



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, TITULACIÓN Y GRADUACIÓN

**EFEECTO ANTIMICROBIANO
DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO
(Theobroma cacao L.) SOBRE CEPA DE Streptococcus mutans. ESTUDIO IN VITRO.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
ODONTÓLOGO**

AUTORA

MIRYAN ALEXANDRA SUCUZHAÑAY MORA.

TUTORA

DRA. PATRICIA DE LOURDES ÁLVAREZ VELASCO

QUITO – ECUADOR

JULIO, 2015

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico principalmente a mi Dios por estar siempre guiando mi camino y nunca desampararme en esos momentos de confusión, donde todo parecía haber fracasado.

Lo dedico a mis queridos padres Angel y Rosa por su apoyo incondicional durante toda mi carrera, por siempre inculcarme valores como el amor, el respeto y sobretodo la humildad, los que hicieron de mí una mejor persona.

De manera especial a mis abuelitos por ser la razón y el motivo para seguir superándome día tras día y por ser la fuerza que me impulsa a seguir adelante.

A mis hermanos Angel y Darwin, por sus palabras de motivación y apoyo para culminar este trabajo.

Y como no a todos mis maestros que durante estos años han compartido sus conocimientos para hacer de mí una buena profesional, de igual manera a los docentes que colaboraron desinteresadamente en este trabajo.

A mis amigas por sus palabras de aliento y apoyo durante la elaboración de este trabajo y por siempre confiar en mí.

Con todo mi cariño.

Miryán Sucuzhañay

AGRADECIMIENTO

A los docentes de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador, por ser parte de mi formación como profesional y sobretodo como persona.

A mi tutora de tesis Dra. Patricia Álvarez, por su entrega en la realización de este trabajo, por la revisión del mismo, sus aportes y su paciencia.

A la Dra. Tamara Moya por su generosidad y su gentil donación del cacao, para la elaboración de los extractos.

A las docentes de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, como a la Dra. Rachide Acosta por ser parte de este trabajo en la parte microbiológica y por brindarme sus conocimientos y de manera muy especial a la MSc. Dayana Borja que sin dudarlo me guió y me dedicó parte de su tiempo para la elaboración de los extractos acuosos, de igual manera gracias por su entera confianza al recibirme en su laboratorio.

A mis queridas amigas Aranza, Olguita y Daysi F. por su colaboración y ayuda en la elaboración de este trabajo.

AUTORIZACIÓN DE LA AUTORÍA INTELECTUAL

Yo, **MIRYAN ALEXANDRA SUCUZHAÑAY MORA**, en calidad de autora de la tesis realizada sobre **“EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) SOBRE CEPA DE *Streptococcus mutans*. ESTUDIO IN VITRO”**.

Por la presente autorizó a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes a la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



.....

MIRYAN ALEXANDRA SUCUZHAÑAY MORA

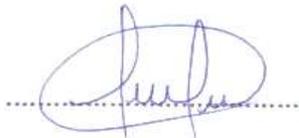
C.I 172497466-0

miryan18@hotmail.com

INFORME DE APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado, presentado por la señorita MIRYAN ALEXANDRA SUCUZHAÑAY MORA, para optar por el Grado de ODONTÓLOGA cuyo título es “**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO (Theobroma cacao L.) SOBRE CEPA DE Streptococcus mutans. ESTUDIO IN VITRO**”.

Considero que dicho Trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.



DRA. PATRICIA DE LOURDES ÁLVAREZ VELASCO

C.I. 1713108783

DIRECTORA DEL PROYECTO

CERTIFICADO DEL TRIBUNAL

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) SOBRE CEPA DE *Streptococcus mutans*. ESTUDIO IN VITRO.

Autora: Sucuzhañay Mora Miryan Alexandra

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

El presente trabajo de investigación, luego de cumplir con todos los requisitos normativos, en nombre de la **UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA** se aprueba; por lo tanto el jurado que se detalla a continuación, autoriza al postulante la presentación a efecto de la sustentación pública.

Quito, 9 de julio del 2015



.....
Dr. Guillermo Alberto Lanás Terán
Presidente del Tribunal



.....
Dra. Tamara Jacqueline Moya Silva
Miembro del Tribunal



.....
Dra. Mayra Elizabeth Paltas Miranda
Miembro del Tribunal

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIZACIÓN DE LA AUTORÍA INTELECTUAL.....	iv
INFORME DE APROBACIÓN DEL TUTOR.....	v
CERTIFICADO DEL TRIBUNAL.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	2
EL PROBLEMA.....	2
1.1 Planteamiento del problema	2
1.1.1 Formulación del problema.....	3
1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
1.3 JUSTIFICACIÓN	5
1.4 HIPÓTESIS.....	7
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO.....	8
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Caries.....	11

2.1.1 Fisiopatología de la caries dental.....	11
2.1.1.1 Primera etapa.....	11
2.1.1.2 Segunda etapa.....	11
2.1.1.3 Tercera etapa	11
2.1.2 Factores etiológicos	11
2.1.2.1 Huésped	11
2.1.2.2 Microorganismos	12
2.1.2.3 Sustrato (dieta)	12
2.1.2.4 Tiempo	12
2.1.3 Biofilm dental.....	13
2.1.3.1 Formación del biofilm	13
2.1.3.2 Clasificación del biofilm.....	13
2.1.3.2.1 Placa supragingival.....	14
2.1.3.2.2 Placa subgingival	14
2.1.3.3 Composición del biofilm.....	14
2.2 Streptococcus mutans.....	14
2.2.1 Definición	14
2.2.2 Estructura del Streptococcus mutans	15
2.2.3 Factores de virulencia	16
2.2.3.1 Acidogenicidad.....	16
2.2.3.2 Aciduricidad.....	16
2.2.3.3 Acidofilicidad.....	16
2.2.3.4 Síntesis de glucanos y fructanos	16
2.2.3.5 Síntesis de polisacáridos Intracelulares	17
2.2.3.6 Producción de dextranasas	17
2.2.3.7 Proteínas de Adhesión Celular (PAC)	17
2.2.3.8 Glucosiltransferasas	17
2.2.3.9 Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs)	19

2.3 Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	19
2.3.1 Definición	19
2.3.2 Descripción Botánica.....	19
2.3.2.1 Tronco	20
2.3.2.2 Hojas.....	20
2.3.2.3 Flor	20
2.3.2.4 Fruto.....	20
2.3.2.5 Semillas	20
2.3.3 Tipos de cacao.....	20
2.3.3.1 Criollo	20
2.3.3.2 Forastero	21
2.3.3.3 Trinitario.....	21
2.3.4 Usos medicinales del cacao.....	21
2.3.5 Componentes del cacao	22
2.3.5.1 Polifenoles.....	22
2.3.5.1.2 Flavonoides	22
2.3.5.2 Alcaloides del cacao	23
2.3.6 Mecanismo de acción de los polifenoles del cacao sobre el <i>Streptococcus mutans</i>	23
2.4 Extractos Vegetales	24
2.5 Agentes antimicrobianos	25
CAPÍTULO III	26
METODOLOGÍA	26
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	26
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	26
3.2.1 Criterios de inclusión.....	26
3.2.2 Criterios de exclusión	26
3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	27
3.4 PROCEDIMIENTO.....	27

3.4.1 Proceso de recolección, desinfección y despulpado del cacao	27
3.4.2 Secado	29
3.4.3 Tostado.....	30
3.4.4 Molienda	31
3.4.5 Obtención del extracto acuoso	32
3.4.6 Preparación del medio de cultivo (Agar sangre).....	36
3.4.7 Activación y siembra de la cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175.....	38
3.4.8 Método de difusión con discos (Kirby – Bauer) con el extracto acuoso	39
3.5 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
CAPÍTULO IV	43
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
4.1 Análisis Estadístico	43
DISCUSIÓN.....	53
CAPÍTULO V	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Nivel de Confianza de la muestra	43
Tabla 2. Cálculo de la muestra de estudio	44
Tabla 3. Resultados de la medición de los halos de inhibición sobre cepa de Streptococcus mutans, tras exponerlos a los extractos acuosos de cacao	45
Tabla 4. Media del halo de inhibición por grupo de estudio	46
Tabla 5. Resultado de las Pruebas de Normalidad	47
Tabla 6. Resultado de Rangos de los extractos al 12.5%	58
Tabla 7. Resultado de la Prueba U de Mann Whitney de los extractos de cáscara y semilla de cacao al 12.5%.....	49
Tabla 8. Resultado de Rangos de los extractos al 20%	50
Tabla 9. Resultado de la Prueba U de Mann Whitney de los extractos de cáscara y semilla de cacao al 20%.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Media de los halos de inhibición por grupo de estudio	46
Gráfico 2. Rangos de los extractos al 12.5%.....	49
Gráfico 3. Rangos de los extractos al 20%.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Adhesión por polisacáridos extracelulares, constituyentes del proceso de adhesión.....	18
Figura 2. Estructura de la Glucosiltransferasa.....	18
Figura 3. Partes de la mazorca del cacao	19
Figura 4. Catequina	23
Figura 5. Desinfección de las mazorcas del cacao	28
Figura 6. A) Separación de los granos de cacao de la cáscara.B) Granos de cacao con la pulpa	28
Figura 7. Despulpado de los granos de cacao	29
Figura 8. Secado de los granos de cacao	29
Figura 9. Horno de secado.....	30
Figura 10. Granos de cacao secos luego de 7 días	30
Figura 11. Tostado de los granos de cacao.....	31
Figura 12. Descascarillado de los granos de cacao. A) Semilla B) Cáscara	31
Figura 13. A) Molienda de las semillas de cacao. B) Molienda de la cáscara de cacao	32
Figura 14. Molino Eléctrico	32
Figura 15. A) Polvo de la semilla de cacao. B) Polvo de la semilla de cáscara-.....	33
Figura 16. Pesaje de los 100g de polvo de semilla de cacao.....	33
Figura 17. Colocación de los 100g de polvo de semilla en el matraz aforado	33
Figura 18. A) Equipo de reflujo. B) Reflujo de cáscara y semilla de cacao.....	34
Figura 19. A) Filtrado al vacío de los extractos de cacao. B) Extracto filtrado	34
Figura 20. Pipeta con V2 del extracto	35
Figura 21. Concentración de los extractos	35
Figura 22. Agitación de los extractos concentrados.....	36
Figura 23. A) Pesaje de 24g de medio de cultivo en la balanza analítica. B) Medición de 600 ml de agua destilada estéril.....	36
Figura 24. Ebullición del medio de cultivo a 90°C	37
Figura 25. Esterilización del medio de cultivo en autoclave.....	37
Figura 26. Cabina de Bioseguridad	38
Figura 27. Distribución de Agar sangre en las cajas Petri.....	38
Figura 28. Aplicación de luz ultravioleta	38
Figura 29. Cepa de <i>Streptococcus mutans</i>	39

Figura 30. Turbidez a 0.5 Mc Farland.....	39
Figura 31. Siembra del Streptococcus mutans	39
Figura 32. Rotulación de cajas Petri	40
Figura 33. Discos de papel filtro embebidos con 20ul del extracto acuoso	40
Figura 34. Colocación de discos de papel filtro en las cajas Petri	41
Figura 35. Colocación de las cajas Petri en Jarra de Anaerobiosis	41
Figura 36. Incubación del Streptococcus mutans.....	41
Figura 37. A) Medición de los halos de inhibición. B) Halos de inhibición.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Fotografías de Equipos e Instrumentos para la investigación.....	64
Anexo 2. Solicitud para la realización del estudio en el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador	69
Anexo 3. Solicitud para la realización del estudio en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador	70
Anexo 4. Certificado de la elaboración de los extractos acuosos de cáscara y semilla de cacao en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.....	71
Anexo 5. Certificado de las pruebas microbiológicas en el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador	72
Anexo 6. Resultados de los halos de inhibición certificados por el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador	73
Anexo 7. Fórmula de concentración de los extractos acuosos	75
Anexo 8. Resultado de sistema de antiplagio URKUND	76
Anexo 9. Traducción del resumen al inglés certificado.....	77

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) SOBRE CEPA DE *Streptococcus mutans*. ESTUDIO IN VITRO”.

AUTORA: Miryan Alexandra Sucuzhañay Mora

TUTORA: Dra. Patricia de Lourdes Álvarez Velasco

FECHA: 9 de Julio del 2015

RESUMEN

La caries dental es una de las enfermedades más predominantes en el ser humano, que se ha convertido en un problema de Salud Pública, por lo que es necesario que se investiguen nuevas sustancias con la finalidad de eliminar o disminuir el principal agente causal de esta enfermedad, como es el *Streptococcus mutans*. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, en un estudio in vitro. La obtención de los extractos acuosos se realizó por el método de reflujo, utilizando agua destilada como solvente, los extractos se concentraron al 12.5% y al 20%, para lo cual se empleó la fórmula de dilución, la cepa de *Streptococcus mutans* fue reactivada por 24 horas a 35 +/- 2°C, tras lo cual se procedió a sembrar un inóculo de la bacteria correspondiente a la escala 0.5Mc. Farland en 21 cajas Petri de Agar sangre, posteriormente se aplicó la técnica Kirby- Bauer en la que se colocaron los discos de papel filtro embebidos con 20 ul de los extractos, las cajas Petri fueron incubadas por 24 horas a 35 +/- 2 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se procedió a la medición de los halos de inhibición a las 24 horas, observándose un efecto antimicrobiano por la presencia de halos de inhibición de hasta 10 mm. Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba estadística U de Mann Whitney con la que se concluyó que no existieron diferencias significativas entre la media del halo de inhibición del extracto acuoso de cáscara y de semilla al 12.5% (p=0,24) y al 20% (p= 0.94), por lo que estos dos compuestos presentan igual efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*.

PALABRAS CLAVES: EFECTO ANTIMICROBIANO, STREPTOCOCCUS MUTANS, EXTRACTOS DE CACAO.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
SCHOOL OF DENTISTRY

“ANTIMICROBIAL EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS FROM CACAO SHELL AND SEEDS (*Theobroma cacao* L.) ON CEPA DE *Streptococcus mutans*, IN VITRO STUDY”

AUTHOR: Miryan Alexandra Sucuzhañay Mora

TUTOR: Dra. Patricia de LouerdesÁlvarez Velasco

DATE: July 9, 2015

ABSTRACT

Dental caries of most predominant diseases of human being, that has become a public health trouble. New investigations are necessary with other substances in order to eliminate or decrease the main cause agent of such disease *Streptococcus mutans*. The purpose of the current study is assessing the antimicrobial effect of aqueous extract of cacao shell and seed on the strain of *Streptococcus mutans*, in an *in vitro* study. The obtaining of aqueous extracts is made through reflux method, by using distilled water as solvent, with a concentration of 12.5% and 20%, for which a dissolution formula was used, *Streptococcus mutans* strain was activated for 24 hours to 35 +/- 2°C, after which an inoculum of the bacterium under scale 0.5Mc. Farland was planted on 21 Petri boxes of Agar-blood culture. Afterwards, Kirby- Bauer technique was applied, with the placement of filter paper disks embedded with 20 ul of extracts. Petri boxes were incubated for 24 hours at 35 +/- 2 °C in a 5% atmosphere of CO₂ and inhibition halos were measured at 24 hours, with an antimicrobial effect due to the presence of inhibition halos of up to 10 mm. Results obtained were analyzed with Mann Whitney U statistical test, with which it was concluded that no significant differences existed between the half inhibition halo of the shell and seed aqueous extract 12.5% (p=0,24) and 20% (p= 0.94); for which such compounds show a similar antimicrobial effect on *Streptococcus mutans*.

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL EFFECT, STREPTOCOCCUS MUTANS, CACAO EXTRACTS.

