



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Odontología**

**Escuela Académico Profesional de Odontología**

**Actividad inhibitoria del extracto etanólico de  
*Theobroma cacao L.* sobre el crecimiento y adherencia  
in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

**AUTOR**

Josué Braisson ORIHUELA GUTIÉRREZ

**ASESOR**

Elba Estefanía MARTÍNEZ CADILLO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

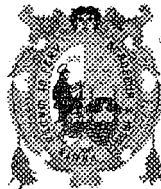
## Referencia bibliográfica

---

Orihuela J. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.* sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Académico Profesional de Odontología; 2016.

---

1480



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
VICE DECANATO ACADÉMICO  
UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE



166  
3 (e.m.)

# ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el cinco de diciembre del 2016, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista del Bachiller :

**ORIHUELA GUTIERREZ, Josué Braisson**

### CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Theobroma cacao L. SOBRE EL CRECIMIENTO Y ADHERENCIA IN VITRO DE Streptococcus mutans A ESMALTE DENTARIO**» y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demuestra un grado de aprovechamiento sobresaliente, siendo calificado con un promedio de: diecinueve 19,  
(en letras) (en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los cinco días del mes de diciembre del dos mil dieciséis.

**PRESIDENTE DEL JURADO**

Mg. C.D. Luis Alberto Cuadrao Zavaleta

**MIEMBRO**

C.D. Esp. Saúl Ilizarbe Escajadillo

**MIEMBRO (ASESOR)**

**Blg°. Elba Estefanía Martínez Cadillo**

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:  
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)  
Criterios : Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
*Theobroma cacao* L. SOBRE EL CRECIMIENTO Y ADHERENCIA  
IN VITRO DE *Streptococcus mutans* A ESMALTE DENTARIO**

## **JURADO DE SUSTENTACIÓN**

**Presidente:** Mg. Luis Alberto Cuadrao Zavaleta

**Miembro:** C.D. Saúl Ilizarbe Escajadillo

**Miembro (Asesor):** Blga. Elba Martínez Cadillo

### ***Dedicatoria***

Dedicada a mi padre José Orihuela y mi madre María Gutiérrez, por su amor, por ser mis ejemplos, mis protectores y mi mayor fortaleza, por creer en mí y aconsejarme siempre, les debo todo lo que soy y por eso les dedico este logro.

A mis hermanas Susan y Conny por su cariño, sus palabras de motivación y por mostrar siempre su apoyo en todo este camino profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero comenzar agradeciendo a Dios, por protegerme y guiar mis pasos en este camino para culminar la tesis, y sobretodo por darme la vida y la dicha del amor y el apoyo de mi familia y de mis buenos amigos.

A mis padres y hermanas, por su incondicional apoyo y consejos durante este arduo camino, siempre han sido mi fortaleza para llegar a conseguir mis metas.

A mis mejores amigos y futuros colegas, por alegrarse conmigo en cada paso que avanzaba o por sus palabras de aliento cada vez que me veía frustrado en el proceso.

A mi asesora, Blga. Elba Martínez, por su paciencia, su apoyo académico y su amistad, por su compromiso y estar presente en cada uno de los logros que se concretaban durante esta investigación.

A mis maestros y asesores, MG. Luis Cuadro Zavaleta y C.D Saúl Ilizarbe Escajadillo, por sus enseñanzas, sus acertados aportes y consejos para la culminación de esta investigación.

A la MG. Blga. Hilda Moromi Nakata; y a las Srtas. Violeta Chavesta y Luz Elena Aquino, personal del laboratorio de Microbiología de la FO-UNMSM, por apoyarme y ser parte importante en la ejecución de esta investigación.

Al Dr. Jorge Arroyo Acevedo (Fac. Farmacia y Bioquímica, UNMSM) y a la MG. Gloria Tomas Chota (Fac. Química e Ingeniería Química, UNMSM), por compartir gentilmente sus conocimientos y la asesoría en la preparación de extractos, al inicio de la investigación.

Al Sr. Saénz Hernández (Lab. Patología, FE-UPCH) y la Sra. Anela Beraun por su gentil ayuda en los cortes y confección de cuerpos de esmalte dental.

A todos mis amigos y familiares, que con una palabra de ánimo y motivación, me ayudaban a no decaer en este camino.



## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao L*, sobre el crecimiento y la adherencia *in vitro* del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario. Se evaluó el efecto sobre el crecimiento con el método de difusión en pocillos con los extractos de semilla, de cáscara y controles. Los resultados se expresaron con la medida de halos de inhibición.

Para el test de adherencia, se expuso los cuerpos de esmalte dental, con 2ml de caldo BHI +10% sacarosa +respectivo extracto. En el control positivo no se usó extracto. Se agregó 0.1ml de la suspensión del microorganismo en cada pozo (incubación por 48 horas a 37°C). Luego, los microorganismos adheridos al esmalte fueron desprendidos, diluidos 1/10, y sembrados en agar Mitis salivaris, para su lectura a las 48h. Los resultados se expresaron como UFC/ml.

Se observó mayor halo de inhibición y menor conteo de UFC/ml con el uso del extracto de cáscara, seguido por el extracto de semilla, con respecto al grupo control.

Se puede concluir que el extracto etanólico de *Theobroma cacao L*. tiene actividad inhibitoria sobre el crecimiento y adherencia *in vitro* del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario, siendo mayor el efecto del extracto de cáscara de cacao.

**Palabras claves:** *Streptococcus mutans*, *Theobroma cacao L*, actividad inhibitoria.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the inhibitory action of the ethanolic extract of *Theobroma cacao L.* over the *in vitro* growing and adherence to dental enamel of *Streptococcus mutans*. The effect over the growing was assessed with the well diffusion method using controls, cacao husk and seed extracts. The results were expressed with the measure of the zones of inhibition.

For the adherence evaluation, the dental enamel was exposed to 2mL of BHI culture+ 10% of sucrose+ the indicated extract. In the positive control, the extract was not used. It was added 0,1mL of the microorganism infusion (suspension) into each well (incubation for 48 hours at 37°C). Afterwards, the microorganisms attached to the enamel were extracted, then diluted in 1/10, and inoculated in Mitis salivaris agar for their reading after 48 hours. The results were expressed as UFC/mL.

It was observed a wider (larger) zone of inhibition and less count of UFC/mL with the use of cacao husk, followed by the seed extract in comparison to the controls.

It is concluded the ethanolic extract of *Theobroma cacao L.* has an inhibitory action over the *in vitro* growing and adherence of *Streptococcus mutans* to the dental enamel, with the cacao husk extract being the most effective.

**Key words:** *Streptococcus mutans*, *Theobroma cacao L.*, inhibitory action

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>I.- Introducción</b> .....	17
<b>II.- Problema de Investigación</b> .....	19
2.1 Área Problema.....	19
2.2 Delimitación del problema:.....	20
2.3 Formulación del Problema .....	21
2.4 Objetivos.....	21
2.4.1 Objetivo General .....	21
2.4.2 Objetivos específicos .....	21
2.5 Justificación .....	22
2.6 Limitaciones.....	22
<b>III.- Marco Teórico</b> .....	24
3.1 Antecedentes.....	24
3.2 Bases Teóricas .....	35
3.2.1. Caries dental .....	35
3.2.1.1. Generalidades y consideraciones históricas.....	35
3.2.1.2. Etiopatogenia de la caries dental.....	37
3.2.1.3. Principales microorganismos relacionados con caries dental.....	42
3.2.1.4. <i>Streptococcus</i> del grupo <i>mutans</i> .....	44
3.2.1.5. Asociación entre caries dental y <i>Streptococcus mutans</i> .....	45
3.2.1.6. Factores de virulencia del <i>Streptococcus mutans</i> .....	46
3.2.1.7. Adherencia microbiana .....	50
3.2.1.8. Mecanismos de adhesión, agregación y coagregación.....	53

3.2.2.	<i>Theobroma cacao</i> L.	
3.2.2.1.	Taxonomía y nomenclatura .....	57
3.2.2.2.	Hábitat y agronomía .....	57
3.2.2.3.	Descripción botánica .....	58
3.2.2.4.	Reseña histórica. Origen y domesticación.....	61
3.2.2.5.	Variedades de cacao.....	63
3.2.2.6.	Derivados de la semilla de cacao.....	67
3.2.2.7.	Producción y consumo en el mundo .....	72
3.2.2.8.	Producción en el Perú.....	74
3.2.2.9.	Variedades de cacao peruano: el cacao "chuncho".....	78
3.2.2.10.	Efectos adversos del cacao.....	81
3.2.3.	Compuestos fenólicos (polifenoles).....	83
3.2.3.1.	Diferentes tipos de compuestos polifenólicos y efectos en la salud .....	84
3.2.3.2.	Los polifenoles en la salud oral.....	86
3.2.3.3.	Mecanismo de acción.....	89
3.2.3.4.	El cacao como fuente de polifenoles .....	90
3.2.3.5.	Procesos que influyen en la concentración de polifenoles en la semilla de cacao.....	92
3.2.3.6.	Metodología para la extracción de compuestos fenólicos.....	96
3.2.3.7.	Metodología para la determinación y cuantificación de polifenoles totales.....	98
3.2.3.8.	Actividad de los polifenoles de cacao sobre <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> .....	99
3.2.4.	Clorhexidina	
3.2.4.1.	Características .....	101

3.2.4.2.	Mecanismo de acción .....	102
3.2.4.3.	Indicaciones .....	103
3.2.4.4.	Efectos adversos.....	104
3.3	Definición y términos básicos.....	105
3.4	Hipótesis.....	107
3.5	Operacionalización de Variables.....	108
<b>IV.- Metodología</b>	.....	<b>109</b>
4.1	Tipo de investigación .....	109
4.2	Población y muestra .....	109
4.3.	Recursos y materiales.....	110
4.4.	Procedimientos y técnicas .....	112
4.4.1	Obtención del extracto etanólico de cacao .....	112
4.4.2	Actividad antimicrobiana.....	113
4.4.3	Evaluación del extracto etanólico de cacao sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>S. mutans</i> .....	114
4.4.4	Obtención de cuerpos de prueba de esmalte dental.....	115
4.4.5	Evaluación de la actividad del extracto etanólico de cacao sobre la adherencia <i>in vitro</i> del <i>S. mutans</i> a esmalte dentario.....	115
4.6	Procesamiento de datos: .....	117
4.7	Análisis de resultados:.....	117
<b>V. RESULTADOS</b>	.....	<b>118</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	.....	<b>129</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	.....	<b>134</b>

