado en la presente investigación (Ruíz *et al*, 2009).

Para el caso del agua de lago la degradación fue mínima los primeros 40 días; esto se debe a que el polímero al ponerse en contacto con un medio acuoso, lo primero que experimenta es un hinchamiento de los gránulos como resultado de la absorción de agua. Esta capacidad de absorción es necesaria debido a que facilita la acción de las enzimas para convertir el polímero en fragmentos más pequeños y asimilables por microorganismos (Meneses y

Corrales, 2001). A partir del día 40 el peso empezó a disminuir significativamente, y a su vez la producción del CO₂ empezó a aumentar.

Mediante este análisis se puede concluir que la mayor biodegradación se obtuvo en la simulación de relleno sanitario y esto se evidencia con la mayor obtención de CO₂ y por consiguiente el porcentaje más alto de mineralización.

En el caso de las muestras de la simulación del relleno sanitario se observó la presencia de moho en la superficie, esto comprueba que efectivamente el material estuvo expuesto a la acción metabólica de microorganismos presentes en la tierra. Uribe realizó una observación semejante en su propia investigación, el autor menciona que la aparición de películas microbianas en una muestra de polietileno de baja densidad, evidencia un ataque de microorganismos (Uribe *et al*, 2010).

Por otro lado, los recipientes que contenían las muestras expuestas al agua de lago presentaron un olor a fermentación. Esto demuestra que los azúcares contenidos en los chicles fueron fermentados por los microorganismos presentes en agua dulce. A su vez, la producción de CO₂ comprueba que efectivamente los chicles fueron en su mayoría biodegradados.

Se puede también mencionar que la biodegradación no fue el único mecanismo presente, sino que también existió mínimamente una degradación enzimática debido a la presencia de la enzima proteolítica en la formulación. Con respecto a la enzima proteolítica se puede decir que las muestras elaboradas con la mayor concentración de papaína fueron las que alcanzaron un mayor porcentaje de mineralización. En la investigación realizada por Gómez (2007), se puede encontrar un comportamiento de degradación enzimática semejante, el autor afirma que la acción enzimática de la papaína se puede observar en la degradación del poliuretano al cabo de 15 días (Gómez *et al*, 2007).

Sin embargo, la diferencia entre la mineralización entre cada una de las muestras elaboradas con diferentes concentraciones de enzima proteolítica resultó ser mínima (de 2 a

4%), así que se sigue considerando a la biodegradación como el principal mecanismo de degradación.

Con respecto al porcentaje de mineralización, se puede observar que fue alto para todas las muestras, sin embargo, fueron los chicles elaborados con el plastificante 1 los que obtuvieron el mayor porcentaje de mineralización, llegando a ser hasta de 75.4% en el caso de la formulación C expuesta a la simulación de relleno sanitario. Estos resultados elevados en porcentaje de mineralización indican que todas las muestras son “biodegradables” ya que cumplen con el 60%, porcentaje mínimo de mineralización establecido por la norma ASTM D5988-03.

Comparando las muestras con los resultados obtenidos para la capacidad de mineralización del chicle comercial, se puede decir que el porcentaje general de mineralización de las muestras es 14 veces mayor que el porcentaje de mineralización del chicle no biodegradable, ya que el porcentaje de mineralización que alcanzó este último fue de 4.6% en el medio acuoso y de 5.2% en la simulación de relleno sanitario.

Tomando en cuenta la velocidad de reacción de la curva de mineralización de cada una de las muestras en cada uno de los medios y mediante una regresión potencial partir de la curva gravimétrica, puede calcularse el tiempo en que cada polímero tardará en desaparecer. De acuerdo a este cálculo, el tiempo promedio en que las muestras biodegradables tardarán en desaparecer completamente va de los 130 a los 200 días, es decir, de los 4 a los 7 meses aproximadamente, mientras que el tiempo promedio en que el chicle comercial tardará en degradarse completamente es de aproximadamente 5 años.