INTRODUCCIÓN

La caries dental ha acompañado al hombre desde sus inicios, por ende es muy antigua, al igual que se la considera una de las enfermedades con mayor frecuencia, por tal razón se ha convertido en uno de los problemas de Salud Pública, ya que la misma ha afectado la calidad de vida del hombre. (Henostroza, 2007; Sarmiento, 2010)

Considerada así una enfermedad de etiología multifactorial, por lo que debe existir una interacción entre microorganismos, huésped en un sustrato y tiempo dado, esta se manifiesta con la desintegración y desmineralización de los tejidos calcificados, dado por la acción de microorganismos, como el *Streptococcus mutans*, que gracias a la enzima glucosiltransferasa produce ácido láctico a partir de la sacarosa y glucanos. (Barrancos, 2006; Henostroza, 2007)

Por otro lado a lo largo de los años se han empleado sustancias destinadas a la prevención de enfermedades bucales y dentro de ellas la caries dental, de tal forma que se usan sustancias de origen natural para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, ya sea dirigidas a la inhibición de la glucosiltransferasa, la adhesión celular y el crecimiento celular. Esto dado por la presencia de componentes antimicrobianos como los polifenoles que evitan la formación de placa dental y por ende de caries. (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010)

De modo que se han realizado varios estudios sobre la actividad antimicrobiana de especies vegetales con resultados positivos; como del cacao que a más de ser la materia prima del chocolate también es empleado para curar distintos males asociados a la cavidad bucal, por esta razón el presente estudio se realizó in vitro, para evaluar el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cacao, tanto de la cáscara como de la semilla, sobre la cepa de *Streptococcus mutans*; puesto que muchos estudios demuestran que el cacao inhibe la acción de la glucosiltransferasa y por ende la síntesis de glucanos, esto dado por su alto contenido de polifenoles, como las catequinas. (Matsumoto, y otros, 2004; Lee, Hwang, Kang, Kim, & Lee, 2005; Percival, Devine, Duggal, Chartron, & Marsh, 2006; Cuéllar, 2010)

De acuerdo con los resultados obtenidos cabe mencionar que es recomendable el empleo de dicha especie vegetal como agente antimicrobiano, a más de esto presenta menos efectos adversos, es más barato y de fácil acceso, y al tratarse del cacao se debe considerar que el Ecuador es uno de los grandes productores a nivel mundial.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

A través de los años se han realizado investigaciones en cuanto a la prevención de los males que afectan a la cavidad bucal, entre dichos males se menciona a la caries dental puesto que se considera la enfermedad más frecuente en el hombre y a la vez un proceso patológico que destruye las estructuras que conforman el diente, constituyendo un problema de Salud Pública. (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010)

Por otro lado, siendo la caries un proceso multifactorial, su etiología se debe a la interacción entre bacterias cariogénicas, por tal motivo se considera al *Streptococcus mutans* como un factor principal, de tal forma que dicha bacteria, tras su adherencia y proliferación a la superficie dentaria, produce ácidos que desmineralizan la estructura dentaria y con el tiempo desarrollan la caries dental. (García, Saldaña, & Basterrechea, 2008)

En cuanto a las especies vegetales cabe resaltar que el empleo de las mismas por las comunidades se debe a que la práctica odontológica como tal, no llega a dichos sectores, o simplemente por las condiciones socioeconómicas, puesto que los tratamientos en salud dental refieren ser muy costosos. (Bodero, 2010)

Cabe mencionar que a pesar de nuestro país ser uno de los principales productores de cacao, no contamos con productos que empleen esta planta destinados al área bucal, pese a los componentes antimicrobianos que presenta, por tal motivo se realizó este estudio para evaluar el efecto antimicrobiano de la cáscara y la semilla de cacao sobre el *Streptococcus mutans*.

1.1.1 Formulación del problema

Según varios autores el *Streptococcus mutans* es uno de los principales responsables de la producción de caries, ya sea por su capacidad de formación de polisacáridos extracelulares que forman la placa dental y la formación de ácidos.(Henostroza, 2007)

Algo a considerar es que en el Ecuador existe una gran producción de cacao, que es exportado, sin tomar en cuenta los componentes antimicrobianos que posee, por lo que nuestra investigación se enfocó a evaluar el efecto antimicrobiano del cacao, de tal forma que a largo plazo se pueda utilizar al mismo como materia prima para la elaboración de colutorios, dentífricos o productos destinados a la prevención de la caries, logrando mejorar la calidad de vida de la población. (PRO Ecuador, 2013)

¿Los extractos acuosos de cáscara y semillas de Cacao influyen sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, disminuyendo su acción microbiana?

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1 Objetivo general

- ❖ Evaluar el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre cepa de *Streptococcus mutans* en un estudio realizado in vitro.

1.2.2 Objetivos específicos

- ❖ Indagar los componentes químicos del Cacao (*Theobroma cacao* L.), especialmente sus componentes antimicrobianos.
- ❖ Comprobar la inhibición de la cepa de *Streptococcus mutans* con el extracto acuoso de cáscara de Cacao al 12.5% y al 20%.
- ❖ Comprobar la inhibición de la cepa de *Streptococcus mutans* con el extracto acuoso de semillas de Cacao al 12.5% y al 20%.
- ❖ Comparar cuál de las dos partes del Cacao presenta mayor acción antimicrobiana sobre la cepa de *Streptococcus mutans*.

1.3 JUSTIFICACIÓN

A lo largo de los años se han buscado alternativas para prevenir las enfermedades que han afectado a la cavidad bucal y de manera especial la caries dental, las mismas que no han logrado reducir la caries en la población, puesto que una posible explicación se debe a la falta de colaboración del paciente.

Como una alternativa se ha empleado la fitoterapia, que consiste en el empleo de sustancias vegetales con fines preventivos o terapéuticos, esta es aplicada en varios ámbitos de la salud y en Odontología es empleada en campos como la prevención, destinada a inhibir o disminuir el *Streptococcus mutans*, ya que se ha conocido que el *Streptococcus mutans* es uno de los microorganismos más importantes en la iniciación de la caries. (Gamboa, Herazo, & Martínez, 2004; Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010)

Por otro lado se menciona el uso de las especies vegetales ya que hay más de 100.000 metabolitos secundarios, producidos por las plantas de manera ilimitada y que poseen actividad antimicrobiana, entre ellos los polifenoles y sus derivados como flavonoides, otros como taninos, terpenoides y alcaloides. (Domingo & Lòpez, 2003)

Cabe mencionar que existen “diversos compuestos empleados para el control de la caries dental, utilizando criterios tales como: actividad antimicrobial, actividad anti-glucosiltransferasa, inhibición enzimática y reemplazo de sacarosa por otros edulcorantes”. (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010, pág. 15) .

Por lo que en este estudio se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto acuoso tanto de la cáscara como de las semilla de cacao sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, puesto que “En las semillas del cacao se encuentran un total de 13.5 g/ 100 g de compuestos fenólicos, los flavonoides son los más abundantes entre los que se destacan las catequinas, epicatequinas, antocianidinas, y procianidinas.”(Gil, 2010, pág. 361). Además la cáscara de cacao presenta dos acciones: una acción antibacteriana y una acción anti-glucosiltransferasa. (Kyoung-Heon, y otros, 2004)

De esta forma se realizó este estudio in vitro ya que uno de los objetivos de la Odontología será descubrir nuevas sustancias con la capacidad de inhibir o minorar los microorganismos que causan afecciones en la boca. Y desde otro punto de vista se pretende que las poblaciones con recursos económicos muy bajos puedan acceder a los beneficios de las plantas medicinales que se encuentran a su alcance como el cacao y en este caso obtener un beneficio en su salud bucal,

finalmente se podrá crear productos de uso odontológico en base a extractos de cacao. (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010)

1.4 HIPÓTESIS

¿Los extractos acuosos de cáscara y semillas de Cacao presentan igual efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*?

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2. ANTECEDENTES

Las especies vegetales han acompañado al hombre desde su aparición en la tierra, puesto que han sido usadas como alimento, vestimenta, vivienda y sobre todo eran usadas como medio curativo para aliviar algunos males, de tal forma que el hombre desde sus inicios, usó las plantas medicinales, en el ámbito de la salud, así entre las principales culturas que aportaron en el empleo de plantas fueron: China, Egipcia, Griega, Azteca, Aymara, Quechua, Maya. Por otro lado existieron escritos sobre las plantas con poder medicinal desde hace 3000 años a.c, de ese modo se empezó con la fitoterapia. (Cañigüeral, 2003; Vásquez, Martínez, M, & Aguilar, 2011).

Cuando Colón llegó a América, se fascinó con los conocimientos que poseían los curanderos, en cuanto al uso de plantas medicinales, de esta forma en Ecuador, la aplicación de las especies vegetales, tuvo sus raíces hace más de 10.000 años, se continuó en los tiempos coloniales y republicanos y se mantuvo por los indios, mestizos y montubios, así en la época prehispánica se conocieron 40 especies de plantas medicinales. (Cañigüeral, 2003; Ministerio de Relaciones Exteriores, 2011)

En cuanto al empleo del cacao a lo largo de la historia, fueron los Mayas los que empezaron a cultivarlo y a consumirlo, hace 400 años a.c, se conoció que dicho pueblo usaban las semillas como monedas y el cacao era consumido sólo por personas de estrato social alto, por otro lado Colón en Nicaragua en 1502 fue el primero en degustar el sabor del cacao y luego se convirtió en una de las bebidas más especiales de las cortes españolas con el nombre de “xocoatl”. En el Ecuador en el siglo XIX, el cacao fue conocido como la “Pepa de oro”, se cultivaba en las zonas de Daule y Babahoyo y luego se lo llevaba al puerto de Guayaquil para exportarlo. (Ministerio de Relaciones Exteriores, 2011; Organización Internacional del Cacao, 2011; PRO Ecuador, 2013)

Por otro lado, con el tiempo, de los vegetales se empezaron a utilizar los extractos vegetales, que consistieron en concentrados, obtenidos con solventes como el agua, etanol o éter; constituidos por una mezcla de principios activos, y de sustancias inertes que se producían de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca. Esas plantas se han empleado en el ámbito de la salud y su aplicación en la Odontología no ha pasado por alto. (De la Torre, Navarrete, Muriel M, Macía, & Balsler, 2008; Boderó, 2010)

De tal manera que la Odontología se encargó de tratar afecciones de la cavidad bucal como la caries dental, que desde sus inicios fue una de las más frecuentes, considerada una patología de etiología multifactorial, debido a una relación entre microorganismos, huésped, sustrato y un período de tiempo. En cuanto a los microorganismos se conoció al *Streptococcus mutans* como uno de los microorganismos causantes de la caries. (Ccahuana, Ferreira, Koga, & Cardoso, 2007; Negroni M. , 2009)

Por tal razón, se han realizado varios estudios para evaluar las propiedades antimicrobianas de ciertas plantas en especial sus propiedades anticariogénicas, en este caso se han reportado estudios del cacao como los que se mencionan a continuación:

Ooshima y col. en el 2000 llevaron a cabo un estudio in vitro, en el cual evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos acuosos de etanol de la cáscara de cacao, en porcentajes del 30% y del 50%, los extractos fueron aplicados en ratas infectadas con *Streptococcus mutans* y encontraron como resultado una reducción de la caries en los roedores. (Ooshima, y otros, 2000)

También Matsumoto y col. en el 2004 realizaron un extracto etanólico de la cáscara de cacao al 1% y evaluaron su acción antiplaca en un estudio in vitro e in vivo, en el estudio in vitro encontraron una inhibición de la adhesión del *Streptococcus mutans* MT8148 a la hidroxiapatita, al igual que una reducción del número de *Streptococcus mutans* al someter a la placa dental de 22 niños al extracto de cáscara de cacao. Con respecto al estudio in vivo dicho extracto fue aplicado como un enjuague bucal en 28 personas de 19 a 29 años de edad por cuatro días, tras los cuales se obtuvo como respuesta una gran reducción de *Streptococcus mutans* en la placa dental de las personas, de modo que concluyeron que este extracto podría ser utilizado en la prevención de la caries dental. (Matsumoto, y otros, 2004)

Por otro lado Rosas en el 2009 llevó a cabo un estudio in vitro con cuatro derivados del cacao como manteca de cacao, chocolate sin azúcar, chocolate azucarado y cacao en polvo, con los cuales pretendió comprobar la acción antimicrobiana de los mismos sobre el *Streptococcus mutans*, para lo cual realizó extractos acuosos de cada uno de los derivados y colocó discos de papel embebidos en los extractos sobre las placas Petri que contenían *Streptococcus mutans*. Encontró como resultado que todos los derivados presentaron efecto antimicrobiano, pero la manteca de cacao fue el derivado con mayor acción, esto se comprobó con el gran halo de inhibición de 15 mm que mostró dicho derivado sobre la cepa del *Streptococcus mutans*, seguido del cacao en polvo con un halo de 8 mm. (Rosas, 2009)

Cabe mencionar que en el mismo año Cuéllar realizó un estudio in vitro en el que empleó un extracto etanol:agua (etanólico) de la cáscara del grano de cacao como un agente antimicrobiano sobre microorganismos Gram negativos y Gram positivos como “*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus agalactiae* y sobre un hongo como *Candida albicans* ATCC 10231” para lo cual realizó un extracto etanólico de la cáscara de cacao en concentraciones de 100%, 50% y 25%, y embebió discos de papel con el extracto y los colocó sobre las placas Petri que contenían los microorganismos mencionados, obtuvo como resultado que la cáscara de cacao resultó efectiva frente a *Bacillus cereus* y *Streptococcus agalactiae*. (Cuéllar, 2010, pág. 13)

Mientras que Mariani y col. en el 2010 hicieron una investigación para comprobar el “Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el *Streptococcus mutans* in vitro”, para lo cual utilizó cepas puras de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, que sometió a concentraciones de extractos acuosos de cacao entre 0% y 17.5%, de igual forma se colocaron discos de papel impregnados con el extracto sobre las cajas Petri que contenían el *Streptococcus mutans* luego de una incubación de 24 horas los resultados demostraron que “... el mayor efecto inhibitorio se logró en concentraciones de 10% y 12,5%. Por lo tanto pudo concluirse que el extracto de semillas de Cacao inhibe significativamente el crecimiento y desarrollo de una de las principales bacterias cariogénicas.” (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010, pág. 15)

Finalmente Venkatesh y col. en el 2011 realizaron un estudio comparativo, en el cual evaluaron la acción antimicrobiana del enjuague bucal con clorhexidina al 0.2% versus un enjuague bucal de extracto acuoso de cáscara de cacao al 0.1%, este estudio lo realizaron en 50 niños, dividiéndolos de tal forma que 25 emplearon el enjuague bucal con clorhexidina al 0.2% y los otros 25 usaron el extracto de cáscara de cacao, los resultados fueron evaluados a los 7 días, al mes y a los 2 meses, en los cuales se recolectó saliva y se hicieron recuentos de *Streptococcus mutans*, en donde se observó una gran reducción del microorganismo y al realizar los análisis estadísticos se evidenció que no existieron diferencias significativas, por lo que recomendaron el uso del extracto de cáscara de cacao, como una alternativa en la prevención de caries dental. (Venkatesh, Vivek, & Ambika, 2011)

2.1 Caries

La caries dental ha afectado históricamente con mayor frecuencia la cavidad oral, la misma que se considera una enfermedad infecciosa multifactorial, consistiendo en un desequilibrio del proceso de desmineralización y remineralización, esto dado por el metabolismo bacteriano sobre el diente, el mismo que con el tiempo produce la pérdida de minerales que conlleva a la cavitación. (Bönecker & Cleaton, 2003; Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013)

2.1.1 Fisiopatología de la caries dental

2.1.1.1 Primera etapa

Trata acerca de la unión del microorganismo al esmalte, que es posible gracias a las interacciones “entre la proteína antígeno de superficie (SA), también denominada PAc y las proteínas salivales que constituyen la película adquirida”. (Roa & Rodriguez, 2013, pág. 62)

Dicha película adquirida consiste en una delgada capa formada por proteínas localizadas sobre la superficie dentaria. (Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013)

2.1.1.2 Segunda etapa

Se da por la acumulación de los microorganismos dando lugar a la formación de la biopelícula, dado por la producción de glucosiltransferasas, que a partir de la sacarosa sintetizan glucanos, también se mencionan a las proteínas fijadoras de glucanos, todo esto permite la adhesión de los microorganismos al diente. (Roa & Rodriguez, 2013)

2.1.1.3 Tercera etapa

Tras la adhesión y con la producción de ácido láctico, ocurre la desmineralización y posteriormente la cavitación del esmalte dental. (Bönecker, Abanto, Pires, De Horossi, & Guedes, 2014)

2.1.2 Factores etiológicos

Según Henostroza se debe a tres principales factores como son Huésped, Microorganismos y Sustrato que interactúan entre ellos y es conocido como la triada de Keyes. (Henostroza, 2007)

2.1.2.1 Huésped

Al hablar de Huésped se hace énfasis en la saliva y en el diente.