<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>136</b>
<b>X. ANEXOS : .....</b>	<b>145</b>
10.1 Instrumentos de recolección de datos.....	145
10.2 Tablas de resultados.....	148
10.3 Cuadros y gráficos.....	151
10.4 Fotografías.....	154

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Factores etiológicos primarios.....	38
<b>Cuadro 2.</b> Factores moduladores de la caries dental.....	40
<b>Cuadro 3.</b> Características diferenciales entre las variedades de cacao “criollo”, “forastero” y “trinitario”.....	67
<b>Cuadro 4.</b> Base de datos de producción regional de cacao.....	74
<b>Cuadro 5.</b> Macrorregiones productoras de cacao en el Perú.....	78
<b>Cuadro 6.</b> Efectos en la salud de los compuestos polifenólicos de alimentos.....	87
<b>Cuadro 7.</b> Actividad inhibitoria del extracto etanólico de semilla de cacao sobre el crecimiento in vitro del <i>Streptococcus mutans</i> .....	118
<b>Cuadro 8.</b> Actividad inhibitoria del extracto etanólico de cáscara de cacao sobre el crecimiento in vitro del <i>Streptococcus mutans</i> .....	119
<b>Cuadro 9.</b> Comparación de la actividad inhibitoria de semilla y de cáscara de cacao frente a un grupo control (clorhexidina 0.12%); mediante la medición de halos de inhibición de los grupos.....	120
<b>Cuadro 10.</b> Valor P luego del test post –hoc de Bonferroni para los pares de grupos....	122
<b>Cuadro 11.</b> Adherencia <i>in vitro</i> sobre esmalte dental mediante recuento de UFC/ml, después del uso de extracto etanólico de semilla de cacao.....	123
<b>Cuadro 12.</b> Adherencia <i>in vitro</i> sobre esmalte dental mediante recuento de UFC/ml, después del uso de extracto etanólico de cáscara de cacao.....	124
<b>Cuadro 13.</b> Adherencia <i>in vitro</i> sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, en un grupo control (sin extracto).....	125
<b>Cuadro. 14.</b> Comparación de la adherencia <i>in vitro</i> sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, en los grupos de extracto etanólico de semilla (A), cáscara (B) y grupo control (C).....	126
<b>Cuadro 15.</b> Valor P luego de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.....	127

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la Triada de Treyes, 1960.....	38
<b>Figura 2.</b> Modelo de Newburn, 1978 (Esquema de Keyes modificado).....	39
<b>Figura 3.</b> Diagrama pentafactorial de Uribe –Echevarria y Priotto (1990).....	39
<b>Figura 4.</b> Esquema de la etiología multifactorial de la caries. ....	41
<b>Figura 5.</b> Esquema del modelo holístico. BJERTNESS y col. 1992.....	41
<b>Figura 6.</b> Órganos vegetativos y reproductivos del cacao.....	60
<b>Figura 7.</b> Templo forma de espiral Palanda –Ecuador.....	62
<b>Figura 8.</b> Botella de cerámica con huellas de almidón de cacao con antigüedad de 5 200 años.....	63
<b>Figura 9.</b> Descubrimiento arqueológico de semillas de cacao.....	63
<b>Figura 10.</b> Reconocimiento al Plan Binacional de desarrollo arqueológico entre Perú y Ecuador - Exhibicion fotográfica V Salón del cacao y chocolate, Julio 2014.....	63
<b>Figura 11.</b> Mazorca de cacao, variedad criollo.....	65
<b>Figura 12.</b> Mazorca de cacao, variedad forastero. (a) Del alto amazonas. (b) Del bajo amazonas.....	65
<b>Figura 13.</b> Mazorca de cacao, variedad trinitario.....	66
<b>Figura 14.</b> Diagrama industrial del proceso de elaboración de derivados de cacao.....	68
<b>Figura 15.</b> Colocación de semillas de cacao en el molino y obtención del licor de cacao.....	69
<b>Figura 16.</b> Manteca de cacao y sus usos.....	69
<b>Figura 17.</b> Torta natural de cacao obtenida luego del proceso de prensado.....	70
<b>Figura 18.</b> Polvo de cacao.....	70
<b>Figura 19.</b> Diferentes presentaciones de chocolate.....	71
<b>Figura 20.</b> Cáscara de cacao.....	72
<b>Figura 21.</b> Países productores de cacao en el mundo.....	73
<b>Figura 22.</b> Principales zonas de cultivo de cacao en el Perú. 2006.....	74



<b>Figura 23.</b> Producción de cacao por Departamentos –MINAG 2008.....	75
<b>Figura 24.</b> Producción en toneladas y hectáreas de cacao en el Perú. MINAG 2012.....	76
<b>Figura 25.</b> 5to Salón del cacao y chocolate, realizados los días 4, 5,6 julio 2014- Parque de la Reserva, Lima.....	77
<b>Figura 26.</b> Ubicación geográfica de la provincia de La Convención –Región Cuzco.....	79
<b>Figura 27.</b> Mazorca y semillas de cacao, variedad “Chuncho”.....	81
<b>Figura 28.</b> Estructura química de los fenoles.....	83
<b>Figura 29.</b> Estructura básica de los flavonoides sin sustituyentes.....	84
<b>Figura 30.</b> Porcentaje de polifenoles en semilla de cacao.....	91
<b>Figura 31.</b> Partido apropiado del fruto de cacao para la obtención de semillas.....	93
<b>Figura 32.</b> Cajones de madera para fermentar semillas de cacao, .....	93
<b>Figura 33.</b> Secado en hornos a leña de las semillas de cacao fermentadas.....	94
<b>Figura 34.</b> Secado al sol de semillas de cacao fermentado.....	94
<b>Figura 35.</b> Tostado artesanal de semillas de cacao.....	95
<b>Figura 36.</b> Estructura química de la clorhexidina.....	101

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Media del halo de inhibición del grupo con extracto de semilla de cacao (en mm).....	118
<b>Gráfico 2.</b> Media del halo de inhibición del grupo con extracto de cáscara (en mm).....	119
<b>Gráfico 3.</b> Comparación de la media de los grupos experimentales y el control positivo..	121
<b>Gráfico 4.</b> Recuento de UFC/ml del grupo sometido a extracto etanólico de semilla de cacao. (Grupo A).....	123
<b>Gráfico 5.</b> Recuento de UFC/ml del grupo sometido a extracto etanólico de cáscara de cacao (Grupo B).....	124
<b>Gráfico 6.</b> Recuento de UFC/ml del grupo control positivo (Grupo C).....	125
<b>Gráfico 7.</b> Recuento de UFC/ml entre los grupos A, B y C.....	127

## **INDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Ficha de registro de actividad inhibitoria.....	145
<b>Anexo 2.</b> Ficha de registro del diámetro del halo de inhibición .....	146
<b>Anexo 3.</b> Ficha de registro del test de adherencia.....	147
<b>Anexo 4.</b> Medidas del diámetro de halo de inhibición en placas de agar TSA.....	148
<b>Anexo 5.</b> Recuento de UFC/ml en placas de Agar mitis salivaris.....	149
<b>Anexo 6.</b> Cuantificación de compuestos fenólicos por método de Folin –Ciocalteu.....	150
<b>Anexo 7.</b> Disposición de los pocillos en las placas Petri (diagrama).....	151
<b>Anexo 8.</b> Fluxograma del test de adherencia.....	152
<b>Anexo 9.</b> Fotografías.....	154

## I. INTRODUCCIÓN

La caries dental sigue siendo la enfermedad bucal más prevalente, en nuestro país con altos porcentajes de prevalencia, identificándose en ella al *Streptococcus mutans* como principal agente microbiano, gracias a su gran afinidad sobre las superficies dentales debido a fenómenos de adhesión, agregación y coagregación, que utiliza para multiplicarse y colonizar los tejidos, iniciando así la caries dental. Dentro de las estrategias para disminuir y controlar esta enfermedad, se recurre a derivados de productos naturales, usados como medicina casera, que tienen esos efectos medicinales gracias a sus compuestos bioactivos que actúan, entre otros efectos, como antimicrobianos.

En este caso el *Theobroma cacao* L., es muy rico en polifenoles y flavonoides que actúan como antioxidantes, mejorando la salud cardiovascular, cerebrovascular así como en la prevención de cáncer y otras enfermedades degenerativas e infecciosas; y a su vez se ha determinado beneficios en la salud bucal. El posible efecto protector del cacao en la caries dental está recibiendo cada vez más atención, el cual podría radicar en la rica cantidad de polifenoles que muestran actividad anti-glucosiltransferasa sobre el *Streptococcus mutans*.

Recientes investigaciones colocan a la cuenca del Amazonas como centro de origen del cacao, afirmando que el Perú cuenta con la mayor diversidad genética de este fruto. El cacao peruano cada vez toma mayor importancia en nuestro país, no solo por su aporte nutricional y beneficios para la salud, sino también al ofrecer una alternativa para comunidades agrícolas en reemplazo al cultivo de hoja de coca, constituyéndose en un sustento lícito y de gran proyección.

Por estos motivos se decidió evaluar sus posibles beneficios en la salud bucal, específicamente frente a la caries dental, al ser esta la enfermedad estomatológica más prevalente en nuestro país. Un mejor conocimiento de los polifenoles de la dieta y sus principales fuentes, como el cacao peruano, y los efectos que tiene frente al

*Streptococcus mutans*, podría ofrecer una intervención de salud pública muy económica en la prevención de caries dental.

## II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 2.1 Área problema

Una de las principales enfermedades del sistema estomatológico es la caries dental y como parte de los retos de la odontología en la actualidad está la búsqueda de sustancias capaces de inhibir o disminuir los efectos negativos de esta enfermedad sobre los tejidos bucales.<sup>1</sup> En esta búsqueda, aparecen las sustancias de origen natural, obtenidas de plantas o frutos, cuyo aporte al ámbito odontológico viene siendo estudiado en los últimos años.