Mediante el análisis de la capacidad de biodegradación de las muestras puede concluirse que fue el chicle elaborado con el plastificante 1 y con la mayor concentración de enzima proteolítica, es decir, el chicle C, es el que obtuvo un mayor porcentaje de mineralización y por ende una mayor biodegradación; sin embargo, todas las muestras presentan una capacidad de biodegradación aceptable de acuerdo a la norma ASTM D5988-03 como para ser consideradas “biodegradables”.

3.2 Estudio bacteriológico del *Streptococcus mutans*

Se recolectaron 15 muestras a partir de placa bucobacteriana. La muestra bucobacteriana se sembró primeramente en medio Mitis salivarius y posteriormente en Trypticase soya con sacarosa y extracto de levadura para su purificación. El *Streptococcus mutans* fue incubado a una temperatura de 37°C y un pH de 7.2, durante 48 horas en anaerobiosis y presencia de CO₂.

De las 15 muestras de placa bucobacteriana se obtuvieron 27 cepas sospechosas, las cuales fueron sometidas a las pruebas bioquímicas correspondientes (gram, catalasa, rojo de metilo, Vogues Proskauer, manitol, sorbitol, rafinosa y arabinosa).

Únicamente 5 de las 28 cepas sospechosas resultaron ser *Streptococcus mutans*. A continuación se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas de cada una de las cepas sospechosas:

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a cada una de las cepas separadas después de la inoculación de placa bucobacteriana.

Tabla 34. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación del *Streptococcus mutans*

Cepa	Gram	Catalasa	RM	VP	Manitol	Sorbitol	Rafinosa	Arabinosa
6.1	+	-	-	+	+	+	+	+
6.2	+	-	+					
6.3	+	+						
6.4	+	-	+					
6.5	+	-	-	+	+	-		
7.1	+	-	+					
7.2	+	-	+					
7.3	+	-	+					
7.4	+	-	+					
7.5	+	-	+					
7.6	+	+						
7.7	+	-	-	+	-			
7.8	+	-	+					
8.1	+	-	-	+	-			
8.2	+	-	+					
8.3	+	-	+					
8.4	+	-	+					
8.5	+	-	-	+	-			
8.6	+	-	+					
9.1	+	-	+					
9.2	+	-	-	+	+	+	-	
9.3	+	-	+					
10.1	+	-	-	+	+	+	+	+
10.2	+	-	-	+	+	+	+	+
10.3	+	-	-	+	+	+	+	+
10.4	+	-	-	+	+	-		
12.1	+	-	-	+	+	+	+	+

El medio que resultó más apropiado para identificar las colonias de *Streptococcus mutans* fue el Mitis salivarius. Este medio es un medio selectivo debido a su contenido de cristal violeta. Al inocular la muestra de placa dental bucobacteriana en este medio, las colonias de *Streptococcus mutans* se colorean de azul y es por eso que su identificación resultó sencilla.

Las colonias de *Streptococcus mutans* son pequeñas y rugosas, sin embargo, hay que tener cuidado al separarlas de las demás colonias a partir de este medio, debido a que también las colonias de *Streptococcus salivarius* crecen de color azul pero estas últimas son grandes y lisas.

El medio apropiado para la purificación de *Streptococcus mutans* fue el medio Tripticasa soya con sacarosa y extracto de levadura. Este medio fue enriquecido con el disacárido debido a que el *Streptococcus mutans* es un microorganismo exigente en su nutrición y utiliza la sacarosa para su respiración. Las colonias de *Streptococcus mutans* en el medio Tripticasa soya con sacarosa y extracto de levadura, resultaron ser pequeñas, cristalinas y de superficie rugosa, también presentaron fuerte adherencia al agar, sin embargo, después de 5 días el microorganismo fermentó la sacarosa contenida en el medio y su color cambió de cristalino a amarillento. Se realizó tinción de gram para su identificación. El gram mostró formas cocáceas unidas en cadenas cortas.