Saliva:

En su composición se encuentran proteínas, enzimas, agentes buffer que neutralizan los ácidos producidos en la placa bacteriana, glicoproteínas, a más de presentar péptidos como la beta defensina, calcio, fosfatos y flúor, este último actúa en el proceso de remineralización, con la formación de fluorapatita. También cabe mencionar su función de autolimpieza. (Duque de Estrada, Pérez, & Hidalgo, 2006)

Diente:

En las que abarca particularidades como la permeabilidad adamantina que disminuye con la edad, también la anatomía juega un papel importante ya que la disposición en la arcada puede influir en la acumulación de placa bacteriana. (Henostroza, 2007)

2.1.2.2 Microorganismos

Entre los microorganismos relacionados a la caries dental se encuentra el *Streptococcus mutans*, al mismo que se lo analizará posteriormente. (Henostroza, 2007)

2.1.2.3 Sustrato (dieta)

Hace referencia al consumo de carbohidratos, puesto que aporta con energía y nutrientes para la colonización, crecimiento y desarrollo de los microorganismos sobre los dientes. De tal forma que los azúcares de la dieta son metabolizados por los microorganismos, principalmente la sacarosa o azúcar común que dan como resultado ácidos, como el láctico. Por otro lado el *Streptococcus mutans* emplea la sacarosa que resulta de la unión de fructosa mas glucosa, para obtener un polisacárido extracelular que permite la adhesión de la bacteria a la superficie dentaria, denominado glucano. Se considera además que los monosacáridos y disacáridos son los hidratos de carbono más cariogénicos, debido a que la sacarosa, glucosa, fructosa y lactosa tienen la capacidad de metabolizar ácidos que disminuyen el pH, hasta causar la desmineralización. (Barbería, 2005; Duque de Estrada, Pérez, & Hidalgo, 2006; Negroni M. , 2009)

Los factores ya mencionados no son suficientes para producir una lesión cariosa, estos necesitan de otro factor etiológico como es el tiempo.

2.1.2.4 Tiempo

Para que se desarrolle la caries, se necesita de la interacción de los factores primarios y su permanencia en un determinado tiempo. (Negroni M. , 2009)

Sin embargo existen otros factores adicionales a los factores etiológicos primarios mencionados, como son: Edad, salud general, grado de instrucción, nivel socioeconómico,

experiencia pasada de caries, grupo epidemiológico y variables de comportamiento. (Henostroza, 2007; Bonecker, Abanto, Pires, De Horossi, & Guedes, 2014)

2.1.3 Biofilm dental

Denominada también placa dentobacteriana, es considerada una masa blanda y adherente de colonias bacterianas en la superficie dentaria, abarcando otras superficies como la encía o lengua. La presencia de biofilm dental se relaciona con la enfermedad periodontal y la caries dental. (Baca, 2005; Enrile de Rojas & Fuenmayor, 2009)

2.1.3.1 Formación del biofilm

El *Streptococcus mutans* “presenta tres antígenos importantes en la formación de la biopelícula: las glucosiltransferasas (GTF), la proteína de adhesión celular (PAC) y las proteínas fijadoras de glucanos (GBP)” (Gómez & Barrietos, 2013, pág. 73)

Los mismos que actúan de la siguiente manera en la colonización de microorganismos al diente:

- La adhesión inicial de los microorganismos al diente esta dado por la proteína de adhesión celular o PAC.
- La unión irreversible de los microorganismos a la superficie del diente se da por las GTF, que se presentan en tres tipos, desempeñando un papel muy importante en la formación del biofilm, de tal forma que:
 - La Gtf C se adsorbe en la película adquirida
 - la Gtf B se une a otros microorganismos
 - La Gtf D sintetiza un polisacárido soluble, que activa a la Gtf B. (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013)
- Mientras que las encargadas de la coagregación bacteriana esta mediada por las GBP (proteínas fijadoras de glucanos). (Gómez & Barrietos, 2013)

2.1.3.2 Clasificación del biofilm

Esta clasificación se encuentra dada en relación a la encía, de tal forma que tenemos:

2.1.3.2.1 Placa supragingival

Se localiza en superficies lisas y sobre todo retentivas en donde la limpieza se dificulta como el margen gingival, espacios interproximales y en fosas y fisuras de las caras oclusales. (Enrile de Rojas & Fuenmayor, 2009)

2.1.3.2.2 Placa subgingival

Esta placa es característica de la enfermedad periodontal ya que esta se localiza en el surco gingival, causando la aparición de bolsas periodontales. (Enrile de Rojas & Fuenmayor, 2009)

2.1.3.3 Composición del biofilm

En su composición abarca principalmente bacterias y una matriz intracelular, localizada entre las colonias bacterianas. Así la matriz interbacteriana se compone de proteínas, polisacáridos extracelulares como glucanos y fructanos. (Hernández, 2011)

Por otro lado Barrancos menciona que “Los productos extracelulares de origen bacteriano constituyen cerca de la mitad de la matriz de la placa”. (Barrancos, 2006, pág. 383)

2.2 Streptococcus mutans

2.2.1 Definición

El Streptococcus mutans es uno de los microorganismos asociados a la caries dental, fue aislado por primera vez por Clarke en 1924, mientras analizaba dentina cariada. (Negroni M. , 2009).

Se caracteriza por ser Gram positivo, anaerobio facultativo que forman parte de la placa bacteriana, también se caracteriza por ser acidófilo, acidogénico y acidúrico, además tiene la capacidad de generar polisacáridos extracelulares y por ende favorecer la adhesión del mismo a las piezas dentales. (Sarmiento, 2010; Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013)

Produce ácido láctico, propiónico, acético y fórmico al metabolizar la sacarosa, glucosa y fructosa, de tal forma que los mencionados ácidos circulan por la placa dental hasta el esmalte poroso, en donde liberan hidrogeniones, que disuelven el mineral del esmalte, formando calcio y fósforo que salen del esmalte, todo esto denominado como desmineralización. (Gualli, 2014)

El grupo Mutans se subclasifica basándose ya sea en propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas, de tal forma que tenemos 7 especies:

- S. mutans
- S. rattus
- S. cricetus
- S. sobrinus
- S. ferus
- S. downei
- S. macacae

Y serotipos como el c, e, f y k, siendo el serotipo c el más predominante en la cavidad oral del hombre más que las otras cepas. (Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013; Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013).

2.2.2 Estructura del Streptococcus mutans

Presenta en su estructura:

- Núcleoide
- Citoplasma
- Membrana citoplasmática
- Mureína
- Ácidos teicoicos y lipoteicoicos:

Los ácidos teicoicos desempeñan un papel antigénico y los lipoteicoicos actúan en la adhesión, debido a que estos también permiten unirse a la fibronectina del huésped. Además poseen una alta carga eléctrica, (Barrancos, 2006; Negroni M. , 2009)

De manera que los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las bacterias “interactúan con componentes de carga negativa del hospedero como los iones hidrógeno o las uniones hidrofílicas”. (Espinoza, Yáñez, Cedillo, Katz, & Michalek, 2004, pág. 138)

- Carbohidratos parietales:

Actúan en la adhesión, agregación y coagregación bacteriana. (Rojas, 2011)

- Proteínas parietales:

Tienen acción enzimática como glucosil y fructosiltransferasas, como adhesinas, como fijadores de la película adquirida y como receptores de los glucanos. (Rojas, 2011)

- Fimbrias:

Actúan en la adhesión a la superficie dental, a la agregación y coagregación entre las bacterias, las fimbrias se encuentran cubiertas por proteína M y ácido teicoico. (Negroni M. , 2009)

- Cápsula:

Presenta como componentes ácido hialurónico o polisacáridos, se presenta más en cultivos jóvenes y actúan en la fagocitosis. (Rojas, 2011)

- Glicocálix:

Se encuentra formado por glucanos y fructanos importantes en la formación de placa dentobacteriana. (Aricapa, 2009)

2.2.3 Factores de virulencia

2.2.3.1 Acidogenicidad

Es la capacidad de fermentar azúcares de la dieta como la sacarosa y dar como resultado ácidos, como el ácido láctico en mayor cantidad, seguido del ácido fórmico y acético, causando la desmineralización del esmalte, por alcanzar un pH de 4,5-5,5. (Aricapa, 2009; Negroni M. , 2009)

2.2.3.2 Aciduricidad

Denominada a la propiedad de producir ácido en medios con pH bajo. (Hernández, 2011)

2.2.3.3 Acidofilicidad

Factor que permite al microorganismo sobrevivir en el medio ácido, esta propiedad le permite desarrollarse en un pH bajo, esto se da ya que el *Streptococcus mutans* bombea protones (H⁺) al exterior de la célula, esta condición hace que el microorganismo cambie su fisiología. (Negroni M. , 2009; Hernández, 2011),

2.2.3.4 Síntesis de glucanos y fructanos

Por medio de la glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), que son enzimas que permiten obtener glucano y fructano de la sacarosa, dichos glucanos dan lugar a la acumulación de bacterias y la formación de una matriz extracelular de polisacáridos. (Sarmiento, 2010)

2.2.3.5 Síntesis de polisacáridos Intracelulares

Como el glucógeno, que sirve de nutriente para los microorganismos, al igual que la producción de ácidos, esta síntesis actúa frente a los escasos de azúcares obtenidos por vía exógena. (Sarmiento, 2010)

2.2.3.6 Producción de dextranasas

Las dextranasas se consideran enzimas capaces de metabolizar los polisacáridos extracelulares y por ende producir ácido. Estas se encuentran en la superficie de las bacterias, de tal forma que dichos polisacáridos extracelulares se usan como fuente de energía por las mismas, además regula la acción de las glucosiltransferasas. (Duque de Estrada, Pérez, & Hidalgo, 2006; Hernández, 2011)

2.2.3.7 Proteínas de Adhesión Celular (PAC)

Son proteínas que están en la pared del *Streptococcus mutans*, dan lugar en primera instancia a la adhesión del mismo al diente. (Sarmiento, 2010; Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013)

2.2.3.8 Glucosiltransferasas

Son proteínas enzimáticas o enzimas extracelulares que juegan un papel importante en el desarrollo de la placa dental, debido a que forman sitios en el esmalte para la colonización de microorganismos, ya que produce glucanos, también forma una matriz insoluble para formar placa dental. (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013; Gómez & Barrietos, 2013)

Cabe mencionar que el *Streptococcus mutans* secreta tres tipos de glucosiltransferasas:

- GTF-B que sintetiza glucanos insolubles
- GTF-C que sintetiza glucanos solubles e insolubles
- GTF-D que sintetiza glucanos solubles en agua. (Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013)

Dichas enzimas “interactúan en los sitios de ramificaciones sobre las moléculas de glucanos individuales”. (Barrancos, 2006, pág. 383)

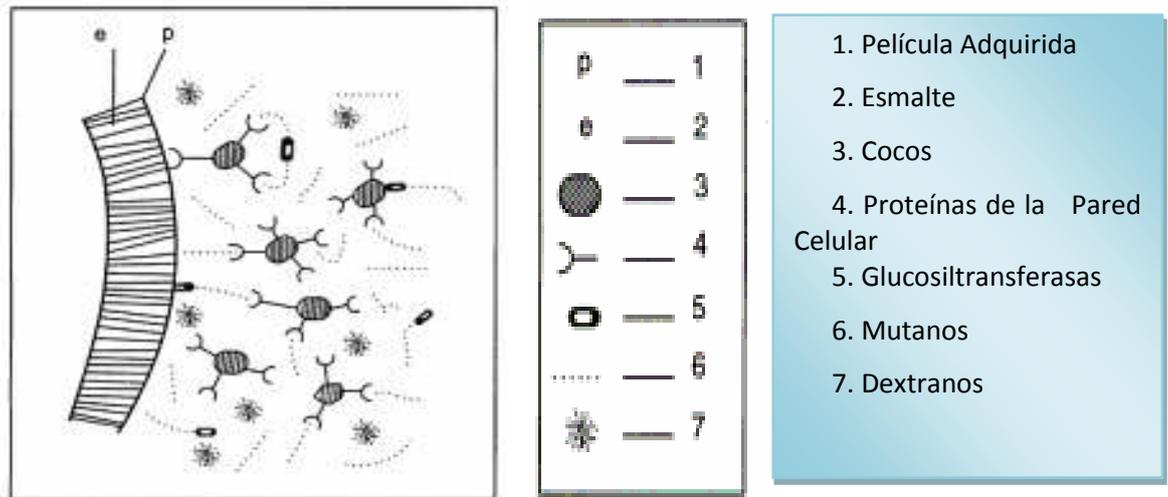


Figura 1. Adhesión por polisacáridos extracelulares.

Fuente: Microbiología Estomatológica “Fundamentos y Guía Práctica”, Negroni, 2009, pág.

232

Este polipéptido se encuentra constituido por 3 partes:

1. Región N terminal: Cuya función es la secreción de la enzima.
2. Dominio Catalítico: O dominio SB, es encargado de fijar e hidrolizar a sacarosa.
3. Región C terminal: Denominada también Dominio de unión a glucanos o GLU, encargada de unir los glucanos sintetizados, considerada básica para el proceso de adhesión. (Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013)

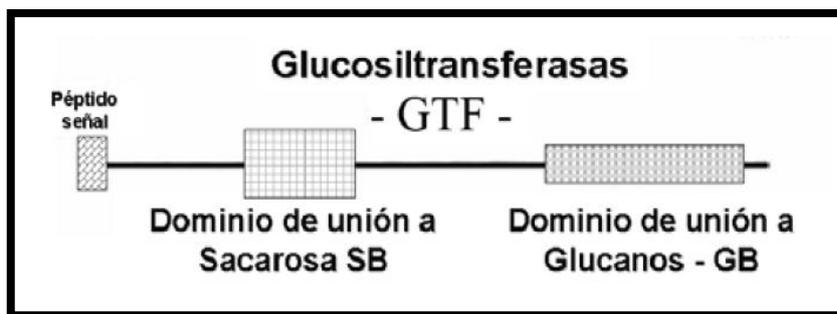


Figura 2. Estructura de la Glucosiltransferasa.

Fuente: Revista CES Odont, Chamorro y col, 2013, pág. 88

De tal manera que cualquier sustancia que sea capaz de inactivar o alterar el dominio SB o el dominio GLU, disminuye la cariogenicidad, puesto que se inhibe la acción de la enzima glucosiltransferasa. (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010)

2.2.3.9 Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs)

Son proteínas extracelulares que se encargan de unir los glucanos, y participar en el proceso de formación de la placa dental cohesiva. (Aricapa, 2009)

2.3 Cacao (*Theobroma cacao* L.)

2.3.1 Definición

Es originario de las selvas del Amazonas, cacao viene de la palabra maya “Ka'kaw”. Pertenece a la familia Malvaceae, al género *Theobroma*, que significa el “alimento de los dioses”, a la especie *Theobroma cacao* L, tiene 22 especies descritas, ubicadas principalmente en Sudamérica y partes de Centroamérica. (Nisao, 2007; Cuéllar, 2010; Sánchez, 2011)

Las semillas del cacao son consideradas la materia prima para las industrias debido a que “se obtienen productos semielaborados como, pasta de cacao, cacao en polvo y manteca de cacao” (Sánchez, 2011, pág. 13), dicha pasta de cacao al igual que la cáscara de cacao son empleados como alimento de animales o en la jabonería.