Desde 1977, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incentivado el estudio de estas plantas, con el objetivo de respaldar científicamente los beneficios y los riesgos de su utilización en medicamentos fitoterapéuticos. A pesar de ello, faltan todavía evidencias experimentales y clínicas sobre la eficacia y la seguridad en su empleo.<sup>2</sup>

Este uso de plantas medicinales en odontología se observa bajo su forma científica mediante preparados tales como pasta dental, pasta tópica, enjuagues bucales, colutorios, etc; para el tratamiento de gingivitis, aftas, odontalgias, procesos inflamatorios; como fungicidas y antibacterianos.<sup>3</sup>

El uso de antimicrobianos y antisépticos, se ha utilizado conjuntamente con las técnicas de cepillado, a fin de controlar la placa dentobacteriana, y con ella al microorganismo más importante en la iniciación de la caries dental: *Streptococcus mutans*, que tiene la capacidad de adherir, colonizar, crecer, sintetizar polisacáridos extracelulares que le dan la capacidad de adherirse a la superficie dentaria y producir ácidos que deterioran con el tiempo el tejido dentario.<sup>4</sup> La adhesión de células bacterianas a la superficie de los dientes es de vital importancia para el inicio de la lesión cariosa.<sup>2,4</sup> De esta manera, se conducen las medidas preventivas a la

disminución o eliminación de esta bacteria y/o de sus mecanismos patogénicos en la cavidad bucal, a fin de evitar el inicio de la caries.

Uno de estos productos naturales que evidencian actividad antimicrobial sobre *Streptococcus mutans* es el cacao (*Theobroma cacao L.*),<sup>1,5,6,7,8,9</sup> debido al alto contenido de compuestos fenólicos (polifenoles) tanto en la semilla como la cáscara. Sus beneficios se han visto relacionados principalmente con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares, debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Además de ello, los polifenoles ejercen actividad preventiva contra las infecciones y enfermedades degenerativas incluyendo las enfermedades de la cavidad oral, como la caries dental.<sup>5</sup>

## **2.2 Delimitación del problema**

Los polifenoles (pps) son metabolitos reactivos abundantes en alimentos derivados de plantas, sobre todo frutas, semillas y hojas, tales como el cacao, el té, la manzana y los arándanos.<sup>5</sup> Para el caso del cacao, este posible efecto protector que tiene frente a la caries dental, está recibiendo cada vez mayor atención. Esto debido a que los polifenoles presentes en el cacao evidencian actividad inhibitoria sobre algunas enzimas, entre ellas la glucosiltransferasa, así como disminuye la producción de ácidos y síntesis de glucanos por parte de *Streptococcus mutans*.<sup>1,7</sup> Los polifenoles presentes en el cacao son los responsables del color en sus semillas, así mismo existen estudios que reportan un alto contenido de polifenoles en la cáscara de cacao, los cuales tienen actividad antiglucosiltransferasa y actividad antibacterial,<sup>1,8,9</sup> pudiendo modificar así los mecanismos de adherencia del *Streptococcus mutans* sobre la superficie dentaria y con ello disminuir progresivamente la iniciación de caries. Por lo tanto puede inferirse que este producto tiene efecto inhibitorio sobre el

crecimiento del *Streptococcus mutans*, así como reduciendo su capacidad de adherencia al tejido dental.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.*, sobre el crecimiento y la adherencia del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario.

## **2.3 Formulación del problema**

¿Cuál es la actividad del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.* sobre el crecimiento y adherencia *in vitro* del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario?

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1 Objetivo general**

- Determinar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de cacao sobre el crecimiento y adherencia *in vitro* del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario.

### **2.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de semilla de cacao sobre el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans*.
- Determinar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de cáscara de cacao sobre el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans*.
- Comparar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de semilla y de cáscara de cacao sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*, frente a un grupo control (clorhexidina 0.12%); mediante la medición de halos de inhibición de los grupos.



- Determinar la adherencia *in vitro* sobre esmalte dental mediante recuento de UFC/ml, después del uso de extracto etanólico de semilla de cacao.
- Determinar la adherencia *in vitro* sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, después del uso de extracto etanólico de cáscara de cacao.
- Determinar la adherencia *in vitro* sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, en un grupo control (sin extracto).
- Comparar la adherencia *in vitro* sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, en los grupos de extracto etanólico de semilla, cáscara y grupo control.

## 2.5 Justificación

Diversos estudios han demostrado la actividad antibacterial de muchos compuestos naturales, siendo poco frecuente su uso odontológico. Sin embargo existen reportes de algunos con actividad anticariogénica como el té verde, el café, el propóleo, la manzanilla, el tomillo.<sup>2, 4, 10, 11, 12, 13</sup> En el caso del cacao, se atribuye sus efectos inhibitorios a los polifenoles que forman parte de este fruto, presentes en la semilla y la cáscara del cacao, y cuyas concentraciones pueden verse modificadas tras los procesos de industrialización.<sup>14,15</sup> Los polifenoles, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua,<sup>16</sup> por ello se decidió evaluar el extracto etanólico de este fruto. Si bien es cierto existen estudios que reportan la actividad antibacteriana del cacao, incluso de sus derivados,<sup>17,18</sup> no se reportan estudios sobre sus efectos en la adherencia de patógenos como el *Streptococcus mutans* a tejidos duros, siendo de importancia su evaluación al ser este proceso el principal mecanismo para el inicio de la lesión de caries. Al ser éste uno de los países con mayor producción de cacao en América

latina, y teniendo una importante diversidad genética de este fruto, es importante evaluar su posible aporte al ámbito odontológico con esta investigación, contribuyendo como una alternativa más en la prevención y tratamiento de la caries dental, siendo esta una de las enfermedades bucales más prevalentes en el mundo, razón por la cual es necesario la búsqueda de alternativas que contribuyan en la prevención y disminución de consecuencias que este padecimiento provoca.

## 2.6 Limitaciones

- La principal limitación para el presente estudio fue determinar el tipo de extracción que se realizaría a la muestra de semilla y de cáscara de cacao (extracto acuoso, etanólico, metanólico, etc); ya que estudios anteriores describían diversas formas de extractos, unos más complejos que otros.<sup>19,20,21</sup> Para lo cual se realizaron varias pruebas pilotos hasta determinar que el extracto acuoso simple no mostraba los resultados que se esperaban, incluso modificando las concentraciones; por ello se decidió hacer un extracto etanólico y además un recuento de polifenoles totales en cada muestra, para determinar la concentración final que se utilizaría para la etapa de ejecución.
- Otra limitante fue la obtención de los cuerpos de prueba, para lo cual se requirió de tiempo suficiente hasta conseguir la cantidad de molares necesarias, y luego los cortes que se realizaron hasta conseguir los cuerpos de prueba de esmalte dental, usados en la etapa de ejecución.
- Se observa que en el país no existe investigaciones sistematizadas de la actividad antibacteriana del *Theobroma cacao* L. frente al *Streptococcus mutans*, mucho menos frente a sus mecanismos de adhesión a tejidos duros.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 ANTECEDENTES

**Nasution A I, y Zawil C. (2014):** analizaron la diferencia de la microdureza del esmalte, en superficies tratadas con fluoruro y otras tratadas con teobromina. Las muestras de esmalte, derivadas de 42 premolares recién extraídos, fueron divididas en 2 grupos, uno tratado con teobromina 2% y el otro con fluoruro 2%. Las medidas de dureza fueron calculadas por probador de dureza Shimadzu HMV2. La media del número de dureza en el grupo de fluoruro: antes fue 321,33 VHN (rango: 320-323 VHN) y después fue 355,48 VHN (rango: 351-358 VHN). La media del número de dureza en el grupo de teobromina: antes era 319,99 VHN (rango: 319-321 VHN) y después fue 341,14 VHN (rango: 340-342 VHN). El resultado mostró que la muestra sometida a fluoruro tiene mayor número de dureza que la muestra donde se aplicó teobromina. Se concluyó que la aplicación de flúor y teobromina son igualmente capaces de aumentar la dureza de la superficie del esmalte. Además, la dureza de la superficie del esmalte mediante la aplicación de flúor es mayor que la teobromina.<sup>22</sup>

**Kargul, B. y col (2012):** los objetivos de este estudio in vitro fue investigar el efecto de la teobromina, derivada del *Theobroma cacao* L., a dos concentraciones en la dureza de la superficie y la topografía de esmalte humano. Se utilizaron 24 recién extraídos terceros molares humanos que fueron recogidos y almacenados en agua destilada con una solución de timol 0,1% a temperatura ambiente antes de los experimentos. Las muestras de esmalte se trataron con una capa de teobromina a dos concentraciones (100 mg / l o 200 mg / l en agua destilada) durante 5 min. Superficies de esmalte en el grupo de control no recibieron la teobromina. Después se mantuvieron en agua destilada durante 1 semana y se sometieron a análisis por microscopia electrónica de barrido SEM. Los especímenes fueron desmineralizados

almacenándolos en hidroxietilcelulosa ácida durante tres días. Después de las mediciones de microdureza de línea de base, se incubaron ya sea en 100 o 200 mg/l teobromina durante 5 min. El grupo control se mantuvo en agua destilada. Después de lavar los especímenes bajo el agua destilada, que se mantuvieron en una solución remineralizante durante 18 h. La microdureza de la superficie del esmalte se determinó inicialmente para cada muestra antes de la desmineralización artificial. Después de la desmineralización, los grupos experimentales se incubaron en 100 mg o 200 mg de teobromina y los especímenes del grupo control fueron colocados en solución remineralizante. Las superficies de esmalte del grupo de control sin tratamiento presentan una superficie generalmente lisa, con pequeñas líneas. Las muestras tratadas con teobromina mostraron diferencias entre las dos concentraciones. El grupo tratado con 200 mg/l solución durante 5 min mostró una mayor cantidad de glóbulos sobre el esmalte que los que hizo los especímenes tratados con 100 mg/l de solución. Se observa el efecto protector que tiene la teobromina sobre la superficie del esmalte, considerando así que el posible efecto cariostático de extracto de cacao es debido a la alteración física de la superficie del esmalte por teobromina. <sup>23</sup>

**Cuéllar, O. y col (2012):** evaluaron la actividad antibacteriana de diferentes fracciones de la cáscara de cacao, mediante el método de difusión en agar, empleando cepas autóctonas y de referencia ATCC. Posteriormente se hizo un análisis de estas fracciones por HPLC y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Se evaluó su efecto frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus agalactiae* aislado de un paciente; *Escherichia coli* “resistente a amoxicilina” aislada de pollo y *Candida albicans* ATCC 10231. La fracción clorofórmica, en acetato de etilo y butanólica se solubilizaron en DMSO al 99% a las concentraciones de 100, 50 y 25 µg/µl. El bioensayo se realizó por el método de difusión en agar, una modificación del método desarrollado por Kirby-Bauer. Cada

bacteria fue replicada en dos tubos de ensayo con el medio líquido infusión–cerebro–corazón (BHI) y caldo Sauboraud para *Candida albicans* ATCC 10231. La fracción clorofórmica presentó actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Streptococcus agalactiae* (autóctona), con porcentajes de inhibición de 34.90% (100 µg/µl) y 52.40% (100 µg/µl) respectivamente. También se evidenció una concentración mínima inhibitoria de 512 µg/ml frente a *Bacillus cereus* ATCC 11778 y de 128 µg/ml frente a *Streptococcus agalactiae*. Los resultados del análisis cuantitativo por HPLC de la fracción clorofórmica de la cáscara de cacao, indicaron que el alcaloide mayoritario fue la cafeína. Las fracciones en acetato de etilo y butanólica no presentaron actividad antibacteriana. Se concluye que la fracción clorofórmica resultó promisoría inhibiendo el crecimiento de *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Streptococcus agalactiae*.<sup>21</sup>