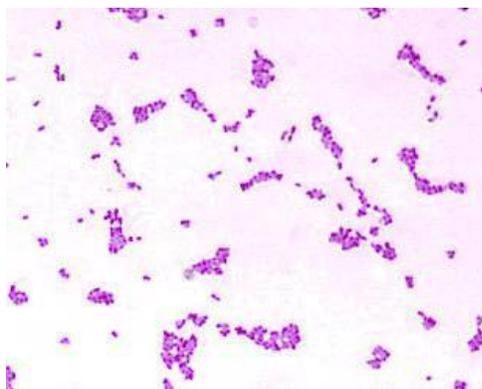


Figura 25. Tinción de gram para el *Streptococcus mutans*

3.3 Estudio bacteriológico de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei*

Se aislaron e identificaron diferentes cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en medio Rogosa. *Lactobacillus casei* se aisló a partir de una inoculación de productos lácteos fermentados comerciales y *Lactobacillus reuteri* A y B de una casa comercial.

Las pruebas realizadas para su identificación fueron gram, catalasa, MR-VP, sacarosa, manitol, sorbitol, arabinosa (Mac Faddin, 2003).

Las colonias de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* resultaron ser pequeñas, blanquizas y lisas en el medio Rogosa en el que fueron sembradas. Su óptimo crecimiento se dio en presencia de anaerobiosis, a una temperatura de 37°C.

Las colonias crecieron también en presencia de oxígeno, aunque su mayor crecimiento se dio en anaerobiosis y presencia de CO₂ tal y como lo indica la bibliografía (Bergey *et al*, 2001).

Todas las colonias cumplieron con los resultados bibliográficos en cada una de las pruebas de identificación. Ninguno de los organismos inoculados creció en el medio Cerebro corazón, ya que sus requerimientos nutricionales son aminoácidos, vitaminas y nucleótido (Ishihara e Hikoro, 1985), lo que provoca una deficiencia de crecimiento en un medio que no lo posea como el Cerebro corazón; por lo cual puede concluirse que todas las colonias resultaron ser *Lactobacillus spp.*

Se aplicó tinción de gram para ambas colonias. Ante el microscopio se observaron bacilos largos, delgadas y en cadenas largas para el caso de *Lactobacillus casei* y bacilos largos, medianamente delgados y en cadenas cortas para el *Lactobacillus reuteri*.

3.1 Prueba de inhibición

Se usaron *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* para la prueba de inhibición del *Streptococcus mutans*. Posteriormente se calculó la tasa de sobrevivientes y mortalidad de *Streptococcus mutans* después del contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp.* En las siguientes tablas se pueden observar las tasas de mortalidad y sobrevivencia de *Streptococcus mutans* después de 2, 4, 8 y 24 horas de contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp.*

Tabla 35. Tasa de mortalidad y sobrevivencia de *Streptococcus mutans* después de 2 horas del contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp*

<i>Lactobacillus</i>	Tasa de sobrevivencia	Tasa de mortalidad
<i>Lactobacillus casei</i>	78.56%	21.44%
<i>Lactobacillus reuteri A</i>	74.38%	25.62%
<i>Lactobacillus reuteri B</i>	72.39%	27.61%

Tabla 36. Tasa de mortalidad y sobrevivencia de *Streptococcus mutans* después de 4 horas de contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp*

<i>Lactobacillus</i>	Tasa de sobrevivencia	Tasa de mortalidad
<i>Lactobacillus casei</i>	46.34%	53.66%
<i>Lactobacillus reuteri A</i>	42.38%	57.62%
<i>Lactobacillus reuteri B</i>	39.22%	60.78%

Tabla 37. Tasa de mortalidad y sobrevivencia de *Streptococcus mutans* después de 8 horas de contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp*

<i>Lactobacillus</i>	Tasa de sobrevivencia	Tasa de mortalidad
<i>Lactobacillus casei</i>	33.33%	66.67%
<i>Lactobacillus reuteri A</i>	29.34%	70.66%
<i>Lactobacillus reuteri B</i>	27.73%	72.27%

Tabla 38. Tasa de mortalidad de *Streptococcus mutans* después de 24 horas del contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp*

<i>Lactobacillus</i>	Tasa de sobrevivencia	Tasa de mortalidad
<i>Lactobacillus casei</i>	29.38%	70.62%
<i>Lactobacillus reuteri A</i>	25.93%	74.07%
<i>Lactobacillus reuteri B</i>	24.56%	75.44%

En la siguiente gráfica se pueden observar las curvas de mortalidad para las cepas de *Streptococcus mutans* después del contacto con los metabolitos de *Lactobacillus spp*.