2.3.2 Descripción Botánica

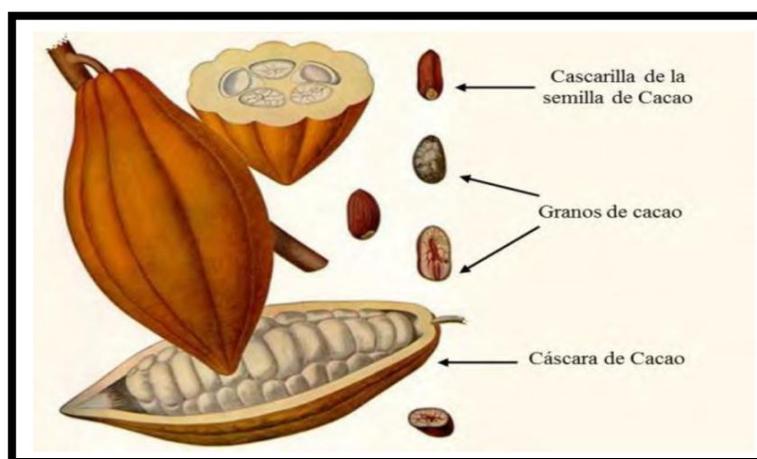


Figura 3. Partes de la mazorca de cacao

Fuente: The Science of Chocolate, Beckett, 2008, pág. 41

2.3.2.1 Tronco

Se caracteriza por ser leñoso, de crecimiento vertical que puede alcanzar 1 a 2 metros de altura a la edad de 12 a 18 meses, ya que a los 18 meses su crecimiento se interrumpe. De tal forma que desaparece la yema terminal y de esta emergen de 3 a 5 ramas laterales. (Estrada, Romero, & Moreno, 2011; Sánchez, 2011)

2.3.2.2 Hojas

Son verdes con una morfología variada, que van de lanceoladas a casi ovaladas. (Estrada, Romero, & Moreno, 2011)

2.3.2.3 Flor

Se caracteriza por poseer cinco pétalos, sépalos, estambres y un pistilo, cabe mencionar que solo el 10% de las flores polinizadas, se transforman en mazorcas. (Sánchez, 2011)

2.3.2.4 Fruto

Es la denominada mazorca, cuando está madura pesa casi 450 g, presenta de 7 a 12 cm de anchura y 15 a 30 cm de largo. En su interior contiene de 30 a 40 semillas. (Sánchez, 2011)

2.3.2.5 Semillas

Se les denomina también “granos” o “habas”, se encuentran rodeadas de una pulpa mucilaginoso, miden de 2 a 3 cm de largo. Se conservan de 18 a 30 °C y con humedad del 100%. Esta semilla presenta una cáscara que es separada luego del proceso de tostado, la cáscara representa un problema en la industria del chocolate puesto que este desecho se produce en altas cantidades y es difícil eliminarla convirtiéndose en un contaminante ambiental. (Cuéllar, 2010; Sánchez, 2011)

2.3.3 Tipos de cacao

Presenta tres tipos de cacao:

2.3.3.1 Criollo

Este cacao, se cultiva poco, presenta mejor calidad para elaborar finos chocolates. Se caracteriza por tener mazorcas de color rojo y alargadas, con pronunciados surcos, sus cotiledones o semillas son de color blanco, la cáscara es muy fácil de cortar puesto que es muy delgada, presenta un color anaranjado. (Nisao, 2007; Sánchez, 2011)

2.3.3.2 Forastero

T. cacao *Sphaerocarpum*, se caracteriza por presentar frutos de forma redonda, sin muchos surcos, el color de los cotiledones es púrpura, al igual que el criollo las mazorcas son anaranjadas, pero su cáscara ya es muy gruesa por ende difícil de cortar, en el Ecuador este tipo de cacao es conocido como Nacional o Fino de aroma, por lo que se emplea en la elaboración de chocolates finos. (Sánchez, 2011; PRO Ecuador, 2013)

2.3.3.3 Trinitario

Resulta del cruce de los dos anteriores. “por lo que combina la robustez del forastero y el sabor delicado del cacao criollo”. (Sánchez, 2011, pág. 15), en el Ecuador este es conocido como cacao CCN51. (PRO Ecuador, 2013)

2.3.4 Usos medicinales del cacao

Los Kichwas de Sucumbíos y Orellana emplean el fruto para tratar tumoraciones de la piel, mientras que la resina obtenida de la cáscara es empleada en las heridas como cicatrizante para mordeduras de serpiente, por otro lado las semillas se usan para detener hemorragias, curar la anemia y la fiebre. (De la Torre, Navarrete, Muriel M, Macía, & Balsler, 2008)

En nuestro país la manteca de cacao es empleada para curar quemaduras, resequedad en la piel, sarampión, fiebre, reumatismo y es conocida por su propiedad antiséptica. (Corporacion de Promocion de Exportaciones, 2009)

A los flavonoides del cacao se le atribuyen efectos antioxidantes, debido a que reducen el riesgo de mortalidad por enfermedades coronarias, pueden también prevenir el cáncer, por la capacidad de controlar las reacciones de oxidación de LDL o daños de ADN. (Maydata, 2002; Paredes Salido & Clemente Fernandez, 2005)

Esto coincide con Sánchez y col, pues aseguran que el cacao es rico en flavonoides y que poseen propiedades antioxidantes, por lo que una alimentación rica en cacao repercute favorablemente en el tratamiento de la enfermedad periodontal, ya que este suprime el estrés oxidativo de las lesiones peiodontales. Y de manera especial se le atribuye un papel anticariogénico ya que inhibe la glucosiltransferasa del *Streptococcus mutans*, impidiendo el proceso de adhesión. (Sanchez & Rubio, 2010; Torres, 2012)

2.3.5 Componentes del cacao

2.3.5.1 Polifenoles

Los polifenoles se refieren a moléculas heterogéneas, que se caracterizan por poseer en su estructura grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (OH), las mismas que contribuyen al ataque de microorganismos que pueden invadir la planta de cacao. (Sanchez & Rubio, 2010)

El cacao presenta gran porcentaje de polifenoles, especialmente de tipo flavonoide que son los más importantes, como son procianidinas, catequinas y epicatequinas. Cabe mencionar que existen otros polifenoles presentes en el cacao en menor proporción como la quercetina, isoquercitrina, hiperosida, naringenina, luteolina y apigenina. (Maydata, 2002; Sanchez & Rubio, 2010; Cuéllar, 2010)

2.3.5.1.2 Flavonoides

Se caracterizan por presentar una estructura de 3 anillos, que comprenden 2 anillos aromáticos y un heterociclo oxigenado central. (Cuéllar, 2010)

Así varios autores coincidieron en que el cacao presenta flavonoides como la epicatequina, también mencionaron la presencia de catequina y procianidina, además señalan que la epicatequina en el cacao se presenta en mayor porcentaje, correspondiente al 92%, equivalente a una proporción 11:1 más que la catequina. (Rawel & Kulling, 2007; Cuéllar, 2010)

Las epicatequinas y catequinas representan las bases estructurales para la formación de procianidinas, las mismas que se forman por la acción de la enzima polifenoloxidasas, que une de 2 a 10 unidades de epicatequinas, de modo que las procianidinas que presentan más de 6 unidades son poco absorbidas pues tienen dificultad en atravesar las membranas celulares. Además a las epicatequinas del cacao se le atribuye la acción “anti-glucosiltransferasa”. (Kyoung-Heon K, 2004)

Por otro lado, al someter los granos de cacao a elevadas temperaturas, se lleva a cabo un proceso de epimerización, que consiste en la transformación de epicatequinas en catequinas. (Kofink M, 2007)

Catequinas

Las catequinas son flavonoides que se caracterizan por presentar un elevado peso molecular, son sólidos a temperatura ambiente, presentan puntos de fusión altos y se disuelven con facilidad en solventes polares. Son las responsables de dar el color morado a las semillas del cacao. (Cala & Vásquez, 2008; Cuéllar, 2010)

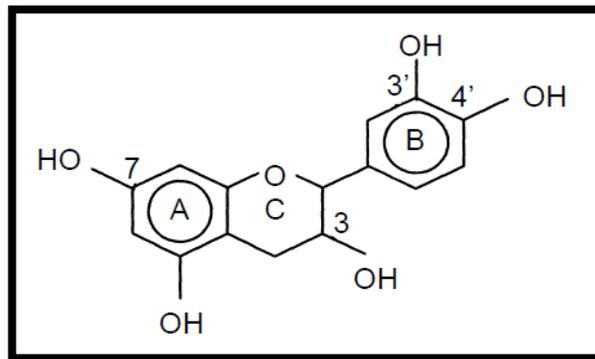


Figura 4. Catequina

Fuente: Los flavonoides, Martínez-Flores y col, 2002, pág. 273.

Es muy importante considerar que los granos de cacao no fermentados son ricos en flavonoides, como epicatequinas y catequinas, que comprenden del 12 al 18% del peso seco del grano entero, ya que tras la fermentación estos componentes sufren reacciones de oxidación y polimerización disminuyendo su contenido. (Torres, 2012)

2.3.5.2 Alcaloides del cacao

Presentan como tales a la Thebromina, encargada del sabor amargo del cacao, cafeína y teofilina, esta última está presente en una mínima cantidad. (Cuéllar, 2010)

2.3.6 Mecanismo de acción de los polifenoles del cacao sobre el *Streptococcus mutans*

Se debe a una inhibición de la enzima glucosiltransferasa, en cuanto a esto cabe mencionar que “Toda interferencia en la actividad del sistema glucosiltransferasas (GTFS) incidiría en la adherencia microbiana, afectando el avance del proceso patológico” en este caso afectando al avance de la caries dental. (Bojanich, y otros, 2003, pág. 227)

Se presume que el efecto antimicrobiano está dado por la presencia en mayor cantidad de los grupos hidroxilo, otra explicación de la inhibición en la adherencia se debería a que los polifenoles producirían una hidrofobicidad en la superficie del *Streptococcus mutans*. (Domingo & Lòpez, 2003; Matsumoto, y otros, 2004; Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013)

Por otro lado los flavonoides lipofílicos como las catequinas pueden alterar la estructura de la membrana celular del *Streptococcus mutans*, por lo que inactivan y bloquean su función. (Domingo & Lòpez, 2003; Araujo & Salas, 2008).

A más de esto se le atribuye la acción antiglicosiltransferasa a los ácidos grasos insaturados como el oleico y linoleico presentes en la cáscara de cacao, esto se explica por la “unión entre la película salival y el extremo carboxilo polar del ácido graso, dejando los extremos libres apolares” de esta manera evitando la adhesión de bacterias a dicha película. (Matsumoto, y otros, 2004, pág. 252)

Otros autores mencionan que la actividad antimicrobiana del cacao, está dada por el bloqueo de la enzima glucosiltransferasa, debido a la acción de los polifenoles del cacao sobre los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos que conforman dicha enzima, de modo que se forman complejos que alteran una de las regiones que constituyen la enzima, bloqueando su acción. Cabe mencionar que este mecanismo de acción es en el que se basan los investigadores para la creación de la vacuna contra la caries. (Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013; Gómez & Barrietos, 2013)

2.4 Extractos Vegetales

Se conoce como extracto vegetal al producto líquido que se obtiene de diferentes partes de las plantas, para lo cual se emplean varios procedimientos físicos y químicos al igual que diferentes solventes, así el agua es el más utilizado en la elaboración de productos fitoterapéuticos. (Sharapin, 2000; Cañigüeral, 2003; Soto & Jose, 2012)

Los mismos que se clasifican de acuerdo a su consistencia en:

- Fluidos: se caracterizan por ser líquidos.
- Blandos: son semisólidos, con un 60% de agua.
- Secos: son sólidos, en forma de polvo.

En cuanto al extracto acuoso hay que referirse como al porcentaje en masa que se disuelve en el agua. (Soto & Jose, 2012)

2.5 Agentes antimicrobianos

Se consideran a las sustancias que impiden el crecimiento o favorecen la muerte de un microorganismo, controlando la presencia del mismo.

De manera que existen muchos agentes antimicrobianos, encargados de controlar los microorganismos bucales asociados a la formación de la placa dental, entre los cuales se mencionan a los antibióticos y a los extractos vegetales, considerando que la acción de dichos agentes antimicrobianos en la prevención de la caries resulta eficiente con la ayuda de un correcto control mecánico de la biopelícula, como es el cepillado dental. (Palmier, 2009; Thaweboon, 2009; Boderó, 2010)

De forma que el agente antimicrobiano de elección en la caries dental es aquel que presenta una acción directa sobre el mecanismo de adhesión o sobre el metabolismo bacteriano del microorganismo. (Negroni M. , 2009)

Por lo que investigar nuevas plantas con actividades antimicrobianas, hace que se fomente la industria farmacéutica natural, de modo que se puedan obtener actividades terapéuticas de la naturaleza, que en la actualidad tiene mucha acogida. (Araujo & Salas, 2008)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación fue de tipo descriptiva transversal debido a que se describieron los hallazgos que se encontraron en el mismo en un período de tiempo corto. A más de esto fue descriptivo bibliográfico, puesto que se hizo una revisión de textos, artículos científicos y antecedentes investigativos, en los que se buscaron información que aportaron con la misma.

Fue analítica porque permitió analizar los tiempos en los que se emplearon las diferentes especies vegetales, desde los tiempos más remotos hasta la actualidad, a más de esto permitió analizar los diferentes componentes que presentan las mismas y cómo estos influyen en la acción antimicrobiana.

Fue de tipo experimental - in vitro, ya que se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, en la misma que se procedió a obtener el extracto acuoso de cacao, al igual que se realizaron los cultivos de las cepas de Streptococcus mutans, obtenidas en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas, ya mencionado.

Finalmente se realizó un análisis comparativo con los resultados que se encontraron, es decir se valoró cuál de las dos partes del Cacao presentó mayor efecto antimicrobiano.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población: 23 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus mutans ATCC 25175.

Muestra: 21 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus mutans ATCC 25175.

3.2.1 Criterios de inclusión

Cajas Petri de Streptococcus mutans ATCC 25175 no contaminadas.

3.2.2 Criterios de exclusión

Cajas Petri de Streptococcus mutans ATCC 25175 que hayan sufrido contaminaciones durante el procedimiento.

3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

	VARIABLES	DEFINICIÓN	DETERMINANTES	INDICADORES	ESCALA
INDEPENDIENTE	Extractos acuosos	Es el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con un solvente como el agua destilada.	Planta natural (polvo de cacao) más el solvente (agua destilada)	Concentración del extracto acuoso al 12.5% y al 20%	Nominal
	Cáscara de cacao	Principal desecho de la industria de chocolate, representa el 10% por cada tonelada de semilla seca	Polvo de cáscara de cacao Forastero al 12.5% y 20%	Concentración del extracto acuoso de cáscara de cacao al 12.5% y al 20%	Nominal
	Semilla de cacao	Son granos aplanados y sabor amargo, están dentro de la pulpa y el color puede ser café o pardo.	Polvo de semilla de cacao Forastero al 12.5% y 20%	Concentración de extractos acuosos de semilla de cacao al 12.5% y al 20%	Nominal
DEPENDIENTE	Streptococcus Mutans	Es uno de los microorganismos cariogénicos, coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, productor rápido de ácido láctico, cambia un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas	Cultivos de Streptococcus mutans de la cepa ATCC 25175	Tamaño del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con el extracto acuoso de cáscara y semilla de cacao.	Cuantitativa (mm)

3.4 PROCEDIMIENTO

3.4.1 Proceso de recolección, desinfección y despulpado del cacao (*Theobroma cacao. L*)

Se recolectaron 4 mazorcas de cacao, correspondientes al tipo Forastero denominado en nuestro país Nacional o Fino de Aroma, al obtener el cacao se procedió a desinfectarlas con hipoclorito de sodio al 2%, a continuación se cortaron las mazorcas de cacao y se separaron la cáscara de los

granos de cacao, los mismos que fueron despulpados, posteriormente se colocaron sobre una bandeja para el proceso de secado.