**Suazo, Y. (2012):** evaluó el efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración de polifenoles totales (PT) y actividad antioxidante (AA) del cacao nicaragüense de la variedad trinitario. Los tratamientos de tostado fueron 110 °C por 90 min, 130 °C por 60 min y 150 °C por 45 min. Se evaluaron 3 grupos de cacao: cacao sin fermentar (CSF), cacao fermentado de baja calidad (CF –BC) y cacao fermentado de alta calidad (CF –AC). Para la cuantificación de PT se empleó el método de Folin-Ciocalteu, y para estimar la AA el método DPPH. Se comprobó que las muestras presentaron valores en PT semejantes a las reportadas en la bibliografía para cacaos de la misma u otras variedades y procedencias. La muestra CSF presentó una riqueza polifenólica, una AA y una intensidad de color muy superior a las muestras fermentadas, así como un color más rojizo. El **tostado provocó una disminución significativa de la riqueza en polifenoles** de las semillas, no así de la actividad antioxidante que, o bien no varió o bien aumentó, sobre todo tras el tostado a 150°C. <sup>14</sup>

**Gil, J. (2012):** evaluó la estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización, mediante el rastreo de un mismo lote de cacao seleccionado durante todas las etapas de pos cosecha y transformación, con el fin de detectar el impacto que tienen sobre la cantidad de catequinas y actividad antioxidante, con el uso de un método analítico validado. Para la cuantificación de polifenoles totales (PT) se usó el método de Folin – Ciocalteu, y para la identificación y cuantificación de catequinas y xantinas se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). De esta manera se determinó que el contenido de metabolitos y la actividad antioxidante de los productos intermedios, disminuyó durante todas las etapas de procesamiento, específicamente durante la fermentación y el secado al sol, se observa una pérdida considerable en el contenido de polifenoles. Además se estableció que el secado en horno infrarrojo, permite la conservación de los polifenoles, siendo más eficiente en términos de tiempo y por tanto podría ser utilizado para la producción de alimentos con valor agregado desde etapas tempranas de industrialización. <sup>15</sup>

**Mariani, M. y col (2010):** Se determinó el efecto bacteriostático del extracto de semillas de *Theobroma cacao L.*, sobre el crecimiento in vitro de cepas puras de *Streptococcus mutans*. Se trató de un estudio *in vitro* destinado a la evaluación de presencia de inhibición y el tamaño del halo formado alrededor de las bacterias, las cuales fueron sometidas a la acción del cacao en concentraciones comprendidas entre 0% y 17,5%, de un extracto acuoso preparado a partir de la dilución de polvo de cacao y agua destilada, respetando las proporciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas. Los resultados arrojaron 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: *Streptococcus mutans*.<sup>1</sup>

**Rosas, M. (2009):** El propósito de este trabajo fue el análisis del efecto *in vitro* de 04 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*; para ello se evaluaron de manera independiente los efectos del polvo de cacao, manteca de cacao, chocolate no azucarado y el chocolate azucarado. Se realizó un sembrado de *Streptococcus mutans* en 27 placas petri divididas en 3 grupos de 9 placas cada uno, para diluciones a 5%, 10% y 15%. Se colocó los discos de difusión preparados con las diluciones mencionadas, para todos los derivados de cacao, y agua bidestilada como grupo control. Se llevaron a incubación a 37°C en microanaerobiosis por espacio de 18 horas. Al posterior análisis se obtuvo la generación de halos de inhibición de pequeña longitud para el cacao en polvo, chocolate no azucarado y chocolate azucarado; y la generación de halos de inhibición de gran longitud para la manteca de cacao; así mismo no se generó halo inhibitorio en el grupo control de agua bidestilada, por lo que se concluyó que los 04 derivados comerciales de cacao presentan efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*.<sup>17</sup>

**Padilla, F. y col (2008):** se evaluó, en una serie de productos de origen vegetal, la relación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante. Los polifenoles fueron determinados luego de su extracción en solución metanólica por el método de Folin - Ciocalteu. La actividad antioxidante fue evaluada usando los métodos del  $\beta$ -caroteno/linoleato, el poder reductor, y la actividad antirradical. Los productos estudiados fueron las semillas y/o pericarpios de: *Theobroma cacao* (cacao), *Campsiandra comosa* Benth (chiga), *Sorghum bicolor*, L. Moench (sorgo), *Melicoccus bijugatus* (mamón). El pericarpio del mamón presentó el más bajo contenido de polifenoles (1,40 EAGg/100g) y el cacao el más alto (6,66 EAGg/100g). El poder reductor del cacao resultó ser el más alto. Asimismo, las semillas de chiga y de cacao presentaron una actividad antioxidante, comparable a la del butil

hidroxianisol antioxidante sintético. El contenido de polifenoles totales se correlaciona bien con la actividad antioxidante. <sup>24</sup>

**Srikanth, R.K y col (2008):** Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto de cáscara de cacao sobre la acumulación de placa y el recuento de *Streptococcus mutans*, cuando se utiliza como un enjuague bucal para niños. Se les instruyó para que se abstengan de sus prácticas de higiene oral de rutina hasta la mañana del cuarto día; utilizando un enjuague bucal placebo. En el cuarto día, se recogió saliva de cada sujeto para el análisis microbiológico y la placa fue revelada contabilizada mediante el índice de Quigley y Hein placa modificado; más tarde, se limpiaron los dientes. Después de 1 semana, se les dio el extracto de cáscara de cacao como enjuague bucal, siguiendo el protocolo anterior. Cuando el tratamiento con el extracto de cáscara de cacao se comparó con el tratamiento con placebo, hubo una reducción del 20,9% en los recuentos de estreptococos mutans y una reducción de 49,6% en la puntuación de la placa con el anterior, que fue altamente significativa ( $P < 0,001$ ). Estos hallazgos muestran que el extracto de cáscara de cacao redujo significativamente la deposición de placas y el recuento de *S. mutans* cuando se utiliza como enjuague bucal. <sup>58</sup>

**Smullen J y col (2007):** El objetivo de esta investigación fue determinar la medida a la que una variedad de ingredientes alimenticios, tanto comercialmente disponible y recién extraído y elegidos por su contenido de polifenoles, tenía actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* y otras bacterias orales y no orales. Los efectos sobre la adhesión de *S. mutans* al vidrio, también se estudió. Entre los productos evaluados estaba el té verde, té negro, extracto de semilla de uva, extracto de menta, canela en polvo, limón concentrado, concentrado de vino tinto, así como extracto de cacao fermentado y sin fermentar. Se evaluó los extractos en base a propanona acuosa (P70) al 70%. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de cacao sin



fermentar fue de 4mg/ml, y del cacao fermentado 8mg/ml, al igual que del licor de cacao.

En conclusión, los extractos de plantas que contienen niveles altos de polifenoles inhibieron el crecimiento de *S. mutans* y otras bacterias. La inhibición de *S. mutans* se produjo en presencia tanto de sacarosa y glucosa, la producción de ácido también se redujo. La adhesión de *S. mutans* al vidrio también se inhibió, lo que demuestra que estos extractos pueden tener un papel en la prevención de la caries.<sup>25</sup>

**Carretto, C. y col (2007):** realizó un estudio *in vitro* donde evaluó el efecto que tiene el té del tomillo sobre la adherencia del *S. mutans* a cuerpos de prueba de esmalte dental, mediante un test de adherencia. Para ello fueron confeccionados 30 cuerpos de prueba de esmalte dental obtenidos a partir del corte de terceras molares. (15 grupo tomillo y 15 grupo control). El test de adherencia fue realizado colocando el cuerpo de prueba en contacto con el medio de cultivo, la suspensión del microorganismo y el té de tomillo o agua destilada (control) por 24 horas a 37 °C. Luego los microorganismos adheridos a los cuerpos de prueba, fueron dispersos, diluidos y sembrados en medio de cultivo para determinar el número de unidades formadoras de colonias. (UFC/ml). Se obtuvo como resultados similar adherencia entre los grupos control y experimental, por tanto el té de tomillo no presenta efecto sobre la adherencia de *S. mutans*.a esmalte dental.<sup>2</sup>

**Percival RS. y col (2006):** evaluaron el efecto de los polifenoles derivados del cacao sobre el crecimiento, metabolismo y formación de biofilm por *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. El objetivo de este estudio fue determinar si los polifenoles del cacao podrían interferir con la formación de biopelículas por *Streptococcus mutans* o *Streptococcus sanguinis*, y reducir la producción de ácido a partir de sacarosa por *S. mutans*. La actividad antimicrobiana de los polifenoles del cacao se evaluó contra bacterias cariogénicas *S. mutans* y *S. sanguinis* asociados a

las especies mediante ensayos de concentración inhibitoria mínima. Los dímero, tetrámero, pentámero de polifenol del cacao, inhibieron el crecimiento de *S. sanguinis*, mientras que el crecimiento de *S. mutans* no se vio afectado. Sin embargo, el pretratamiento de las superficies con pentámero de polifenoles de cacao (35 lm) redujo la formación de biofilm por *S. mutans* a las 4 y 24 h, mientras que los efectos sobre *S. sanguinis* fueron menos consistentes. Los pentámeros de polifenoles de cacao (500 lm) redujeron significativamente además el pH terminal, y se inhibió la tasa de producción de ácido por *S. mutans* a pH 7,0.