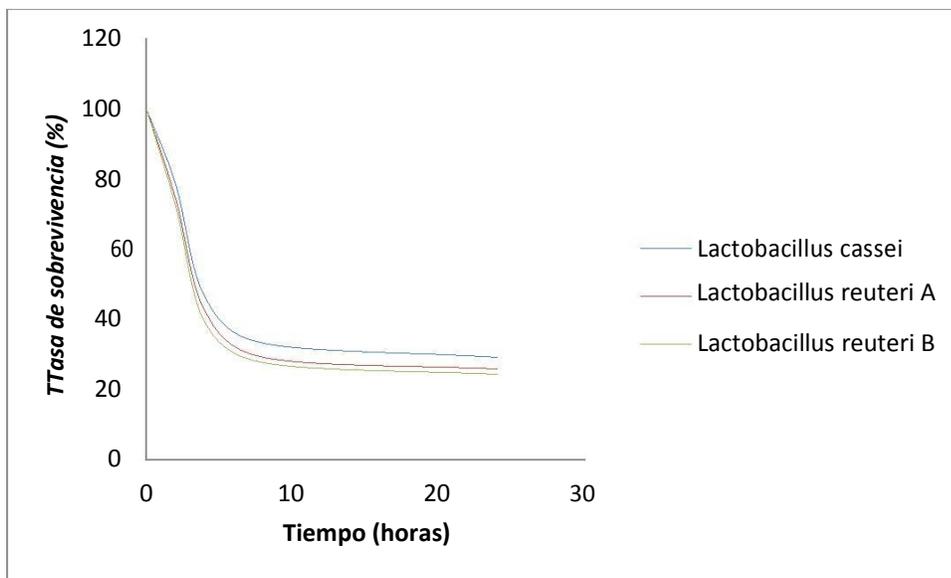


Figura 26. Curvas de sobrevivencia de *Streptococcus mutans* ante la acción metabólica de *Lactobacillus spp*

Con base en los resultados reportados se puede decir que los tres lactobacilos lograron disminuir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, mas no inhibirlo totalmente, sin embargo fue el *Lactobacillus reuteri B* el microorganismo que logró un menor crecimiento de la bacteria involucrada en el desarrollo de la caries, llegando a tener una tasa de mortalidad de 60.78% a las 4 horas de contacto, lo cual indica que tal microorganismo es apropiado para ser microencapsulado y posteriormente añadido al centro líquido del chicle biodegradable (el dato usado corresponde a la tasa de mortalidad a las 4 horas de exposición debido a que 4 horas es el tiempo máximo que generalmente tiene un chicle en la boca).

Un incremento significativo en la tasa de mortalidad se dió entre las 2 a las 4 horas de exposición del *Streptococcus mutans* ante los metabolitos de los tres lactobacilos. Esto indica que los lactobacilos son apropiados para ser añadidos al centro blando de un chicle, debido a que el rango de tiempo mencionado (2 a 4 horas) es un tiempo estándar para que un chicle sea mascado.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La formulación óptima obtenida para la elaboración del chicle biodegradable fue la elaborada con el plastificante 1 y con la mayor concentración de enzima proteolítica (0.4%). Esta formulación presentó tanto propiedades texturales como propiedades físicas semejantes a las del chicle comercial.
2. La formulación elegida del chicle biodegradable presentó una temperatura de transición vítrea de 60.09°C, esto indica que su almacenamiento debe ser menor a esta temperatura.
3. La utilización de un derivado proteico en la formulación del chicle biodegradable, es una opción viable para el cuidado del medio ambiente ya que su alta capacidad de biodegradabilidad permite que este desaparezca en un tiempo aproximado de 6 meses.
4. La formulación con *Lactobacillus reuteri B* puede ser apoyo preventivo en la aparición de la caries dental, ya que dicho microorganismo logró reducir “in vitro” el crecimiento del *Streptococcus mutans* en un 60.78% después de 4 horas de exposición ante sus metabolitos.