Figura 5. Desinfección de las mazorcas de cacao

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

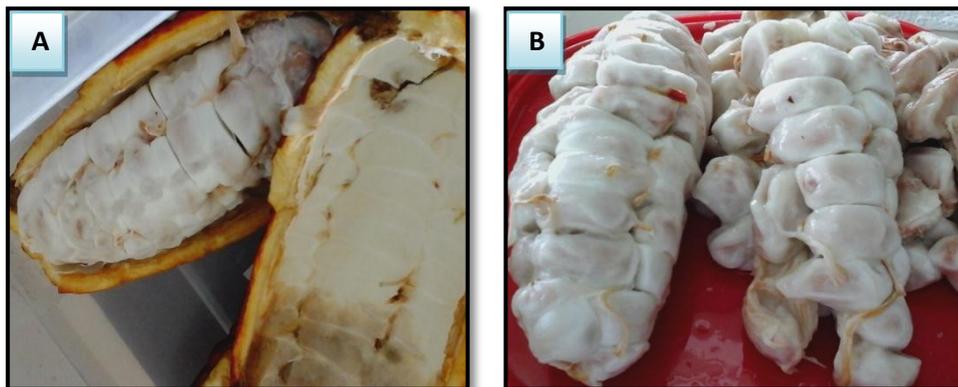


Figura 6. A) Separación de los granos de cacao de la cáscara. B) Granos de cacao con la pulpa.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 7. Despulpado de los granos de cacao.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.2 Secado

Se llevó a cabo un proceso de secado de 7 días debido a que este paso permitió una inhibición de los procesos enzimáticos de los vegetales, por ende impidió el deterioro de las semillas de cacao, dicho secado se realizó en un horno a 40°C, de igual forma que lo realizaron Ramírez y col. (Ramírez, Cely, & Ramírez, 2013)



Figura 8. Secado de los granos de cacao

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 9. Horno de Secado

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 10. Granos de cacao secos luego de 7 días

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.3 Tostado

Al pasar los 7 días de secado, se procedió a tostar los granos de cacao debido que al someter los granos de cacao a elevadas temperaturas, se llevó a cabo un proceso de epimerización que consistió en la transformación de epicatequinas en catequinas. Este tostado se realizó como lo sugirieron Zapata y col. a 140°C por 35 minutos, ya que realizar un tostado por encima de 70°C produce mayor cantidad de catequinas. Luego del tostado se dejaron enfriar los granos de cacao por 10 minutos, tras lo cual se procedió a separar manualmente la cáscara de la semilla, dicha cáscara y semilla fueron conservadas en fundas de empaque. (Kofink M, 2007; Zapata, Tamayo, & Rojano, 2015)



Figura 11. Tostado de los granos de cacao

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

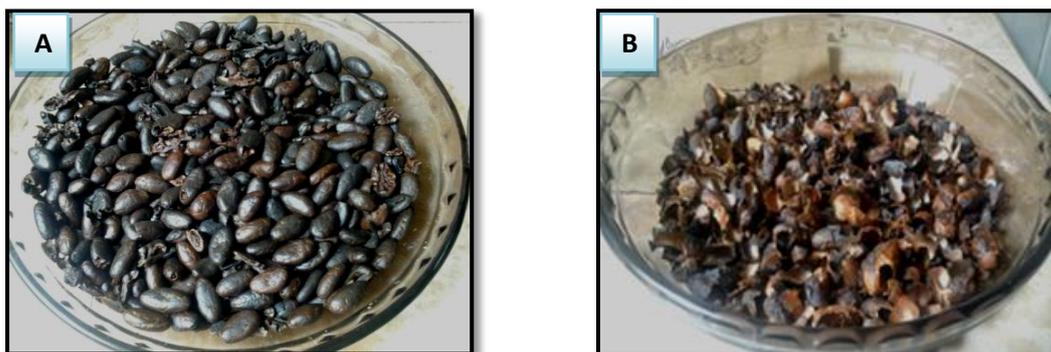


Figura 12. Descascarillado de los granos de cacao. A) Semillas B) Cáscaras

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.4 Molienda

La misma que permitió obtener partículas más pequeñas tanto de cáscara como de las semillas de cacao, esto se realizó para que en el momento de la extracción el solvente penetre en el polvo tanto de la semilla como de la cáscara de cacao, ya que las partículas pequeñas, hizo que las membranas del cacao se encuentren parcialmente destruidas y por lo tanto permitieron la salida de sus componentes al líquido externo. Dicha molienda se llevó a cabo con un molino eléctrico del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas, el polvo se conservó en bolsas de empaque rotuladas. (Sharapin, 2000)

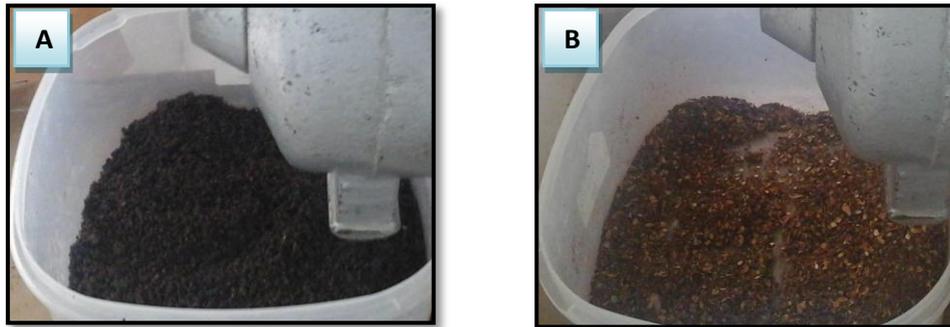


Figura 13. A) Molienda de las semillas de cacao. B) Molienda de la cáscara de cacao.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 14. Molino Eléctrico

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.5 Obtención del extracto acuoso

Según Sharapin cuando el compuesto vegetal molido se pone en contacto con el solvente, dicho “solvente penetra en la célula vegetal y expelle el aire contenido en citoplasma, dándose inicio de esta forma al proceso extractivo”. (Sharapin, 2000, pág. 35)

La extracción se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales que contó con todos los equipos y materiales necesarios para el proceso.

La extracción acuosa se realizó en 2 porcentajes al 12.5% y al 20% de los polvos de cacao tanto de la cáscara como de la semilla, el procedimiento es el semejante al realizado por Ramírez y col. en el que se pesó 100g de los polvos de cacao en una balanza analítica, posteriormente se colocó 100g de polvo de semilla de cacao molida en un balón aforado y se sometió a reflujo con 500 ml de agua destilada a ebullición por 30 minutos, posteriormente se procedió a filtrar el extracto al vacío. (Ramírez, Cely, & Ramírez, 2013)



Figura 15. A) Polvo de la semilla de cacao B) Polvo de la cáscara de cacao

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 16. Pesaje de los 100 g de polvo de semilla de cacao.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 17. Colocación de los 100 g de polvo de semilla en el balón aforado.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 18. A) Equipo de reflujo. B) Reflujo de la cáscara y semilla de cacao.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 19. A) Filtrado al vacío de los extractos de cacao. B) Extracto filtrado.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

De las soluciones obtenidas se procedió a concentrar el extracto, de tal forma que se aplicó la siguiente fórmula de dilución (Ver Anexo 7):

$$C1 V1= C2 V2$$

En la que se calculó el V1 del extracto de cacao, ya obtenido el V1, se procedió a medir la solución con la ayuda de una pipeta, dicho contenido se colocó en un balón aforado de 100 ml y a esto se añadió 100 ml de agua destilada, para lo cual se utilizó una probeta y un gotero para que la medición sea exacta, la cantidad de agua destilada debió llegar a la señal que marca el balón aforado, tras lo cual se agitó suavemente, así se consiguieron las concentraciones al 12.5% y al 20%, tanto de cáscara como de semilla.

Los extractos obtenidos fueron colocados en frascos Ámbar rotulados y conservados a 4 °C para su posterior uso.



Figura 20. Pipeta con V1 del extracto

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 21. Concentración de los extractos.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 22. Agitación de los extractos concentrados.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.6 Preparación del medio de cultivo (Agar sangre)

Dicho medio de cultivo de Agar sangre se preparó de la siguiente manera: se pesó en una balanza analítica 24 g del medio de cultivo y se colocó en un matraz, a esto se le añadió 600 ml de agua destilada, esta mezcla fue llevada a ebullición a 90 °C hasta lograr una consistencia homogénea, posteriormente se colocó el medio de cultivo en la autoclave a 121°C - 1.1 atmósferas por 15 minutos, tras lo cual se dejó enfriar para que no adquiriera una consistencia de coágulos.

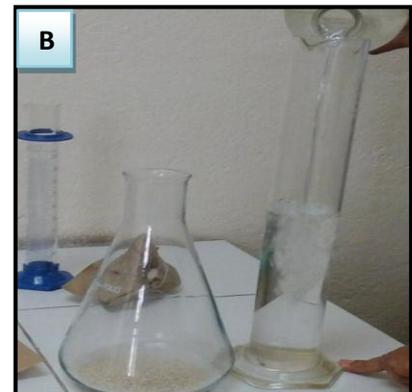


Figura 23. A) Pesaje de 24 g del medio de cultivo en la balanza analítica. B) Medición de 600 ml de Agua destilada.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 24. Ebullición del medio de cultivo a 90 °C.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 25. Medio de cultivo en autoclave.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Posteriormente se trasladó el medio de cultivo a la Cabina de Flujo Laminar, que consistió en una cabina de aire estéril, en donde se adicionó 3% de sangre de cordero al medio de cultivo esto se llevó a cabo a una temperatura de 45°C ya que esa temperatura evitó la formación de gotitas de condensación de agua, dicho Agar sangre se repartió en las 21 cajas Petri, se dejaron descansar las cajas en la Cabina de Flujo Laminar con luz ultravioleta hasta que adquirieran una consistencia sólida. Tras lo cual las cajas Petri con Agar sangre se conservaron en refrigeración a 4°C para su posterior uso. (Pedraza & Hernandez, 2006)



Figura 26. Cabina de Flujo Laminar.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

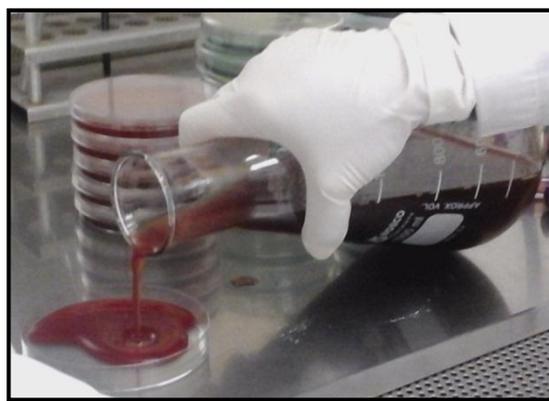


Figura 27. Agar sangre en las cajas Petri.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 28. Aplicación de luz ultravioleta.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.7 Activación y siembra de la cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175

En cuanto al microorganismo se utilizó una cepa pura de Streptococcus mutans ATCC 25175 obtenida en el Laboratorio de Análisis Clínico, que tras su activación se mantuvo en refrigeración. Para su uso, se procedió a colocar la cepa en la estufa por un día a 35 +/- 2°C para reactivarla, de igual modo que lo hizo Gualli se comparó de manera visual que el tubo de ensayo con la cepa de Streptococcus mutans tenga igual turbidez a la escala 0.5 Mc. Farland (1.5×10^8 UFC/ ml). (Gualli, 2014)

Posteriormente se trasladaron las 21 cajas de Agar sangre a la cámara de flujo laminar, en donde se sembró un inóculo de la bacteria correspondiente a 0,5 Mc. Farland, que se realizó con hisopos

estériles sobre el Agar sangre de las cajas Petri, la siembra se efectuó en tres direcciones para lograr una distribución del Streptococcus mutans en toda la superficie de la caja.



Figura 29. Cepa de S. mutans.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

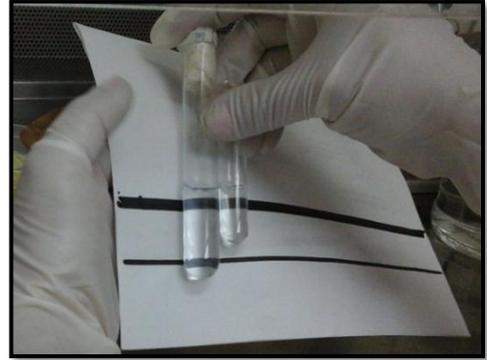


Figura 30. Turbidez a 0.5 Mc Farland.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

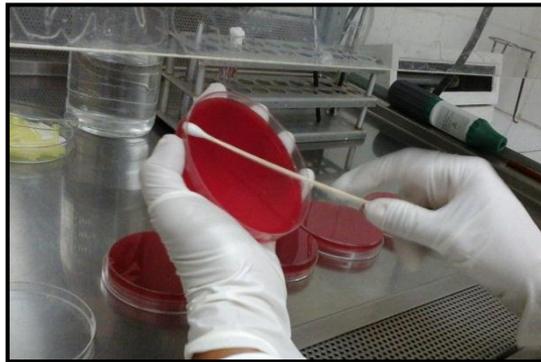


Figura 31. Siembra del Streptococcus mutans.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.4.8 Método de difusión con discos (Kirby – Bauer) con el extracto acuoso

Previamente se procedió a rotular las cajas Petri de la siguiente manera:

- C12.5: Extracto acuoso de cáscara al 12.5%
- C20: Extracto acuoso de cáscara al 20%
- S12.5: Extracto acuoso de semilla al 12.5%
- S20: Extracto acuoso de semilla al 20%



Figura 32. Rotulación de las cajas Petri.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

De los cuales se hicieron 20 repeticiones de cada uno, que representaron el grupo experimental y 1 repetición que correspondió al grupo control.

A continuación se llevó a cabo el método difusión con discos (Kirby – Bauer), en el que se embebió los discos de papel filtro con 20 ul (microlitros) del respectivo extracto de cacao en porcentajes del 12.5% y del 20%, el mismo que fue calibrado con una micropipeta, cabe destacar que para cada extracto se usaron diferentes puntas desechables, dicho disco de papel fue colocado con una pinza en la caja Petri de Agar sangre.

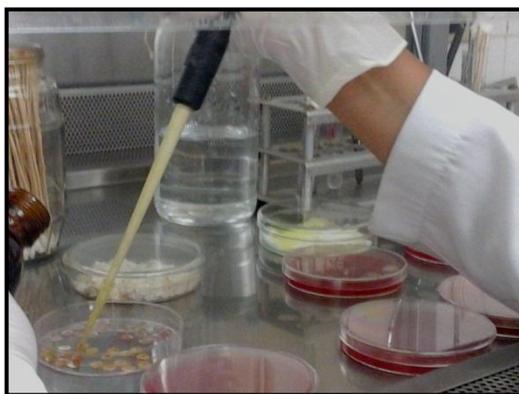


Figura 33. Discos de papel filtro embebidos con 20 ul del extracto acuoso.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

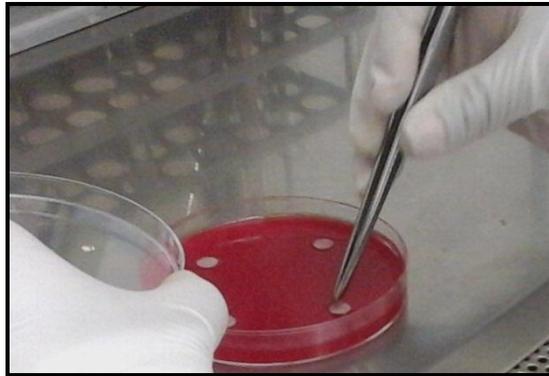


Figura 34. Colocación de discos de papel filtro en las cajas Petri.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Ya colocados todos los discos de papel en las cajas Petri rotuladas se dejaron reposar por 10 minutos para que los extractos se difundan, posteriormente se colocaron en la Jarra Gaspak, que consistió en una jarra de anaerobiosis para la incubación del *Streptococcus mutans* a 35 ± 2 °C y una atmósfera de CO₂ al 5%.