En conclusión, los polifenoles de cacao pueden reducir la formación de biopelículas por *S. mutans* y *S. sanguinis*, e inhibir la producción de ácido por *S. mutans*.<sup>7</sup>

**Kyoung, K. y col (2004):** Procuraron la extracción y fraccionamiento de inhibidores de glucosiltransferasa (GTF) a partir de la cáscara del grano de cacao, este proceso de separación es también capaz de una alta recuperación de polifenoles que beneficiarían a la salud. El objetivo fue comparar la actividad anti –GTF y el contenido de polifenoles (mediante reactivo de Folin –Ciocalteu) de cada extracto obtenido en diversas condiciones a partir de cáscara de grano cacao, con los de otros productos comerciales. Se obtuvo como resultados que las condiciones óptimas para la recuperación a partir de la cáscara del grano de cacao con una alta actividad anti-GTF y un alto contenido en polifenoles, es bajo extracción con solvente acuoso de acetona 50% a 60° C durante 4 h, seguido de fraccionamiento con solvente acuoso de etanol al 50% con base de resina estireno. El extracto de la cáscara del grano de cacao obtenido en estas condiciones mostró 2 y 12 veces mayor actividad inhibitoria contra GTF y un similar contenido de polifenoles en comparación a los otros dos productos disponibles en el mercado. <sup>8</sup>

**Ito, K. y col. (2003):** intentaron demostrar las propiedades anticariogénicas del extracto acuoso de polvo de cacao; el cual se adiciono a un modelo de dieta cariogénica en base a chocolate blanco con 35 % de sacarosa, a un grupo de ratas, las cuales fueron separados al azar en cuatro grupos experimentales, conteniendo cada grupo 9 ratas. Todas las ratas de los tres grupos (excepto el grupo de control no infectado), se infectaron al día durante 6 días consecutivos (del 21 al 26 días de edad) con 0,1 ml de una suspensión celular que contenía 50 ug de estreptomina y aproximadamente  $4 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus sobrinus* 6715. Todos los grupos fueron expuestos al extracto de polvo de cacao disuelto, pero la alimentación fue distinta para los grupos. El grupo control y uno de los grupos infectados se alimentaron con una dieta cariogénica libre de chocolate blanco, y los otros dos grupos con la dieta cariogénica y chocolate blanco adicional. Concluyó la evaluación a los 56 días, obteniéndose puntajes de caries en base a una plantilla elaborada (escala de medición por conteo de lesiones cariosas). El grupo control obtuvo puntaje de 10, el grupo infectado, pero sin dieta de chocolate blanco obtuvo 35, mientras que los grupos infectados y con una dieta rica en chocolate blanco lograron un puntaje mayor a 10 y menor a 20, en la escala de medición. Las puntuaciones de las caries del grupo CEPWS -WC eran 87% inferiores a los del grupo de control infectado ( $p < 0,01$ ). También eran 65% inferiores a los del grupo WC ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que la adición de este extracto de cacao, a los alimentos cariogénicos podría ser útil en el control de la caries dental. <sup>6</sup>

**Landucci, L .y col (2003):** determinaron el efecto de diferentes soluciones de café sobre la adherencia del *S. mutans* a la superficie del vidrio. Las soluciones de café fueron preparadas con agua destilada, obteniendo 4 grupos experimentales (solución de café simple al 8% y 16%; y solución de café hervido al 8% y 16%) y 1 grupo control (agua destilada). Todas las diferentes soluciones de café y el control se

colocaron en 20 tubos de ensayo conteniendo caldo BHI deshidratado y 10% sacarosa. Bengalas de vidrio de tamaño establecido fueron insertadas en cada uno de los tubos, los cuales fueron esterilizados en autoclave. Para la verificación de adherencia bacteriana al vidrio, las cepas de *S. mutans* GS 5 mantenidas en caldo BHI a 37°C en microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) fueron lavadas en tampón fosfato 0,01M (pH 7,0) y resuspendidas en el mismo tampón hasta la obtención de 10<sup>6</sup> células/mL, determinada en escala de Mac Farland. A continuación, 10<sup>5</sup> células/mL fueron transferidas para cada tubo en los veinte grupos experimentales. Después de la agitación e incubación por 90 minutos a 37°C en microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>), las bengalas fueron lavadas en solución tampón fosfato y transferidas para tubos que contenían el mismo tampón. Las bacterias que absorbieron las bengalas fueron dispersadas utilizando el agitador de tubos (Vortex), diluídas 10 y 100 veces y transferidas para placas con medio de cultivo agar BHI enriquecido de 10% de sacarosa. Después de 48 horas de incubación a 37°C en microaerofilia, el número de UFC/mL fue determinado y los resultados fueron analizados estadísticamente. Se concluye que la solución de café simple y hervido redujeron significativamente la adherencia de *S. mutans* GS5 al vidrio, siendo la solución de café hervido al 16%, la más efectiva. <sup>4</sup>

**Osawa, K. y col (2001):** identificó sustancias cariostáticas en la cáscara de grano de cacao: algunas de actividad anti –GTF y otras actividad antibacterial. Se realizó en el estudio cromatografía de alto peso molecular, que reveló compuestos polifenólicos y ácidos grasos insaturados como componentes activos. Entre los compuestos polifenólicos que muestran actividad anti –GTF, están las catequinas, epicatequinas, y entre los ácidos grasos que mostraron actividad bactericida sobre *S. mutans*, los ácidos oleico y linoleico. <sup>9</sup>

**Ooshima, T. y col (2000):** fue examinada la actividad inhibitoria del extracto de cáscara de grano de cacao *in vitro*, en la inducción de la caries y en el desarrollo de la misma, en ratas infectadas con *S. mutans*. El extracto de cacao redujo la tasa de crecimiento de casi todos los *Streptococcus* orales, lo que dio lugar a una reducción en la producción de ácidos. Por otra parte la síntesis de glucanos insolubles por la glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans* MT8148R y *Streptococcus sobrinus* 6715 fue significativamente inhibida por el extracto de cáscara de grano de cacao. Lo cual revela que este extracto posee gran potencial anticariogenico. Para la investigación en animales se utilizó 75 ratas divididas al azar en 5 grupos para su estudio, se les administro una dieta usual y el aditamento de agua con diversas concentraciones del extracto de la cáscara de la semilla de cacao. Los resultados mostraron una inhibición de caries en aquellos grupos que recibieron una concentración del extracto de cáscara de semilla de cacao mayor al 5%. <sup>18</sup>

## **3.2 BASES TEÓRICAS**

### **3.2.1 CARIES DENTAL**

#### **3.2.1.1 Generalidades y consideraciones históricas**

Según Bhaskar, la caries dental es la enfermedad más común del ser humano.<sup>26</sup> Tan antigua, como el ser humano, la caries dental es una de las enfermedades cuyos índices la ubican entre las más frecuentes, constituyendo el más grave problema para los programas de salud bucal en el mundo.<sup>31</sup>

La creencia que se mantuvo con obstinación hasta el siglo XVIII, de que un gusano dental causaba la caries, fue modificándose con las investigaciones. Parmlly, en 1819, observo que las caries comenzaban en los lugares donde se producía estancamiento de los alimentos. Roberts en 1835, formulo su teoría sobre la fermentación y putrefacción de los restos de alimentos acumulados en los dientes. Para 1882, W.D Miller, discípulo del famoso investigador alemán Koch, propone una teoría basada en la de Roberts y en la que sostiene también la presencia de microorganismos (teoría química –parasitaria), con esto se esperaba que la caries se desarrolle como resultado del metabolismo de las bacterias, que producen ácidos a partir de hidratos de carbono que provienen de la dieta.<sup>26</sup>

Si bien estos conceptos aportaron en la búsqueda de la etiología de la enfermedad, lo cierto es que actualmente el concepto se ha visto modificado, debido a la intervención de otros elementos.<sup>26</sup>

La caries dental es una enfermedad dentaria, infecciosa y transmisible, compleja y multifactorial, que se caracteriza por la desintegración progresiva de sus tejidos calcificados debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta.<sup>31</sup> Como resultado ocurre la desmineralización

de la porción mineral y la siguiente desintegración de la parte orgánica del diente. En ella, un amplio grupo de factores biológicos, socio-económicos y culturales interactúan, directa o indirectamente en el establecimiento y desarrollo de los microorganismos cariogénicos incluidos en la comunidad microbiana de la biopelícula dental. <sup>27,31</sup>

Sus efectos destructivos en la estructura dental, su elevada prevalencia en los tiempos actuales y sus efectos sociológicos como una enfermedad biosocial, hacen considerar a la caries dental como una enfermedad crónica, causante de la destrucción localizada de las estructuras dentales (esmalte, dentina, cemento) debido a los ácidos de depósitos microbianos adheridos a los dientes. <sup>29</sup>

La importancia de la enfermedad radica también en los efectos dolorosos que pueden producir, así como las secuelas funcionales en la masticación, fonación, deglución y digestión de los alimentos. Una de las consecuencias más graves de la caries dental, son los efectos sistémicos infecciosos que pueden traer como consecuencia otros estados patológicos (endocarditis bacteriana, septicemia, glomerulonefritis, fiebre reumática, etc.) <sup>29</sup>

La **caries dental** es la denominación exclusiva para la enfermedad, mientras que **lesión cariosa** corresponde a la destrucción que esta produce en los dientes. <sup>31</sup>

La presencia de lesiones cariosas, constituyen no solo un problema en la salud bucal sino también una amenaza para la apariencia de los dientes, bien sea por el menoscabo de su integridad o por la pigmentación que a menudo conlleva. Por ello, la reducción de la incidencia de caries dental representa un objetivo complejo pero primordial, para controlar la enfermedad, así como para lograr una sonrisa natural y bella. <sup>30</sup>

Con estos conceptos se busca instaurar un diagnóstico preciso, el cual permita dirigir un tratamiento etiopatogénico y no paliativo, es decir que este debe ser dirigido a los factores etiológicos, más que a las secuelas producidas. <sup>31</sup>

Si bien es cierto, tradicionalmente el tratamiento habitual se limitaba a restaurar todo deterioro dental producido por caries, se ha revelado que esto constituye el inicio de una sucesión de restauraciones, ya que su limitada durabilidad determina su periódico reemplazo por restauraciones de reciente complejidad, pudiendo llegar a la pérdida del diente; teniendo en cuenta que la longevidad es mayor cuanto más reducida sea su extensión.<sup>30</sup>

Así se comenzó una nueva era en el tratamiento de la caries, destinada a evitar el ciclo de inserción y sustitución de restauraciones dentales y otorgando preeminencia a la aplicación de medidas preventivas.<sup>30</sup>

### **3.2.1.2 Etiopatogenia de la caries dental**

El camino hasta el concepto actual de caries dental ha sido largo y tortuoso. La primera luz en la dirección adecuada se encontró citada en la teoría Químico – parasitaria de MILLER, en 1890, la cual fue aceptada a mediados del siglo XX. Luego de arduas y largas investigaciones fue posible conocer la real naturaleza y mecanismos iniciales del desarrollo de la caries dental.<sup>31</sup>

En experimentos de laboratorio se consiguió producir caries dental in vitro en dientes humanos extraídos, pudiendo ser identificados a los microorganismos o bacterias indispensables para el origen de la caries dental: *Streptococcus mutans*, aislados a partir de lesiones cariosas activas (CLARKE, 1924).