REFERENCIAS

Referencias

1. Anzaldúa M. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Acribia. S.A. Zaragoza, España.
2. Asociación Internacional de Goma de Mascar. 2007 International Chewing Gum Association. Consultada 5 Agosto, 2012. Disponible en: www.gumassociation.org/default.aspx?Cat=5
3. ASTM D5988-03. Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil. American Section of the International Association for Testing Materials.
4. Badui S. 2006. Química de los alimentos. 2^a edición. Prentice Hall. México.
5. Bergey D., Harrison F., Breed R., Hammer B., Hunton F. 2001. Bergey's manual of determinative bacteriology. 2^a edición. The Williams & Wilminms CO. Baltimore.
6. Billmeyer F. 2004. Ciencia de los polímeros. Reverté. España.
7. Bojanich A., Calamari. S., Corneio L., Barembaum S., Virga C. Dorronsoro S. 2003. Efecto de polímeros sobre los niveles de IgAs anti *Streptococcus mutans* y la producción de dextranos de *Streptococcus mutans autóctonos*. Avances en odontoestomomatología. 19(5): 225-232.
8. Borda D., Pardo J., Martínez M., Montaña J. 2009. Producción de un fertilizante a partir de un aislamiento de *Azetobacter nigricans* Obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. Pontificia universidad Javeriana. 40(62): 71-78.
9. Borgogna M., Bellich B., Zorzín L., Lapasin R., Césaro A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system: Food Chemistry. 122(2): 416-423.
10. Bower, D. An introduction to polymer physics. 2002. Cambridge University Press.

11. Cabezas M. 2009. Evaluación de la capacidad de colonización de un *Lactobacillus spp.* Proveniente de un Fermento comercial. Tesis de Ingeniería en Biotecnología.
12. Cadbury Adams USA 2003. The story of chewing gum. Consultada 7 Agosto 2012. Disponible en: www.tridentgum.com/consumer/html/x12.html
13. Caglar E., Kavaloglu O., Ergeneli S., Sandalli N., Twetman S. 2006. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestión of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. Acta odontológica scandinava. 64:314-318.
14. Caglar E., Kavaloglu O., Kusku O., Sandalli N., Holgerson L., Twetman S. 2007. Effect of chewing gums containing xilitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. Clinical Oral investigations. 11(4). 425-429.
15. Castillo F., Roldán M., Blasco R., Huertas M., Caballero F., Moreno C., Martínez M. 2005. Biotecnología ambiental. Tébar. España.
16. Castro V. 2005. Inhibición del crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* por papaina y sanitrend. Tesis de Licenciatura en Cirujano Dentista.
17. Celeghin A., Rubiolo A. 2002. Variación de la transición vítrea de sistemas azucarados con la composición y las condiciones de almacenamiento. Revista FABICIB. 6(1): 139-145.
18. Chanfón S., López C., Segura G. 2005. La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. Secretaría del medio ambiente y recursos naturales. México.
19. Chiellini E., Corti A., Del Sarto G, Antone D. 2006. Oxobiodegradable polymers: Effect of hydrolysis degree on biodegradation behavior of poly (vinyl alcohol). Polymer Degradation and Stability. 91(12): 3397-3406.
20. De Paula C., Simanca M., Pastrana Y., Carmona A., Lombana G. 2003. Condiciones de utilización del Esteviósido en la elaboración de mermelada de guayaba dulce. Universidad de Córdoba. Departamento de Ingeniería de Alimentos. 76(103): 1-12.