Al grupo control se colocaron discos de papel filtro embebidos en agua destilada.

Los resultados fueron evaluados a las 24 horas, dicho resultado fue obtenido mediante halos de inhibición, que fueron medidos con la regla para el método de ensayo de la susceptibilidad de Kirby-Bauer, a la vez que se elaboró una tabla con los resultados obtenidos.

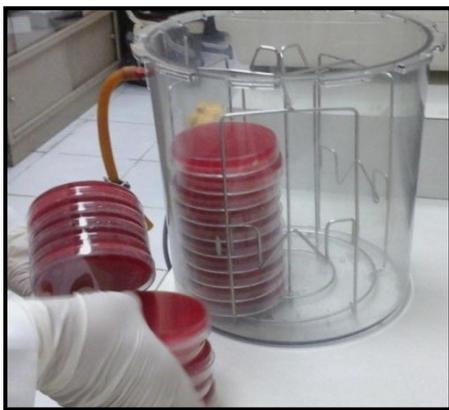


Figura 35. Jarra de Anaerobiosis.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 36. Incubación del *S. mutans*.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor



Figura 37. A) Medición de los halos de inhibición. B) Halos de inhibición.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio fue de tipo experimental e in vitro, por lo que se utilizaron cultivos, razón por la cual no se necesitó la aprobación del Comité de Ética para la realización del mismo.

Por otro lado cabe mencionar que se solicitaron los respectivos certificados de la realización de este estudio, tanto del Laboratorio de Productos Naturales para la elaboración del extracto, como del Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas (Ver Anexo 4,5,6).

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis Estadístico

Se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cáscara y semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en dos concentraciones sobre cepa de *Streptococcus mutans*, esto fue realizado en un estudio in vitro.

Lo que se quiso comprobar fue si dichos extractos de cáscara y semilla de cacao al 12.5% y al 20% presentan efecto antimicrobiano y en caso de presentarlo, comparar cual de las dos partes del cacao presenta mayor efecto, esto dado por los halos de inhibición.

Para llevar a cabo el estudio, el tamaño de la muestra se obtuvo de la siguiente manera:

TABLA DE APOYO AL CÁLCULO DEL TAMAÑO DE UNA MUESTRA POR NIVELES DE CONFIANZA									
Certeza	95%	94%	93%	92%	91%	90%	80%	62,27%	50%
Z	1,96	1,88	1,81	1,75	1,69	1,65	1,28	1	0,6745
Z ²	3,84	3,53	3,28	3,06	2,86	2,72	1,64	1	0,45
e	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,37	0,5
e ²	0,003	0,0036	0,0049	0,0064	0,0081	0,01	0,04	0,1369	0,25

Tabla 1. Nivel de confianza de la muestra.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Oswaldo Basurto G. Mg.

CÁLCULO DE LA MUESTRA

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{N * e^2 + Z^2 * p * q}$$

$$q = 1 - p$$

Población Finita	
<i>Cuando se conoce cuántos elementos tiene la población</i>	
Parámetros	Valores
<i>N = Universo</i>	22
<i>Z = nivel de confianza</i>	1,96
<i>e = error de estimación</i>	0,05
<i>p = probabilidad a favor</i>	0,5
<i>q = probabilidad en contra</i>	0,5
<i>n = tamaño de la muestra</i>	20,81

$$n = \frac{3,8416 \times 0,5 \times 0,5 \times 22}{22 \times 0,0025 + 3,8416 \times 0,5 \times 0,5}$$

$$n = \frac{3,8416 \times 0,25 \times 22}{0,055 + 0,9604}$$

$$n = \frac{21,1288}{1,0154}$$

$$n = 20,81$$

$$n = 21$$

Tabla 2. Cálculo de la muestra del estudio.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Oswaldo Basurto G. Mg.

El resultado de la fórmula indica que en el estudio se emplearán 21 cajas Petri, para que los resultados tengan un 95% de confianza, con un 5% de margen de error.

De manera que se colocaron 4 discos de papel filtro con los respectivos extractos en cada caja Petri y de estos se realizaron 20 repeticiones, con un total de 80 ensayos del grupo experimental y una repetición del grupo control negativo con agua destilada estéril, todo esto distribuido en las 21 cajas Petri.

Por otro lado, los datos que se consiguieron de la medición de los halos de inhibición alrededor del *Streptococcus mutans* tras exponerlos a los extractos acuosos de cacao ya mencionados, se detallaron en la siguiente tabla.

**EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLA DE CACAO FORASTERO
(NACIONAL O FINO DE AROMA)**

REPETICIÓN (<i>Streptococcus mutans</i>)	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	CÁSCARA		SEMILLA	
	12,50%	20,00%	12,50%	20,00%
1	10	8	8	8
2	8	10	8	8
3	8	10	8	8
4	8	8	8	8
5	8	8	8	8
6	8	8	8	8
7	8	8	8	8
8	8	8	9	8
9	8	8	8	8
10	9	10	8	8
11	8	8	8	10
12	8	8	10	8
13	8	8	10	8
14	8	8	10	9
15	8	8	10	8
16	8	8	8	8
17	8	8	8	9
18	8	8	9	8
19	8	8	8	8
20	8	8	8	8

Tabla 3. Resultado de la Medición de los halos de inhibición sobre cepa de *Streptococcus mutans*, tras exponerlos a los extractos acuosos de cacao.

Fuente: Investigación

Elaboración: Autor

Al contar con los datos de medición de los halos de inhibición, se procedió al análisis de los mismos, para lo cual se empleó el Programa de Análisis Estadístico SPSS 20.

EXTRACTO ACUOSO DE CACAO	CONCENTRACIÓN	Media	N	Desviación Estándar
CÁSCARA	12.5%	8,15	20	0,489
	20%	8,3	20	0,733
SEMILLA	12.5%	8,5	20	0,827
	20%	8,2	20	0,523

Tabla 4. Media de los halos de inhibición por grupo de estudio.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

En la tabla se observa los halos promedio de cada grupo de estudio en donde no se aprecian grandes diferencias.

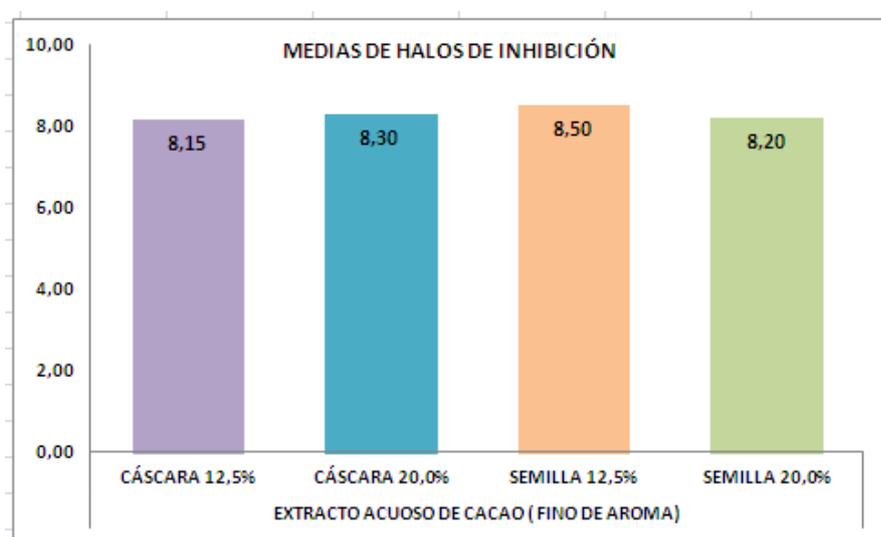


Gráfico 1. Medias de los halos de inhibición por grupo de estudio.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

En el gráfico se observa que todos los extractos de cacao presentaron halos de inhibición, sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, el máximo halo de inhibición se presentó con el extracto acuoso

de semilla al 12.5%, mientras que el menor halo de inhibición se presentó en el extracto acuoso de cáscara al 12.5%.

Para seleccionar la Prueba Estadística a emplearse en esta investigación, primero se analizó la presencia o ausencia de la normalidad en nuestra muestra, se trabajó con un nivel de confianza del 95%.

Prueba de Normalidad:

Para lo cual se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Shapiro-Wilk, que nos permitió conocer si las muestras provenían de una población con distribución normal.

Se plantean las siguientes hipótesis:

Ho (Hipótesis nula): La muestra proviene de una población con distribución Normal.

$$p > 0.05$$

Ha (Hipótesis alterna): La muestra NO proviene de una población con distribución Normal.

$$p \leq 0.05$$

Pruebas de Normalidad						
EXTRACTOS ACUOSOS	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CÁSCARA 12,5%	0,520	20	0,000	0,354	20	0,000
CÁSCARA 20,0%	0,509	20	0,000	0,433	20	0,000
SEMILLA 12,5%	0,427	20	0,000	0,612	20	0,000
SEMILLA 20,0%	0,499	20	0,000	0,447	20	0,000

Tabla 5. Resultado de las Pruebas de Normalidad.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

Los valores de **Sig: 0,000** en las dos pruebas son menores a **0.05 (p ≤ 0.05)** por lo que se acepta la Hipótesis alterna, que indica que ninguna muestra corresponde a poblaciones con distribuciones normales.

Al no cumplirse con la regla de Normalidad en este estudio se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Prueba de U Mann-Whitney de muestras independientes:

Nos permitió comparar cual de las dos partes del cacao, presenta mayor efecto antimicrobiano.

Extracto acuoso de Cáscara al 12,5% vs Extracto acuoso de Semilla al 12,5%

Ho (hipótesis nula): Las muestras proceden de poblaciones con la misma distribución de probabilidad (medias similares).

Ha (hipótesis alterna): Las muestras proceden de poblaciones diferentes, esto es existen diferencias respecto a la tendencia central de las poblaciones.

RANGOS				
	EXTRACTOS 12,5%	N	Rango promedio	Suma de rangos
VALORES 12,5%	CÁSCARA 12,5%	20	18,45	369,00
	SEMILLA 12,5%	20	22,55	451,00
	Total	40		

Tabla 6. Resultado de Rangos de los extractos al 12.5%

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

Se analizó los rangos en donde se observó que el rango promedio de la muestra de cáscara al 12,5% es prácticamente igual al de semilla al 12,5%, por lo que al parecer no existieron diferencias significativas.

Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes

EXTRACTOS 12,5%

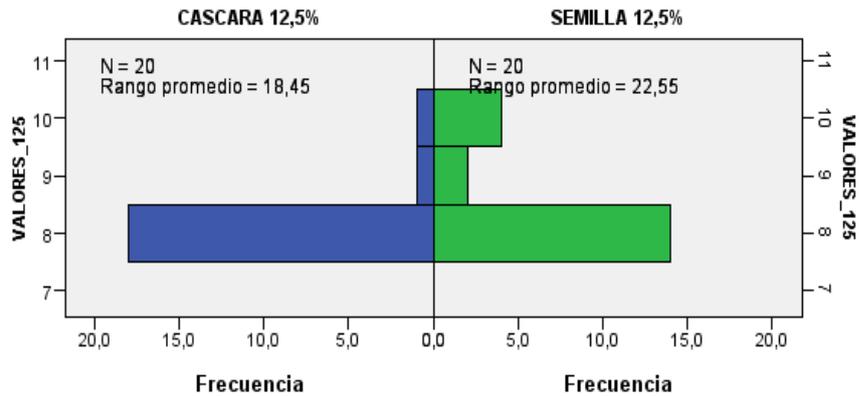


Gráfico 2. Rangos de los extractos al 12.5%.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

En el gráfico de barras bidireccional, la frecuencia representa el valor de los halos de inhibición que se repiten de modo que 8 mm se repite 18 veces, 9 mm se repite una vez, 10 mm se repite una vez, esto en el extracto de cáscara al 12.5%, mientras que en el de semilla al 12.5% el halo de 8 mm se repite 14 veces, el de 9 mm se repite dos veces y el de 10 mm se repite 4 veces.

N total	40
U de Mann-Whitney	241,000
W de Wilcoxon	451,000
Probar estadística	241,000
Error típico	25,770
Estadística de prueba estandarizada	1,591
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	,112
Sig. exacta (prueba de dos caras)	,277

Tabla 7. Resultados de la Prueba de U de Mann Whitney de extractos de cáscara y semilla de cacao al 12.5%.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

Se obtuvo **Sig. exacta = 0,277** que es mayor a 0.05, por lo que se acepta la Hipótesis Nula (Ho), es decir que no existen diferencias significativas respecto a la tendencia central de las dos poblaciones, por lo que la media del halo de inhibición del Extracto acuoso de cáscara al 12,5% es similar a la media del Extracto acuoso de semilla al 12,5%.

Extracto acuoso de Cáscara al 20% vs Extracto acuoso de Semilla al 20%

Ho (hipótesis nula): Las muestras proceden de poblaciones con la misma distribución de probabilidad (medias similares).

Ha (hipótesis alterna): Las muestras proceden de poblaciones diferentes, esto es existen diferencias respecto a la tendencia central de las poblaciones.

RANGOS				
	EXTRACTOS 20,0%	N	Rango promedio	Suma de rangos
VALORES 20,0%	CÁSCARA 20,0%	20	20,65	413,00
	SEMILLA 20,0%	20	20,35	407,00
	Total	40		

Tabla 8. Resultado de Rangos de los extractos al 20%.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

Se analizó los rangos en donde se observó que el rango promedio de la muestra de extracto de cáscara al 20% es prácticamente igual al de semilla al 20%, por lo que al parecer no existieron diferencias significativas, entre las dos muestras.

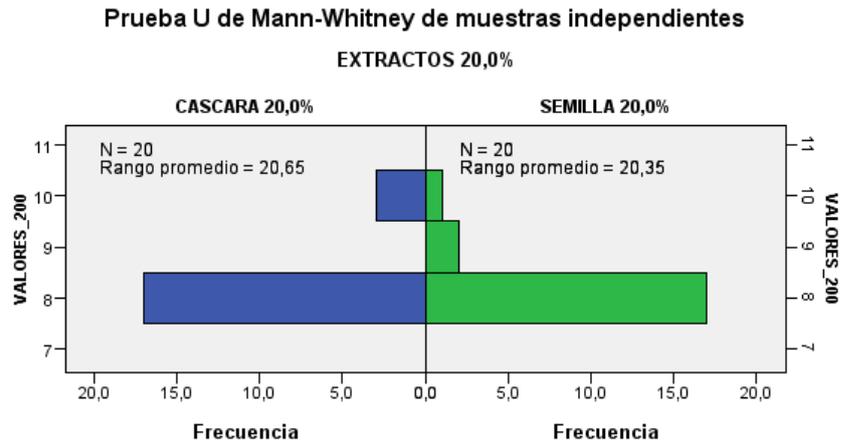


Gráfico 3. Rangos de los extractos al 20%.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

En el gráfico de barras bidireccional, la frecuencia representa el valor de los halos de inhibición que se repiten de modo que 8 mm se repite 17 veces, 9 mm no se repite, 10 mm se repite tres veces, esto en el extracto de cáscara al 20%, mientras que en el de semilla al 20% el halo de 8 mm se repite 17 veces, el de 9 mm se repite dos veces y el de 10 mm se repite una vez.