En 1950, KITE comprobó que la presencia de carbohidratos en la dieta es esencial para el desarrollo de la caries dental. Posteriormente, KEYES en 1960 demostró que la caries es una dolencia infecciosa y transmisible basado en experimentos con hámster.<sup>31</sup>



En base a estas investigaciones y a la triada ecológica formulada por Gordon, para la elaboración del modelo causal en Epidemiología, en 1960, PAUL KEYES, propone que la etiología de la caries dental obedecía a un diagrama compuesto por tres agentes que debían interactuar entre sí (Hospedero, microorganismo y dieta). Esta relación fue resumida en un gráfico que recibió la denominación de la TRIADA DE KEYES, 1960. (Fig. 1)

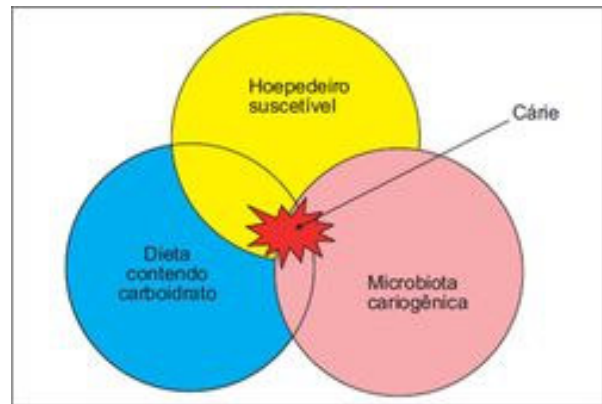


Fig. 1 Esquema de la Triada de KEYES, 1960

Así se establece el concepto que sustenta que el proceso de la caries dental, está basado en la interacción de los **factores etiológicos primarios o básicos: dieta, hospedero y microorganismos**. (Cuadro 1) Esta interacción es considerada indispensable para provocar la enfermedad. <sup>31</sup>

FACTORES ETIOLÓGICOS PRIMARIOS				
<b>Hospedero</b>	Saliva	Diente	inmunidad	genética
	Flujo, tampón	Anatomía, posición		
<b>Microorganismos (Agente)</b>	Streptococcus mutans Lactobacillus sp Actinomyces sp			
<b>Dieta (Medio –Sustrato)</b>	Carbohidratos – Sacarosa Frecuencia de consumo			

Cuadro 1. Factores etiológicos primarios

No obstante, en 1978 NEWBURN, ante las evidencias proporcionadas por nuevos estudios sobre el tema, y con la disposición de tornar más preciso el esquema de KEYES, adiciono el factor tiempo como un nuevo factor etiológico que se requiere para producir caries. (Fig. 2) <sup>31</sup>

Si estos condicionantes confluyeran durante un período de tiempo significativo, se produciría la enfermedad cariosa con mayor o menor grado de patogenicidad de acuerdo con su virulencia. <sup>27</sup>

En 1990, URIBE –ECHEVARRIA y PRIOTTO, basándose en la importancia de la edad en la etiología de la caries dental documentada por MILES en 1981, proponen el llamado grafico pentafactorial. (Fig. 3)

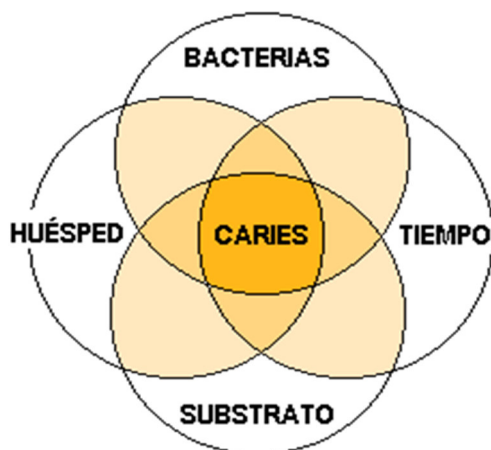


Fig. 2 Modelo de Newburn, 1978 (Esquema de Keyes modificado)

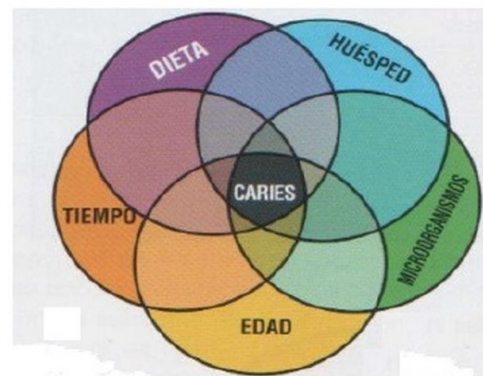


Fig. 3 Diagrama pentafactorial de Uribe –Echevarria y Priotto (1990)

Es decir, el origen de la caries dental no depende sólo de los llamados **factores etiológicos primarios**, porque para que se produzca la enfermedad hace falta la intervención de otros componentes, denominados **factores etiológicos moduladores**. Estos contribuyen e influyen decisivamente en el surgimiento y

evolución de lesiones cariosas. Se encuentran: el tiempo, la edad, la salud general, los fluoruros, grado de instrucción, nivel socioeconómico, experiencia anterior de caries, grupo epidemiológico y variables de comportamiento. (Cuadro 2) <sup>31</sup>

FACTORES MODULADORES	
<b>TIEMPO</b>	Interacción de los factores primarios
<b>EDAD</b>	Niños, adolescentes, adultos, ancianos
<b>SALUD GENERAL</b>	Impedimentos físicos Consumo de medicamentos Enfermedades variadas
<b>GRADO DE INSTRUCCION</b>	Primaria, secundaria, superior
<b>NIVEL SOCIOECONOMICO</b>	Bajo, medio, alto
<b>EXPERIENCIA PASADA DE CARIES</b>	Presencia de restauraciones y extracciones
<b>GRUPO EPIDEMIOLOGICO</b>	Grupos de alto o bajo riesgo
<b>VARIABLES DE COMPORTAMIENTO</b>	Hábitos, usos y costumbres
<b>FLUORUROS</b>	Remineralizadores y antibacterianos

Cuadro 2. Factores moduladores de la caries dental

Cabe resaltar, que no todos estos factores intervienen necesariamente en todos los que desarrollaran caries, ya que su presencia varia favorable o desfavorablemente según el individuo.

En este contexto de **causalidad**, todos los **factores etiológicos primarios** mencionados, se consideran como **causa necesaria**. Esto quiere decir que son imprescindibles para que la enfermedad se instale, pero a pesar de ello, por si solos no llegan a constituir **causa suficiente** para ocasionarla, puesto que para ello es crucial la intervención adicional de otros elementos citados, conocidos como **factores etiológicos moduladores**. <sup>31</sup>

En base a esto tenemos un panorama mucho más complejo, ya que la generación de la enfermedad es el resultado de una interacción compleja entre varios factores etiológicos, primarios y moduladores; tal como lo representa el esquema etiológico multifactorial de la caries. (Fig. 4)

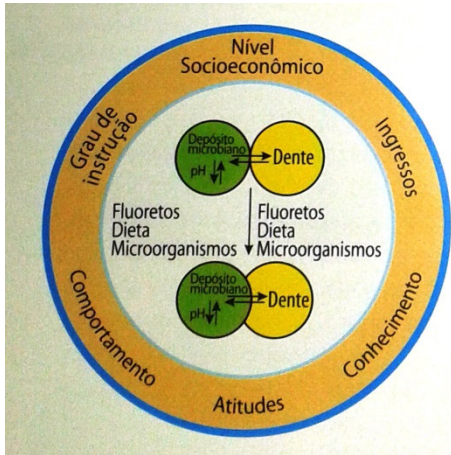


Fig. 4 Esquema de la etiología multifactorial de la caries. BAELUM y FEJERSKOV, 2001.

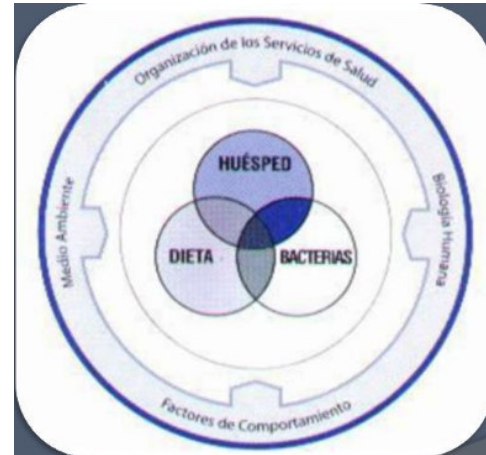


Fig. 5 Esquema del modelo holístico. BJERTNESS y col. 1992

Al desarrollarse análisis más complejos de la enfermedad, se sugiere que fuese adoptado un modelo socio –ecológico, en el cual no solo se incluyan las variables de comportamiento del individuo sino también las características sociales y psicológicas. Por eso BJERTNESS y col. 1992, proponen una alternativa en base a un modelo holístico, basada en la suma de los factores tradicionales asociado a los factores psico –sociales. Bajo esta estructura, se considera a la enfermedad como un proceso continuo y que la mayoría de los individuos se encuentra entre los extremos de salud y enfermedad. (Fig. 5)

Sea cual sea el modelo adoptado en el futuro, este deberá estar basado en una interacción multifactorial de un proceso eminentemente dinámico. <sup>31</sup>

### 3.2.1.3 Principales microorganismos de la caries dental

El papel esencial de los microorganismos en la etiología de la caries fue instituido por Miller en 1890. A esto se le suma la identificación de bacterias clasificadas como principales: los *Lactobacillus* por Kligler (1915) y los *Streptococcus mutans* por Clarke (1924).<sup>31</sup>

La cavidad bucal contiene una de las más variadas y concentradas poblaciones microbianas del organismo. Se estima que en ella habitan más de 1 mil diferentes especies, cada una de ellas con una gran variedad de cepas y que en 1 mm<sup>3</sup> de biofilm dental, que pesa 1 mg son encontrados 10<sup>8</sup> microorganismos.<sup>31</sup>

De este gran número de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal, los microorganismos pertenecientes al género estreptococo, básicamente las especies mutans, han sido asociados con la caries, tanto en animales de experimentación como en humanos.<sup>27</sup>

a) **Streptococcus mutans:** está relacionado con la placa cariogénica y con el inicio de la enfermedad. Al parecer están compuestas por un grupo de bacterias de especies diferentes por lo que en la actualidad se conocen como Streptococcus del grupo mutans. Las especies más prevalentes es *S. mutans* (serotipos c, e y f) que se encuentran en un nivel del 90%. Las especies de *S. sobrinus* (serotipos d y g) aparecen con menor frecuencia, entre 7 y 35%.<sup>26,29</sup>

b) **Lactobacillus:** considerados como invasores secundarios. Son bacterias productoras de ácido láctico, una de las más acidófilas capaces de producir ácidos en un pH muy bajo (acidúricos). Tienen poca afinidad por las superficies dentarias y en consecuencia no se les implica en la iniciación de caries de esmalte, pero si están relacionados con el avance de la caries de dentina. Actúan como invasores secundarios, aprovechando las condiciones ácidas y la

retención existente en la lesión cariosa, por eso dependen de la acción previa de los *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus casei* es considerada la especie más numerosa. <sup>26,29</sup>

- c) **Actinomyces:** están presentes en las placas, en las caries de dentina, cálculos y en la caries de raíz. Posee fimbrias que le otorgan capacidad adhesiva en los fenómenos de agregación y coagregación, para unirse con grupos de mutans y estreptococos del grupo oralis (*S. sanguis*) Tiene la capacidad de producir levanos (elemento de nutrición más que de adherencia) a partir de la sacarosa.