21. Doughari J., Elmahmood A., Manzara S. 2007. Studies on the antibacterial activity of root extracts of *Carica papaya* L. *African Journal of Microbiology Research*. 37-41.
22. Duvick D. 1955. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chemistry*. 38: 374-385.
23. Edwards W. 2000. *La ciencia de las golosinas*. Acribia. España.
24. Ferreira C., Bonifacio K., Froner I. 1999. Evaluation of the antimicrobial activity of the three irrigating solutions in the teeth with purpal necrosis. *Braz. Dent*. 10: 1-6.
25. Forbes B., Sahn D., Weisfeld A. 2007. *Bailey & Scott: Diagnóstico microbiológico*. 12^a edición. Editoria médica panamericana. Madrid, España.
26. Funami T., Fang Y., Noda S., Ishihara S., Nakauma M., Draget K., Nishinari K., Phillips G. 2009. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca binding. *Food Hydrocolloids*. 23(7): 1746-1756.
27. Glass y Puglia, 1979. Un proceso para preparar un chicle con relleno en el centro y no azucarado. Patente 874,717. USA.
28. Gómez R. 1992. Actividad del agua en los alimentos: métodos de determinación. *Alimentaria*. 1(1):77-82.
29. Gómez M., Rivera J., Mendoza A., Robledo J., Díaz N., Terres E. 2007. Degradación térmica y enzimática de redes poliméricas interpretadas. *Revista Iberoamericana de polímeros*. 8(5): 363-373.
30. Guajardo A., Najjar L., Prósperi S., Molina M. 2007. Propiedades de los plásticos reciclados. *Revista de la Facultad de Ciencias aplicadas a la industria*. 1(1): 7-17.
31. Harris N., García F. 2005. *Odontología preventiva primaria*. 2^a edición. Manual moderno. México.
32. Hillman J., Socransky S. Replacement therapy for the prevention of the dental disease. *Adv Dent Res*. 1(1): 119-125.

33. Huerta J. 1975. Principios de microbiología bucal: microbiología y prevención de caries, paradenciopatías y otras enfermedades infecciosas orales. Universidad de Chile.
34. Ishihara K., Hikoro M. 1985. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by cellular extracts of human intestinal lactic acid bacteria. Infection and Immunity. 49 (3): 692-694.
35. Jackson E. 1996. Sugar confectionery manufacture. 2^a edición. Limusa. México.
36. Joklik W., Willet H., Amós B. 1987. Microbiología de Zinzer. 18^a edición. Médica panamericana. Buenos Aires.
37. Konemann E. 1999. Diagnóstico microbiológico. 5^a edición. Médica Panamericana. Washington D.C.
38. Labuza T. 1999. Literatura Review of water activity and glass transition. University of Minnesota. Department of Food Science and Nutrition. 1(1):11-13.
39. Lawton W. 2002. Zein: A History of Processing and Use. Cereal Chemistry. 79(1): 1-18.
40. León V., Totosaus A. 2006. Efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. Ciencia y Tecnología alimentaria. 5 (2): 135-141.
41. Liu J. Ingestible and Degradable Chewing gum including enzymatic Hydrolyzates of Proteins. Patente 6,773,730 B1. USA.
42. Loesche W. 1986. Longitudinal investigation of the Role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. Infection and Immunity. 26 (2): 498-507.
43. Martínez M., Rodríguez A. 2009. Estudio de las cepas de *Streptococcus* del grupo mutans presentes en binomios madre-hijo. Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquía. 21(2):177-185.
44. Martínez T. 2002. La hierba dulce, historia, usos y cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Colección Ciencias de la Salud. Albacete, España.
45. Madeka H., Kokini J. 1995. Effect of glass transition and Cross-Linking on Rheological Properties of Zein. Cereal Chemistry. 73 (4): 433-438.