N total	40
U de Mann-Whitney	197,000
W de Wilcoxon	407,000
Probar estadística	197,000
Error típico	22,938
Estadística de prueba estandarizada	-,131
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	,896
Sig. exacta (prueba de dos caras)	,947

Tabla 9. Resultado de la Prueba de U de Mann Whitney de extractos de cáscara y semilla de cacao al 20%.

Fuente: Investigación

Elaboración: Ing. Jaime Molina

Se obtuvo **Sig. exacta = 0,947** que es mayor a 0,05, por lo que se acepta la Hipótesis Nula (H₀), es decir que no existen diferencias significativas con respecto a la tendencia central de las dos poblaciones, por lo que la media del halo de inhibición del Extracto acuoso de cáscara al 20,0% es similar a la media del Extracto acuoso de semilla al 20,0%.

Es decir los extractos acuosos de cáscara de cacao y semillas de cacao al 12.5% y al 20% son estadísticamente similares, por lo que no se presentan diferencia significativa.

DISCUSIÓN

El estudio de las plantas con fines terapéuticos en Odontología se ha incrementado en la actualidad, en su mayoría destinados a controlar o eliminar un agente causal de la caries dental como es el *Streptococcus mutans*. (Cuéllar, 2010)

Se atribuye a las plantas ciertos poderes antimicrobianos por la presencia de compuestos tales como los polifenoles, en este caso al cacao se le atribuye propiedades antimicrobianas por la presencia de catequinas, epicatequinas y ácidos grasos, dichos componentes poseen propiedades antiglicosiltransferasa de modo que la enzima glucosiltransferasa se bloquea evitando la producción de polisacáridos y por ende la adhesión de los microorganismos a la superficie dental, evitando de esta manera la iniciación de caries dental. (Chamorro-Jiménez, Ospina-Cataño, Arango-Rincón, & Martínez-Delgado, 2013)

En el presente estudio se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de cacao, tanto de la cáscara como de la semilla, sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, en un estudio realizado *in vitro*.

Dicho efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cáscara y semilla de cacao fue comprobado tras la medición de los halos de inhibición de hasta 10 mm, se apreció que el extracto acuoso de semilla al 12.5% presentó mayor efecto antimicrobiano con un halo promedio de 8.50 mm, seguido del extracto acuoso de cáscara al 20% con un halo promedio de 8.30 mm, el extracto acuoso de semilla al 20% con un halo promedio de 8.20 mm y el mínimo halo promedio de 8.15 mm correspondiente al extracto acuoso de cáscara al 12.5%.

Al efectuarse los análisis estadísticos con la Prueba no paramétrica de U de Mann Whitney se encontró que no existieron diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición del extracto acuoso de la cáscara y semilla, al igual que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la concentración, es decir al 12.5% y al 20%.

Por los resultados obtenidos se demuestra que tanto la cáscara como la semilla de cacao presentan un efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, sin influencia de la concentración, los resultados encontrados en este estudio coinciden con las investigaciones realizadas por varios autores.

Así Matsumoto y col. en el 2004 obtuvieron como resultado una inhibición en la adherencia del *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita, al usar un extracto de cáscara de cacao, esto en un estudio in vitro, y por otro lado en un estudio in vivo obtuvieron una reducción del *Streptococcus mutans* en la placa dental de 28 personas tras usar como enjuague bucal un extracto de cáscara de cacao al 1%. De manera que se encuentra cierta concordancia en cuanto al efecto antimicrobiano encontrado en nuestro estudio. (Matsumoto, y otros, 2004)

También Rosas en el 2009, halló que 4 derivados del cacao como manteca de cacao, chocolate sin azúcar, chocolate azucarado y cacao en polvo, en forma de extractos acuosos presentaron efecto antimicrobiano, sobre cepa de *Streptococcus mutans*, hallando un halo de inhibición de 15 mm con la manteca de cacao y un halo de 8 mm con el cacao en polvo, coincidiendo con los resultados de nuestra investigación, en cuanto al efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao. (Rosas, 2009)

Cuéllar en el 2010, demostró en un estudio in vitro que el extracto etanol: agua de la cáscara de cacao presentó efecto antibacteriano sobre *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Streptococcus agalactiae*, para lo cual utilizó el método de difusión con disco Kirby- Bauer, encontrándose un parecido a nuestro estudio en cuanto a la inhibición del género *Streptococcus*. (Cuéllar, 2010)

A más de esto Mariani y col. en el 2010 evidenciaron que el extracto acuoso de semillas de cacao, presentó efecto antimicrobiano sobre cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, tras someter a dicha cepa al extracto en concentraciones comprendidas entre 0.01% y 17,5%, para lo cual emplearon el método difusión con disco y encontraron halos de inhibición en todas las concentraciones pero mencionaron que las mejores fueron entre 10% y 12,5%, encontraron halos de inhibición con un promedio de 7 mm, siendo el mínimo de 6mm y el máximo de 8mm.

Esto concuerda con nuestro estudio, ya que se emplearon concentraciones de 12.5% y 20% del extracto acuoso de cáscara y semillas de cacao, hallándose un efecto antimicrobiano, por otro lado se encuentra una pequeña diferencia en cuanto a los halos de inhibición, ya que en nuestro estudio el halo promedio fue de 8.50 mm, 8.30 mm, 8.20 mm y 8.15 mm respectivamente, y en cuanto a la medición de los halos el mínimo fue de 8 mm y el máximo de 10 mm. (Mariani, Jaimes, & Fernandez-Da Silva, 2010)

Finalmente Venkatesh y col. en el 2011 encontraron en un estudio comparativo que el enjuague bucal de clorhexidina al 0.2% versus un enjuague bucal de extracto de cáscara cacao al 0.1%, no presenta ninguna diferencia significativa, en cuanto a la acción antimicrobiana, por lo que podría

ser una alternativa en cuanto a la prevención de la caries dental. (Venkatesh, Vivek, & Ambika, 2011)

Cabe resaltar que los autores ya mencionados realizaron sus investigaciones utilizando extractos de cáscara o extractos de semilla por separado, pero no se han realizado estudios en los que se comparen el efecto de dichas partes de la planta de cacao, como se realizó en este estudio.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de cacao presentan un efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, de modo que puede ser usado como un agente en el control de la caries dental.
- El cacao presenta agentes antimicrobianos como ácidos grasos insaturados como el oleico y linoleico, especialmente agentes antiglucosiltransferasas como las catequinas que inhiben la adhesión del *Streptococcus mutans* a la superficie dentaria.
- Los extractos acuosos de cáscara de cacao al 12.5% y al 20% presentan efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, esto dado por la presencia de halos de inhibición de hasta 10 mm.
- Los extractos acuoso de semilla de cacao al 12.5% y al 20% presentan efecto antimicrobiano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, debido a la presencia de halos de inhibición de hasta 10 mm.
- Según los análisis estadísticos no se encontraron diferencias significativas entre los extractos acuosos de cáscara y semilla de cacao, como agentes antimicrobianos sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, por lo tanto los dos pueden ser utilizados ya que forman halos de inhibición de igual tamaño sobre la bacteria.

RECOMENDACIONES

- Se debería continuar con este estudio, enfocándose a preparar extractos en otras concentraciones, puesto que a mayores concentraciones mayor contenido de principios activos como las catequinas.
- Se recomienda realizar más estudios de este extracto de cacao empleándolo sobre otros patógenos de la microflora oral y aplicado a otras áreas de la Odontología.
- Al llevarse a cabo este estudio in vitro y con resultados satisfactorios, sería ideal llevar a cabo un estudio in vivo.
- Se debería recomendar a los pacientes el uso de especies vegetales, como el cacao, ya que resulta efectivo, barato y de fácil acceso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Araujo, J., & Salas, R. (2008). *Actividad Antimicrobiana de Plantas*.
2. Aricapa, B. (2009). Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. *Tesis Doctoral*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
3. Baca, P. (2005). Caries: fundamentos actuales de su prevención y control. En E. Cuenca, & P. Baca, *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones*. Barcelona: Masson.
4. Barbería, E. (2005). *Caries dental. Cuadros clínicos en el niño. Atlas de Odontología infantil para pediatras y odontólogos*. España: Ripano Editorial al Médico.
5. Barrancos, L. (2006). *Operatoria Dental* (Cuarta ed.). Buenos Aires: Panamericana.
6. Beckett, S. T. (2008). The Science of Chocolate. *Cambridge: The Royal Society of Chemistry*, 39-57.
7. Bodero, M. (2010). Estudio Farmacognóstico y actividad antimicrobiana (in vitro) de los extractos fluidos de arrayán y pumín y su aplicación en una pasta dentífrica. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador: Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
8. 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 (estudio in vitro e in vivo)*. Obtenido de http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0213-12852003000500003&script=sci_arttext
9. Bönecker, M., & Cleaton, J. P. (2003). *Trends in dental caries in Latin American and Caribbean 5-6 and 11-13 year old children: A systematic review*.
10. Bonecker, M., Abanto, J., Pires, M., De Horossi, J., & Guedes, A. (2014). ¿Cómo y por qué evaluar la actividad de la caries dental? En M. Bonecker, J. Abanto, M. Pires, J. De Horossi, & A. Guedes, *Problemas Bucales en Odontopediatría* (pág. 49). Madrid: Ripano Editorial Médica.
11. Cala, M., & Vásquez, Á. (2008). *Estudio Comparativo por electroforesis capilar y cromatografía de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia Labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante*. Universidad Industrial de Santander: Tesis de grado para optar el título de Química.

12. Cañigüeral, S. (2003). Identidad y pureza de drogas vegetales y extractos. *Seminario Taller sobre Estandarización de Extractos Vegetales y Garantía de Calidad de Productos Fitoterápicos*, 4-8.
13. Ccahuana, R., Ferreira, S., Koga, C., & Cardoso, A. (2007). Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res*, 21(1), 46-50.
14. Chamorro-Jiménez, A., Ospina-Cataño, A., Arango-Rincón, J., & Martínez-Delgado, C. (2013). Acción de la inmunoglobulina A secretora en el proceso de adherencia de *Streptococcus mutans* al diente humano. *Rev. CES Odont.*, 26(2), 76-106.
15. Corporacion de Promocion de Exportaciones, C. (2009). Perfil del Cacao y sus Elaborados.
16. Cuéllar, O. (2010). *Obtención del extracto polar etanol:agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana*.
17. De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel M, P., Macía, M. J., & Balsler, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito.
18. Domingo, D., & Lòpez, B. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.
19. Duque de Estrada, J., Pérez, J., & Hidalgo, I. (2006). *Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar*. Obtenido de http://www.bvs.sld.cu/revistas/est/vol43_1_06/est07106.htm
20. Enrile de Rojas, F., & Fuenmayor, V. (2009). *Manual de Higiene Bucal*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
21. Espinoza, C., Yáñez, J., Cedillo, M., Katz, J., & Michalek, S. (2004). Relación parásito hospedero en el modelo de *Streptococcus mutans* y la caries dental. En R. d. Rocha, P. Lozano, & Y. Martínez, *Mecanismos de patogenicidad e interacción. Parásito - Hospedero* (págs. 128-142). México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
22. Estrada, W., Romero, X., & Moreno, J. (2011). *Guía Técnica del Cultivo de Cacao Manejado con Técnicas Agroecológicas*. Obtenido de biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf
23. Gamboa, F., Herazo, B., & Martínez, M. (2004). Control Microbiológico sobre *Streptococcus Mutans* y su acción acidogénica. *Universitas Scientiarum*, 9, 45-55.

24. García, B., Saldaña, A., & Basterrechea, M. (2008). Glucanos extracelulares bacterianos: estructura, biosíntesis y función. *Revista Cubana de Estomatología*, 45(3-4).
25. Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición* (Segunda Edición). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
26. Gómez, S., & Barrietos, S. (2013). Antígenos usados en vacunas contra la caries dental. *Univ Odontol*, 32(69), 73-82.
27. Gualli, M. (2014). Estudio in vitro de la eficacia en la inhibición del *Streptococcus mutans* de 6 pastas dentales de uso pediátrico. Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito. Tesis para la obtención del Título de Especialista en Odontología mención en Odontopediatría.
28. Henostroza, G. (2007). *Caries Dental Principios y Procedimientos para el diagnóstico*. Lima: Ripano Editorial Médica.
29. Hernández, M. (Noviembre de 2011). *Aislamiento y Cuantificación de Streptococcus Mutans en saliva en niños de la Escuela Primaria "Ignacio Ramírez"*. Obtenido de cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30913/1/Mtz.pdf
30. Kofink M, P. M. (2007). Catechin in coca and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol anatiomer. *Molecules*. 12, 1274-88.
31. Kyoung-Heon, K., Ki, L., Dong, K., Hyung, P., K, I., & Hyong, L. (2004). Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Process Biochemistry*, 39(12), 2043-6.
32. Lee, K., Hwang, E., Kang, N., Kim, K., & Lee, H. (2005). Extraction and chromatographic separation of anticarcinogenic fractions from cacao bean husk. *Biofactors*, 23(3), 141-50.
33. Mariani, M., Jaimes, G., & Fernandez-Da Silva, R. (2010). Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el *Streptococcus mutans* in vitro. *Odous Científica*, 11(1), 15-22.
34. Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñon, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*, 17(6), 271-278.
35. Matsumoto, M., Tsuji, M., Okuda, J., Sasaki, H., Nakano, K., & al., K. O. (2004). Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci*, 112(3), 249-52.

36. Maydata, B. A. (2002). *Chocolate, Polifenoles y Proteccion a la salud*. Obtenido de www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP_21_2_3_1_S2133VGV50.pdf
37. Ministerio de Relaciones Exteriores, C. e. (2011). Analisis Sectorial de Cacao y Derivados. *Pro Ecuador*, 1-37.
38. Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica "Fundamentos y Guía Práctica"*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
39. Nisao, O. (2007). El Cacao. *CONABIO. Biodiversitas*, 72, 1-5.
40. Ojeda, J., Oviedo, E., & Salas, L. (2013). Streptococcus mutans y caries dental. *Rev. CES Odont*, 26(1), 44-56.
41. Ooshima, T., Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., & Matsumura, M. (2000). Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in vitro and animal experiments. *Archives Oral Biology*, 639-645.
42. Organización Internacional del Cacao, I. (2011). Orígenes del Cacao.
43. Osawa, K., Miyazakil, K., Shimural, S., Okuda, J., Matsumoto, M., & Ooshima, T. (2001). Identification of Cariostatic Substances in the Cacao Bean Husk: Their Anti-glucosyltransferase and Antibacterial Activities. *J Dent Res*, 80(11). Obtenido de Ebsco.
44. Palmier, R. (2009). Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilm: effective adjuncts to mechanical plaque control. *Brazilian Oral Research*, 23, 9-48.
45. Paredes Salido , F., & Clemente Fernandez, A. (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia: Metabolismo y acción biológica. *Offarm*, 24, 85-94.
46. Pedraza, D., & Hernandez, Y. (2006). *Diseño y Valoración de un medio de cultivo selectivo (Sulbac) para Streptococcus mutans*. Obtenido de www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis162.pdf
47. Percival, R., Devine, D., Duggal, M., Chartron, S., & Marsh, P. (2006). The effect of cacao polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. *European Journal of Oral Sciences*, 114, 343-348.
48. PRO Ecuador. (2013). Análisis del sector cacao y elaborados. Ecuador: Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones.