<sup>26,29</sup>

Si bien es cierto los *Streptococcus mutans*, están relacionados con el proceso de iniciación de caries, estas bacterias se asocian con microorganismos proteolíticos (degradación de las proteínas del diente) llegando hasta la pulpa, produciendo una pulpitis (reversible o irreversible) hasta desencadenar un proceso periodontal. <sup>29</sup>

Según Marcantoni, la cavidad bucal constituye un sistema ecológico complejo. Algunos microorganismos son retenidos por organismos específicos de adherencia en la superficie de mucosas y particularmente en las piezas dentarias. En contacto con determinados nutrientes, estos microorganismos se relacionan con la película adquirida mediante una **matriz de polisacáridos** y se conforma un sistema donde crecen, maduran, se multiplican y generan ácidos como producto del metabolismo de los hidratos de carbono. Así se inicia la caries dental, la cual se define como una enfermedad infecciosa de distribución universal, de naturaleza multifactorial y de carácter crónico que si no se detiene su avance natural, afecta todos los tejidos dentarios provocando daños irreversibles. <sup>26</sup>

### 3.2.1.4 *Streptococcus* del grupo *mutans*

En 1924, Clarke aisló ciertos microorganismos a partir de caries de dentina a los que llamó estreptococos mutantes, debido a que con la coloración Gram se observaban de forma más ovalada que redondeada, que es la forma típica de los estreptococos, por lo que él consideró que estas bacterias eran mutantes a éste género.<sup>13</sup>

Son organismos anaerobios facultativos y Gram Positivos que a menudo aparecen formando cadenas o por pares y son catalasa-negativa. Los estreptococos, son cocos que están divididos en un solo plano formando pares y cadenas, no forman esporas y producen ácido láctico a partir de la sacarosa y otros hidratos de carbono con mayor rapidez que otras bacterias bucales.<sup>13, 27</sup>

Desde el punto de vista estructural, no difieren del modelo general de todos los estreptococos, salvo en la ausencia de cápsula, polisacárido C, complejos fibrilares y las fimbrias que cuando existen, no son muy prominentes. Por el contrario, en la pared destacan proteínas dotadas de diversas funciones, y polisacáridos, distintos del C. Estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite distinguir los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h.<sup>13</sup> Los serotipos c, e y f son los miembros del grupo *mutans* que predominan en el hombre.<sup>34</sup>

El *Streptococcus mutans* es un habitante de la microbiota oral, se instaura en la cavidad bucal poco después del brote de la dentición temporal, transitoriamente se halla en la saliva, cuya concentración de *S. mutans* se relaciona con el nivel de infección en la placa dentobacteriana.<sup>27</sup>

#### ❖ Cultivo

Son anaerobios facultativos. La temperatura óptima para su desarrollo es de  $36 \pm 1^\circ \text{C}$ . Aunque pueden multiplicarse al aire, es aconsejable incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y, posteriormente, otras 24 horas en aerobiosis; esto favorece la

formación de agua oxigenada, que es un importante carácter diferencial y, en parte, la síntesis de polisacáridos extracelulares que, en algunos casos, pueden facilitar el reconocimiento de las colonias. <sup>13,27</sup>

En agar sangre carnero son a y g hemolíticos, con excepción de algunas cepas de *S.mutans* que son b hemolíticas. Como medio poco selectivo puede utilizarse MSA (mitis salivarius agar) que contiene un 5 por 100 de sacarosa y como sustancias inhibitoras, telurito potásico, azul tripán y cristal violeta. <sup>13</sup>

Como medio más selectivo, el usado habitualmente es MSB (mitis salivarius - bacitracina), que es MSA al que se le añade 0,2 U/ml de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio está considerado, por algunos autores como un inhibidor del serotipo a (*S.cricetus*); pese a que esta especie es poco frecuente en la cavidad oral humana. <sup>13</sup>

Se han desarrollado otros medios de cultivo que no tienen este hipotético inconveniente, como es el caso del agar TYCSB (con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina). <sup>13</sup>

### **3.2.1.5 Asociación entre caries dental y *Streptococcus mutans***

La caries dental ha sido definida como un estado dinámico de desmineralización - remineralización que se produce como resultado del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria y que con el avance del tiempo determina la pérdida de mineral y eventualmente, la aparición de una cavidad. <sup>13,28</sup>

La asociación de *Streptococcus mutans* con la caries dental no fue reconocida hasta que en 1960 investigadores retomaron el interés por la bacteria. Son microorganismos versátiles en la etiología de la caries dental, son los principales habitantes de la cavidad oral siendo encontrados en un 90% de los humanos. <sup>34</sup>

Numerosos estudios han demostrado que el *S. mutans* es el microorganismo más relacionado con la caries dental, proponiendo a esta bacteria como principal agente



bacteriano causante de la caries dental en el ser humano. <sup>27, 28,32</sup> **Esta bacteria y sus mecanismos de acción están relacionados con la iniciación de la caries dental.** <sup>1, 2,12</sup>

En el desarrollo de la caries dental existen tres procesos distintos donde interviene el *Streptococcus mutans*, que dan inicio a la enfermedad. En primer lugar, la adherencia de los *S. mutans* a la superficie dental. La adherencia de las bacterias a las superficies, su unión hidrófoba y las interacciones iónicas y la hidrofobicidad de la superficie celular están implicados en el proceso. <sup>50</sup>

En segundo lugar, la formación de matriz de glucanos por la acción de la enzima bacteriana glucosiltransferasa a partir de los hidratos de carbono como sacarosa como sustratos y en tercer lugar, la acumulación de biofilm (placa dental) que crean un medio ambiente adecuado para la producción continua de ácido por las bacterias. El ácido producido por las bacterias será entonces el encargado de disolver los tejidos duros de las superficies de los dientes y posteriormente conducir a la formación de caries. <sup>50</sup>

El *S. mutans*, ha sido el microorganismo más aislado en lesiones cariosas humanas, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. <sup>27</sup>

Debido a su relación con la caries dental, la evaluación de la concentración de *S. mutans* en placa y saliva puede ayudar al diagnóstico de la actividad de caries. <sup>13</sup>

### **3.2.1.6 Factores de virulencia del *S. mutans***

Cuando se habla de virulencia de un microorganismo, se está haciendo referencia a su capacidad de producir daño, es decir, generar una enfermedad. Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microorganismo que lo hacen patógeno. <sup>32</sup>

Esta patogenicidad se define como la capacidad del microorganismo para producir enfermedad en huéspedes susceptibles.<sup>27</sup>

La actividad patógena del *Streptococcus mutans* puede ser determinada por la capacidad que tiene de adherirse a la superficie oral, sintetizar una matriz glucano pegajosa y sobrevivir en el ambiente de la placa dental (biofilm).<sup>50</sup>

En el caso de *S. mutans* los factores más involucrados en la producción de caries son:

#### **a) Producción de polisacáridos extracelulares**

Los estreptococos del grupo *mutans* son capaces de sintetizar homopolisacáridos extracelulares, especialmente a partir de la sacarosa, que pueden ser de tres tipos: glucanos hidrosolubles (dextranos), glucanos hidroinsolubles (mutanos y fructanos).<sup>28,</sup>

<sup>32</sup>

La formación de estos polímeros se debe a una o varias enzimas extracelulares denominadas glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs) que participan en la síntesis de dextranos y levanos transfiriendo grupos glucosílicos o fructosílicos, respectivamente, a aceptores de glucanos o fructanos preexistentes.<sup>28,32</sup>

Las glucosiltransferasas que determinan glucanos insolubles son de peso molecular elevado (GTF-I) mientras que las que lo hacen con glucanos solubles poseen un peso molecular bajo (GTF-S). Estas proteínas enzimáticas pueden aparecer localizadas en las superficies bacterianas, libres en el medio ambiente, o adsorbidas a la película adquirida; en todos estos casos mantienen su actividad de sintetizar glucanos, y pueden, de esta forma, ser nexo de unión con otras bacterias que posean proteínas fijadoras de glucanos.<sup>28,32</sup>

Las glucosiltransferasas (GTFs) han demostrado ser uno de los mayores factores de virulencia en la patogénesis de la caries dental.<sup>32</sup>

Según Bowen (2011), las GTFs desempeñan papeles críticos en el desarrollo de la placa dental virulenta, siendo capaz de sintetizar glucano in situ a partir de sacarosa y proporcionando sitios de unión para muchos microorganismos orales, incluyendo estreptococos mutans. La Gtf -B parece ser responsable para el desarrollo de microcolonias altamente estructurados por *S. mutans*, ya sea solos o en presencia de otros organismos.<sup>33</sup>

Varios grupos de microorganismos orales producen GTFS; estos incluyen *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus spp.*<sup>33</sup>