46. Mac Faddin J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^a edición. Médica panamericana. Montevideo. Uruguay.
47. Mc Gowan B., Padua G. 2005. Formulation of corn zein chewing gum and evaluation of sensory properties by the time intensity method. *Journal of Food Science*. 70 (7): 475-481.
48. Marín M., Bantar C., Monterisi A., Samayevsy J., Suárez de Basnec M., Bianchini H. 1993. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus spp.* vancomicina-resistentes en materiales clínicos. *Infect. & Microbiol. Clin.* 5(4): 28-31.
49. Mathot V. 1994. Classification of Calorimeters: Calorimetry and Thermal Analysis of polymers. Hanser Publishers.
50. Medina R., Moreno C., Velasco C., Gutiérrez T. 2005. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC25175 “in vitro”. *Revista NOVA*. 3 (3): 25-30.
51. Meneses J., Corrales C. 2001. Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir de almidón de yuca. *Revista EIA*. 8 (1): 57-67.
52. Mosse J., Landry J. 1980. Recent research on major maize proteins: Zeins and glutelins. Academic Press, New York.
53. Nikawa H., Makihira S., Fukushima H., Nishimura H., Ozaki K., Ishida K., Darmawan S., Hamada T., Hara K., Matsumoto A., Takemoto T., Aimi R. 2004. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International journal of food microbiology*. 3(43):1-5.
54. Pavia M., Trujillo A., Guamis B., Ferradut V. 1999. Evolución de la composición y textura de un queso de oveja en la maduración. *Alimentaria*. 308:43-47.
55. Pomes A. 1971. Zein. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Vol 15. H. F. Mark and N. G. Gaylord, eds. John Wiley and Sons: New York.
56. Poyato M., Segura J., Ríos V., Bullón P. 2001. La Placa Bacteriana: Conceptos Básicos para el Higienista Dental. *Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia*. 11(2). 146-164.
57. Ríos M., Pimentel G. 2003. Contaminación, la tierra agredida. Trillas. México.

58. Richardson T. 1986. ERH of the confectionery Food products. The Manufacture Confectionery. 12: 85-86.
59. Robles A. 2001. La papaya (Carica papaya). Centro universitario de ciencias biológicas. México.
60. Rodríguez F. 1984. Principios de Sistemas de Polímeros. 2ª edición. El manual moderno. México.
61. Rosenthal A. 1999. Food texture: measurement and perception. Aspen Publishing. USA.
62. Ruíz G., Montoya C., Paniagua M. Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca. Revista EIA. 12: (67-78).
63. Saez V., Hernández J., Peniche C. 2007. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. Biotecnología aplicada. 24(2): 98-107.
64. Santini Z., Alsina D., Athaus R., Meinardi C., Freyre M., Díaz J., González C. 2007. Evaluación de la textura en quesos de oveja: aplicaciones del análisis factorial discriminante. Revista FAVE- Ciencias Agrarias. 5/6(1-2): 7-14.
65. Sánchez L., Acosta E. 2004. Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en un grupo de escolares. Revista ADM. 64(2): 45-51.
66. Shukla R., Munir C. 2001 Zein: the industrial protein from. Industrial Crops and Products. An International Journal. 13 (1): 171-192.
67. Silverstone L., Johnson N., Hardie M., Williams R. 1985. Caries dental: etiología, patología y prevención. Manual moderno. México.
68. Soto A. Del Val S. 2002. Extracción de los principios edulcorantes de la *stevia rebaudiana*. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de alimentos. 20:5-9.
69. Udod V., Storozhuk V., Trofimenlo S., Shabash E., Markelov S. 1983. Effect of the proteolytic enzyme on the body organs and systems of experimental animals. Farmakol Toksikol. 46: 95-98.
70. Uribe D., Girardo D., Gutiérrez S., Merino F. 2010. Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario. Revista Peruana de Biología. 17(1): 133-136.