49. Ramírez, M., Cely, V., & Ramírez, S. (2013). Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México. *Perspect Nutr Humana*, 15, 27-40.
50. Rawel, H., & Kulling, S. (2007). Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2, 399-406.
51. Roa, N., & Rodriguez, A. (2013). Inmunidad celular y humoral frente a microorganismos cariogénicos y sus factores de virulencia en caries dental en humanos naturalmente sensibilizados. *Univ Odontol*, 32(69), 61-72.
52. Rojas, R. (2011). *Eficacia antibacteriana in vitro del extracto de hoja de coca en comparación con clorhexidina frente a Staphylococcus y Streptococcus*. Perú: Universidad de Huánuco. Facultad de Ciencias de la Salud.
53. Rosas, M. A. (2009). *Efecto in vitro de 4 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento del Streptococcus mutans*. Perú: Tesis para Optar el grado de Bachiller en Estomatología.
54. Sánchez, A. (2011). *Cacao*. México: Trillas.
55. Sánchez, I., & Rubio, A. (2010). Atención Farmacéutica en la Enfermedad Periodontal (y II) Plantas Medicinales. *Offarm*, 29(4), 62-67.
56. Sarmiento, L. (2010). *Efecto antibacteriano del extracto alcohólico y del extracto acuoso de Té verde (Camellia sinensis) sobre bacterias orales de Importancia Estomatológica, Streptococcus mutans, Streptococcus mitis y Streptococcus salivarius*. Arequipa. Universidad de las Peruanas. Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud. Escuela Académico Profesional de Estomatología.: Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista.
57. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá: Cytel.
58. Soto, & Jose, M. (2012). *Desarrollo del Proceso de Producción de Cascarilla de Semilla de Cacao en polvo destinada al consumo humano*. Sartenejas: Universidad Simón Bolívar. Proyecto para optar por el título de Ingeniero Químico.
59. Thaweboon, S. (2009). *In vitro Antimicrobial Activity Of Ocimum americanum L. Essential Oil Against Oral Microorganisms*. Obtenido de Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19842385>

60. Torres, M. (2012). *Determinación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico, etanólico y acuoso del arrayán, calaguala, canayuyo, y tipo.* Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
61. Vásquez, B., Martínez, B., M, A., & Aguilar, A. (2011). *Uso y conocimiento de plantas medicinales por hombres y mujeres en dos localidades indígenas en Coyomeapan, Puebla, México.* Obtenido de Interciencia: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33919424004>
62. Venkatesh, N., Vivek, D., & Ambika, G. (2011). *European Archives of Pediatric Dentistry.* Obtenido de Comparative evaluation of chlorhexidine mouthrinse versus cacao bean husk extract mouthrinse as antimicrobial agents in children.
63. Zapata, S., Tamayo, A., & Rojano, B. (2015). *Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano.* Obtenido de www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/download/.../49355

ANEXOS

ANEXO N°1: Fotografías de Equipos e Instrumentos para la investigación.



Foto 1. Molino Eléctrico



Foto 2. Horno



Foto3Balanza Analítica



Foto4.Autoclave



Foto 5. Jarra Gaspack



Foto 6. Filtrador eléctrico



Foto 7. Cabina de Bioseguridad con las cajas Petri desechables



Foto 8. Matraz, balones aforados, probeta



Foto 9. Balones, refrigerantes



Foto 10. Cepa de Streptococcus mutans 25175

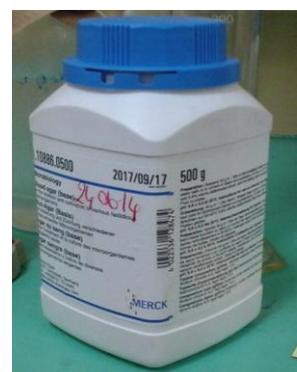


Foto 11. Agarbace

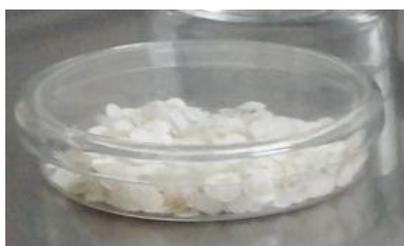


Foto 12. Discos de papel filtro



Foto 13. Puntas desechables



Foto 14. Papel filtro

PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN:



Foto 15. Tostado de los granos de cacao



Foto 16. Molienda de la semilla y cáscara de cacao



Foto 17. Pesaje del polvo de cacao



Fotos 18. Reflujo de los polvos de semilla y cáscara de cacao



Foto 19. Filtrado al vacío de los extractos acuosos de cacao



Foto 20. Medio de cultivo en autoclave



Fotos 21. Halos de inhibición

ANEXO N° 2: Solicitud para la realización del estudio en el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIDAD DE GRADUACIÓN, TITULACIÓN E INVESTIGACION

*AutORIZADO con la
D. I. Fierro
2015/01/22
TARJE B.*

Oficio N° 032-2015 - CUITG

Quito, 15 de enero de 2015

Señora Doctora
ISABEL FIERRO
DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Presente

De mi consideración:

Solicito a usted de la manera más comedida permita ingresar al laboratorio clínico para realizar el análisis microbiológico para el proyecto de investigación de la señorita MIRYAN ALEXANDRA SUCUZAÑAY MORA, estudiante de la Facultad de Odontología semestre 2014-2015; cuyo tema es: "EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CASCARA Y SEMILLAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.) SOBRE CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS. Estudio in Vitro". Requisito previo para la obtención del Título de Odontólogo.

Además favor conceder el descuento económico del mencionado análisis.

Por la favorable atención que se digna dar a la presente, anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,

Dr. JORGE NARANJO
SUBDECANO

sb



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DECANATO
22 ENE 2015
HORA: 10:10
ELIZABETH MARINEZ

ANEXO N° 3: Solicitud para la realización del estudio en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.



*Dra. Dayanna Borja Dutekzedo.
Coordinar con Decanato
en Planta piloto
D. I. Fierro
2015/01/23.*

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIDAD DE GRADUACIÓN, TITULACIÓN E INVESTIGACION**

Oficio No. 048-2015-CUGTI

Quito, 21 de enero del 2015

**Señora Doctora
ISABEL FIERRO
DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Presente**

De mi consideración:

Solicito a usted de la manera mas comedida permita acudir a la Institución que tan acertadamente dirige, a la Sr(ita) MIRYAN ALEXANDRA SUCUZAÑAY MORA, alumna del 9no semestre 2014-2015 de la Facultad de Odontología, para realizar el proyecto de investigación cuyo tema es: "Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cascara y semillas de cacao (teobroma cacao i.) sobre cepa de streptococcus mutans. Estudio in vitro". Para la realización de su trabajo requiere la utilización del laboratorio de productos naturales y de la planta piloto. Requisito previo para la obtención del Título de Odontólogo.

Además favor conceder el descuento económico.

Por la favorable atención que se digna dar a la presente, anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,

Wilfrido Palacios Paredes, PHD
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE GRADUACIÓN, TITULACIÓN E INVESTIGACIÓN

sb

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DECANATO**

22 ENE 2015

HORA: *10:00*

ELIZABETH MARQUEZ

ANEXO N° 4: Certificado de la elaboración de los extractos acuosos de cáscara y semilla de cacao en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUDOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**



OFICIO OF-LABPN-2015-003

QUITO, 09 DE ABRIL DEL 2015

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio del presente me permito indicar que la Stra. MIRYAN ALEXANDRA SUCUZHÑAY MORA, portadora de la cédula de identidad 1724974660, realizó en la instalaciones del laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central Del Ecuador, el trabajo de práctica de laboratorio para su tema **"EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLA DE CACAO (*Theobroma cacao*) SOBRE CEPA DE *Streptococcus mutans*. ESTUDIO IN VITRO"**

Para la realización de dicho trabajo la Srta. Miryan Sucuzhañay, trabajó bajo mi supervisión realizando, las diferentes operaciones unitarias destinadas a la obtención del extracto acuoso de cacao:

1. Desinfección
2. Despulpado
3. Secado
4. Molienda
5. Extracción.

Para dichas operaciones la Srta Sucuzhañay laboró en el laboratorio desde el 10 de febrero del 2015 al 20 de febrero del 2015 (9 días laborables) con un promedio de trabajo de 3.5 horas diarias (Total de horas: 31,5)

Es todo cuanto puedo mencionar con respecto al trabajo realizado.

Atentamente

MSc Dayana Borja Espín
DOCENTE DE PRODUCTOS NATURALES
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CI1710993849

ANEXO N° 5: Certificado de las pruebas microbiológicas en el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO Y BACTERIOLÓGICO

CERTIFICADO

Certifico que la Señorita Miryan Alexandra Sucuzhañay Mora, con cédula de identidad No. 172497466-0, realizó las pruebas diagnósticas bacteriológicas en el Laboratorio Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Central del Ecuador en conjunto con la Dra. Rachide Acosta, para el estudio de su tesis con el tema "EFECTO MICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CASCARA Y SEMILLAS DE CACAO (THEBROMA CACAO L.) SOBRE CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS. ESTUDIO IN VITRO". Dicho estudio fue realizado con las normas de calidad establecidas.

La mencionada señorita puede hacer uso de este documento como crea conveniente a sus intereses.

Quito, 16 de marzo del 2015

Dra. Ana Lucía Guijarro Garzón
JEFA
LABORATORIO CLÍNICO Y BACTERIOLÓGICO



Alexandra

ANEXO N° 6: Resultados de los halos de inhibición certificados por el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

CLIENTE: MIRYAN ALEXANDRA SUCUZAÑAY MORA
 MUESTRA: EXTRACTOS ACUOSOS DE CACAO
 FECHA DE PROCEDIMIENTO: 2015/02/23



EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.) SOBRE CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS. ESTUDIO IN VITRO

MEDIO DE CULTIVO: AGAR SANGRE
 CEPA DE ESTUDIO: STREPTOCOCCUS MUTANS
 ATCC 25175
 LOTE 266-20-4
 FECHA DE CADUCIDAD 2015-09

EXTRACTO DE CÁSCARA Y SEMILLA DE CACAO FORASTERO (FINO DE AROMA)

REPETICIÓN	CÁSCARA		SEMILLA	
	12,50%	20,00%	12,50%	20,00%
	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
1	10	8	8	8
2	8	10	8	8
3	8	10	8	8
4	8	8	8	8
5	8	8	8	8
6	8	8	8	8
7	8	8	8	8
8	8	8	9	8
9	8	8	8	8
10	9	10	8	8
11	8	8	8	10
12	8	8	10	8
13	8	8	10	8
14	8	8	10	9
15	8	8	10	8
16	8	8	8	8
17	8	8	8	9
18	8	8	9	8
19	8	8	8	8
20	8	8	8	8

Rachide Acosta
 DRA. RACHIDE ACOSTA



CLIENTE: MIRYAN ALEXANDRA SUCUZAÑAY MORA
MUESTRA: EXTRACTOS ACUOSOS DE CACAO
FECHA DE PROCEDIMIENTO: 2015/02/23

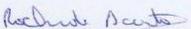


EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA
Y SEMILLAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.) SOBRE
CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS. ESTUDIO IN VITRO

MEDIO DE CULTIVO: AGAR SANGRE
CEPA DE ESTUDIO: STREPTOCOCCUS MUTANS
ATCC 25175
LOTE 266-20-4
FECHA DE CADUCIDAD 2015-09

CONTROL: AGUA

REPETICIÓN	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0



DRA. RACHIDE ACOSTA



ANEXO N° 7: Fórmula de Concentración de los Extractos Acuosa

A) Extracto acuoso de cáscara de cacao:

$$1) \frac{100\text{g polvo de cáscara}}{320\text{ ml (resulta del reflujo)}} \Rightarrow 0,3125 \quad 0,3125\text{g/ml} \times 100 = \mathbf{31.25\%}$$

$$C1 V1 = C2V2$$

2) Concentración al 12.5% del extracto acuoso de cáscara de cacao

$$V1 = \frac{12.5\% \times 100\text{ ml}}{31.25\%} \Rightarrow \mathbf{40\text{ ml}}$$

3) Concentración al 20% del extracto acuoso de cáscara de cacao

$$V1 = \frac{20\% \times 100\text{ ml}}{31.25\%} \Rightarrow \mathbf{64\text{ ml}}$$

B) Extracto acuoso de semilla de cacao:

$$1) \frac{100\text{g polvo de cáscara}}{200\text{ ml (resulta del reflujo)}} \Rightarrow 0,5\text{ g/ml} \quad 0,5\text{g/ml} \times 100 = \mathbf{50\%}$$

$$C1 V1 = C2V2$$

2) Concentración al 12.5% del extracto acuoso de semilla de cacao

$$V1 = \frac{12.5\% \times 100\text{ ml}}{50\%} \Rightarrow \mathbf{25\text{ ml}}$$

3) Concentración al 20% del extracto acuoso de semilla de cacao

$$V1 = \frac{20\% \times 100\text{ ml}}{50\%} \Rightarrow \mathbf{40\text{ ml}}$$

ANEXO N° 8: Resultado de sistema de antiplagio URKUND

ANEXO N° 8: Resultado de sistema de antiplagio URKUND



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Quito, 4 de Mayo del 2015

CERTIFICADO

Yo, Patricia Álvarez CI: 171310878-3

CERTIFICO que se ha cumplido con la revisión del trabajo de investigación: "EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE CÁSCARA Y SEMILLAS DE CACAO (THEOBROMA CACAO L.) SOBRE CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS. ESTUDIO IN VITRO."

De la estudiante Miryan Alexandra Sucuzhañay Mora CI: 172497466-0

En el sistema de antiplagio URKUND el (15 de Abril del 2015) dando como resultado el 1% de coincidencia, porcentaje que está dentro del parámetro permitido (3%) por la Unidad de Titulación, Graduación e Investigación.

Atentamente,

DR.(A) Patricia Alvarez

CI. 1713108783

MATRÍCULA 2971

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ENTREGADO
FECHA 4-05-2015
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, GRADUACIÓN Y
TITULACIÓN

ANEXO N° 9: Certificado de Resumen traducido al inglés.

A B C traducciones
inglés, francés, italiano, alemán y portugués

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
SCHOOL OF DENTISTRY

“ANTIMICROBIAL EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS FROM CACAO SHELL AND SEEDS (*Theobroma cacao* L.) ON CEPADÉ *Streptococcus mutans*, IN VITRO STUDY”

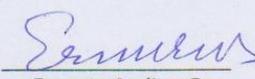
AUTHOR: Miryan Alexandra Sucuzhañay Mora
TUTOR: Dra. Patricia de Louerdes Álvarez Velasco
DATE: July 9, 2015

ABSTRACT

Dental caries of most predominant diseases of human being, that has become a public health trouble. New investigations are necessary with other substances in order to eliminate or decrease the main cause agent of such disease *Streptococcus mutans*. The purpose of the current study is assessing the antimicrobial effect of aqueous extract of cacao shell and seed on the strain of *Streptococcus mutans*, in an *in vitro* study. The obtaining of aqueous extracts is made through reflux method, by using distilled water as solvent, with a concentration of 12.5% and 20%, for which a dissolution formula was used, *Streptococcus mutans* strain was activated for 24 hours to 35 +/- 2°C, after which an inoculum of the bacterium under scale 0.5Mc. Farland was planted on 21 Petri boxes of Agar-blood culture. Afterwards, Kirby- Bauer technique was applied, with the placement of filter paper disks embedded with 20 ul of extracts. Petri boxes were incubated for 24 hours at 35 +/- 2 °C in a 5% atmosphere of CO2 and inhibition halos were measured at 24 hours, with an antimicrobial effect due to the presence of inhibition halos of up to 10 mm. Results obtained were analyzed with Mann Whitney U statistical test, with which it was concluded that no significant differences existed between the half inhibition halo of the shell and seed aqueous extract 12.5% (p=0,24) and 20% (p= 0.94); for which such compounds show a similar antimicrobial effect on *Streptococcus mutans*.

Keywords: Antimicrobial effect, *Streptococcus mutans*, cacao extracts.

I certify that I am fluent in both English and Spanish languages and that I have translated the attached abstract from the original in the Spanish language to the best of my knowledge and belief.


Ernesto Andino G.
Translator



v. 10 de Agosto N13-103 y Arenas • Edif. Génesis, 2do. Piso, Of. 207 • Telefax: 2 234 873 • Cel. 0999 710760
E-mail: ernesandino@yahoo.es • Quito - Ecuador