71. Villena M., Morales M., Gallardo L., Ruíz M. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm.* 50(1): 43-50.
72. Vitery G., Escribano S., Gamboa F., Chavarría N., Gómez R. 2010. Actividad inhibitoria de la *stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. *Revista Nacional de Odontología.* 6(10): 57-63.
73. Welty J., Vergara F. 1997. Actividad de agua concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. *Temas en Tecnología de Alimentos.* Aguilera J. Instituto Politécnico Nacional. 1(1):11-15.
74. YSA Mexicana 2011. Consultada 10 de Agosto de 2012. Disponible en: <http://ysamexicana.com/>
75. Zaritzky N. 1997. Transición vítrea y congelación de alimentos. *Temas de Tecnología de Alimentos.* Instituto Politécnico Nacional. 1(1):180-183.

ANEXOS



Hangzhou Showland Technology Co.,Ltd

Add: Rm2118, No.553, Wensan Road,
Hangzhou,China.
Tel: +86-571-83920516 88920517
Fax: +86-571-88920512
Mobile: +86-135 88433274
E-mail: sales@showlandtech.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Zein (corn protein)

BATCH NUMBER:20110701

TEST DATE: 2011-07-02

QUANTITY: 1000kg

MANUFACTURE DATE: 2011-07-01

PACKING:10kg/carton

EXPIRATION DATE: 2013-06-30

Properties:

Approx molecular weight: 35000

Approx specific gravity: 1.25 at 25°C

Solubility in water: Insoluble

Solubility in 80% alcohol: clear to slightly cloudy

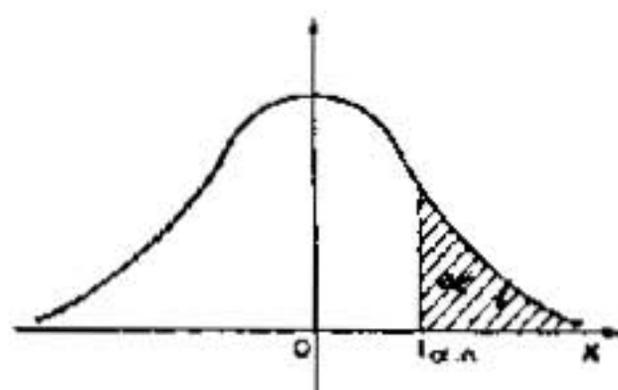
Applications: capsules for pills, controlled release agent, paste agent,disc materials and coating for fresh fruits and paper drink/food containers and so on.

<u>TEST</u>	<u>SPECIFICATION</u>	<u>RESULT</u>
Identification:A,B&C	Conform	Conforms
Nitrogen content	13.1-17.0%	14.24%
Zein	88-96%	89.0%
Loss on drying	Not More Than 8.0%	4.35%
Fat	Not More Than 2.0%	1.25%
Residue on ignition	Not More Than 2.0%	0.12%
Heavy Metal	Not More Than 0.002%	<0.002%
Lead	≤2ppm	<2ppm
Bioburden		
Total Microbial Count	Not More Than 1000cfu/gram	conforms
Salmonella and E.coli	negative	conforms
Organic volatile impurities µg/g	benzene<2,chloroform<60 1,4-Dioxane<380,Dichloromethane<600 Trichloroethylene<80	conforms
Particle size	100% through 20mesh sieve	conforms

Analysts: WEI GAO

Checker: LAI LI

Supervisor: MING DE



$\alpha/2$ gf	0,40	0,30	0,20	0,10	0,050	0,025	0,010	0,005	0,001	0,0005
1	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6
2	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,22	12,94
4	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,859
6	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,405
8	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	0,258	0,535	0,863	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,611	3,922
19	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,192	2,797	3,467	3,745
25	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	0,255	0,529	0,851	1,303	1,648	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
50	0,255	0,528	0,849	1,298	1,676	2,009	2,403	2,678	3,262	3,495
60	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
80	0,254	0,527	0,846	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,415
100	0,254	0,526	0,845	1,290	1,660	1,984	2,365	2,626	3,174	3,389
200	0,254	0,525	0,843	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	3,131	3,339
500	0,253	0,525	0,842	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	3,106	3,310
∞	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291