Se ha discutido mucho acerca de la importancia de polímeros extracelulares. En general, los glucanos solubles y los fructanos son más fácilmente degradables por enzimas tipo glucanasas y fructanasas, rompiendo los enlaces  $\alpha$  (1-6),  $\beta$  (2-6) y  $\beta$  (1-2). Esto hace que se obtengan productos más sencillos, utilizables por las mismas bacterias que los sintetizan o por otras que posean tales enzimas. Por ello, suelen desaparecer con facilidad del material abiótico que constituyen las placas dentales. Por el contrario, los glucanos insolubles (mutanos) son degradados con dificultad por las bacterias, poseen propiedades adherentes y forman parte importante de la matriz acelular de la placa; de esta manera, al ser difícilmente retirados, se convierten en los principales glucanos que se unirán a proteínas fijadoras, y son los que más intervienen en los fenómenos de agregación y adhesión bacteriana.<sup>32</sup>

*S. mutans*, *S. salivarius* y *A. viscosus* producen un polímero denominado levano. Los levanos son fácilmente degradados por enzimas (levanasas) y actúan como fuente de energía, ya que son sintetizados en los periodos de excesos de nutrientes y catabolizados en los periodos de escasez.<sup>26</sup>

Los glucanos promueven el acumulo de *S. mutans* en la superficie dentaria y contribuyen aumentando el volumen, cariogenicidad y la integridad estructural del biofilm dental. Además de ser un esencial factor de virulencia del *S. mutans*, son la

reserva de energía para bacterias, reguladores de la permeabilidad de la placa dental controlando la acidez en los dientes. <sup>34</sup>

### ***b) Acidogenicidad, aciduricidad y acidofilicidad***

*Streptococcus mutans* puede producir y tolerar ácido para ayudar a su sobrevivencia en la cavidad oral. *S. mutans* es una bacteria homofermentativa de ácido láctico, pero cuando el suministro de carbohidratos es limitado, esta bacteria también produce formiato, acetato y etanol. Esto implica que *S. mutans* es una bacteria acidogénica, ya que puede fermentar los azúcares de la dieta para producir ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y desmineralice el esmalte dental. <sup>27, 32</sup>

La aciduricidad del microorganismo se debe a que es capaz de seguir produciendo ácido con un pH bajo. El *S. mutans* también es acidófilo o tolerante al ácido ya que puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H<sup>+</sup>) fuera de la célula. <sup>32</sup>

Estas especies bacterianas consiguen alcanzar rápidamente el pH crítico necesario para iniciar el proceso de desmineralización. El potencial acidogénico acidúrico es importante en su virulencia. Este microorganismo produce ácido láctico a partir de la sacarosa y otros hidratos de carbono con mayor rapidez que otras bacterias bucales. El ácido láctico es fundamental en la virulencia, debido a que es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente. <sup>13</sup>

### ***c) Síntesis de polisacáridos intracelulares***

*S. mutans* también sintetiza polisacáridos intracelulares, que son metabolizados para la producción de ácidos en la falta de carbohidratos fermentables exógenos, ya que es importante que los microorganismos tengan energía para la regulación osmótica,

manutención del pH intracelular y la renovación de proteínas y ácidos nucleicos y las necesidades son reemplazadas a partir de fuentes endógenas.<sup>34</sup>

La síntesis de polisacáridos intracelulares por *S. mutans* y su capacidad de metabolizarlos son factores de virulencia, ya que proporcionan a la célula un sustrato manteniendo así la producción de ácido durante largos periodos de tiempo.<sup>28</sup>

En presencia de glucosa y sacarosa extracelular, *S. mutans* sintetiza polisacáridos intracelulares tipo glucógeno (IPSs). Estos IPSs son homopolímeros de glucosa con enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6). La síntesis de IPS es linealmente proporcional a la concentración de carbohidratos extracelulares (glucosa o sacarosa). El metabolismo de IPS puede promover el desarrollo de caries por la prolongación del tiempo de exposición a ácidos orgánicos cuando la bacteria carece de una fuente de alimentación externa.

Numerosos reportes confirman a los IPSs como un importante contribuyente de la cariogenicidad de *S. mutans*.<sup>32</sup>

#### **d) Producción de dextranasas y fructanasas**

Las dextranasas y fructanasas son enzimas capaces de metabolizar los polisacáridos extracelulares, sobre todo los glucanos solubles, favoreciendo la producción de ácido y constituyendo un sustrato en los periodos en que disminuye el aporte exógeno.<sup>32</sup>

Además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.<sup>27</sup>

#### **3.2.1.7 Adherencia microbiana**

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial del *Streptococcus mutans* a la superficie del diente.<sup>27,32</sup> Sólo los microorganismos que pueden adherirse y permanecer en la boca tienen la oportunidad de comenzar a

crecer, multiplicarse, sobrevivir y establecerse como miembros de la microbiota bucal.

28,32

Los glucanos extracelulares insolubles son los principales responsables por esa adherencia y también por la cohesión intercelular entre bacterias diferentes como por ejemplo *Streptococcus* y *Actinomyces*.<sup>4</sup>

*S. mutans* produce esos glucanos solubles e insolubles a partir de los azúcares de la dieta, utilizando la enzima glucosiltransferasa (GTF), formando acumulaciones bacterianas; de este modo la unión se hace más fuerte, las bacterias degradan la sacarosa a ácidos que desmineralizan el diente, formando las cavidades que se encuentran en la caries.<sup>32</sup>

La adherencia de estos microorganismos a la superficie del diente y la subsiguiente formación de placa ocurren en dos etapas. La primera es la adherencia reversible de la célula bacteriana a la película adquirida presente en la superficie del esmalte y la segunda etapa es la acumulación de *S. mutans* a través de su crecimiento y producción de glucanos extracelulares. La interferencia en alguno de esos mecanismos puede prevenir la formación de la caries dental.<sup>3,4</sup>

La adherencia del *S. mutans* es mediada por adhesinas de las superficies de las bacterias y receptores de la superficie oral que son componentes salivares.<sup>34</sup>

Estos factores de adhesión microbiana son:

#### **a. Elementos bacterianos**

Son las *adhesinas* o moléculas superficiales bacterianas, cuya función es la de fijar los microorganismos a una superficie, ya sea tejido del hospedador, material artificial biocompatible o a las propias bacterias.

Las principales adhesinas que intervienen en los procesos de adhesión, agregación y coagregación en la cavidad oral son:<sup>32</sup>

- Residuos de carbohidratos y proteínas parietales superficiales.
- Glucanos solubles e insolubles del glococálix.
- Glucosiltransferasas (GTFs)
- Proteínas que unen o fijan glucanos
- Proteínas que se fijan a la película adquirida
- Moléculas protéicas contenidas en las fimbrias
- Ácidos lipoteicoicos (ALT)
- Cadenas de polisacáridos de LPS

### ***b. Receptores***

Compuestos que interactúan con las adhesinas. Entre ellos se encuentran los carbohidratos del glicocalix y glucoproteínas como la fibronectina de las células epiteliales, la película adquirida o conjunto de proteínas y glucoproteínas salivales como mucinas, glicoproteínas, amilasa, lisozima, inmunoglobulinas A y G, proteínas estaterinas y componentes bacterianos ligados a la superficie oral, adsorbidas de forma selectiva al esmalte, cemento o materiales artificiales, los cálculos dentales supra y subgingivales o la mayor parte de los complejos bacterianos superficiales señalados como adhesinas que en este caso actuarían como receptores en los fenómenos de agregación y congregación. <sup>32,34</sup>

Existe más de un tipo de adhesina en la superficie celular e interactúan múltiplemente facilitando la unión con las moléculas de la película adquirida y receptores de otras bacterias. <sup>34</sup>

### 3.2.1.8 Mecanismos de adhesión, agregación y coagregación

LA ADHESIÓN es la interrelación que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedador, lo que permite la colonización microbiana.<sup>28</sup>

LA AGREGACIÓN Y COAGREGACIÓN, son mecanismos que tienen las bacterias de las mismas o diferentes especies, respectivamente, de *adherirse* entre sí, dando lugar a la formación de microcolonias o acumulaciones bacterianas, que fortalecerán y estabilizarán la colonización.<sup>28,32</sup>

En estos fenómenos, los elementos del hospedador, tisulares o de otra índole, y bacterias o bacterias entre sí se aproximan. En ambos casos las superficies que interactúan están cargadas negativamente, creándose unas fuerzas de repulsión que deben ser neutralizadas para que el contacto se lleve a cabo. Aunque la naturaleza íntima del proceso no se conoce, en muchas ocasiones pueden intervenir los siguientes mecanismos:<sup>28,32</sup>

- Una cierta avidez entre las superficies como ocurre por ejemplo entre moléculas lipofílicas de las células eucarióticas e hidrófobas de células procariotas, o entre las glucosiltransferasas (GTFs) y los glucanos (enzimas unidas a sustratos).
- Complementariedad entre los elementos que contactan.
- Orgánulos bacterianos que se alejan de las zonas más electronegativas y que, por su longitud, acortan los espacios.
- Presencia de cationes en el medio que, bien directamente o a través de glucoproteínas salivales, atraen las superficies.
- Fuerzas débiles tipo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas y fuerzas de Van der Waals.



Los principales tipos de adhesión, agregación y coagregación en la cavidad oral son:

**a) Uniones tipo lectina carbohidratos**

Suponen el reconocimiento y fijación por péptidos de proteínas (lectinas) de residuos glúcidos que, al igual que en las reacciones antígeno – anticuerpo, necesitan cierta complementariedad entre las superficies que interactúan. En la película adquirida (porciones glucosídicas), pueden formarse estas uniones mediante fimbrias y proteínas parietales superficiales de algunas bacterias (lectinas). Así ocurre con los antígenos superficiales proteicos de *Streptococcus mutans* I/II, hecho que se ve favorecido por intermediarios salivales al contrario de los *Streptococcus sobrinus*, o por proteínas similares de *Streptococcus sanguis*. Estas lectinas estreptocócicas parecen tener sus receptores glúcidos en la película adquirida, en residuos de galactosa para *S. mutans*, y de ácido siálico para *S. sanguis*. Del mismo modo, este tipo de uniones pueden producirse en los fenómenos de coagregación bacteriana, existiendo una amplia gama de ejemplos en la cavidad oral; así las fimbrias tipo 2 de *Actinomyces viscosus* interactúan con residuos de galactosa de *S. sanguis*, o fimbrias de esta última especie que reconocen carbohidratos superficiales de *Fusobacterium nucleatum* spp., *R. dentocariosa* o *Corynebacterium matruchotii*.

**b) Uniones tipo proteína – proteína**

Al igual que en el caso anterior, pueden determinar la adhesión a la película adquirida, como las fimbrias tipo 1 de *A. viscosus* que interactúan con residuos de prolina de la película, o fenómenos de congregación. Los resultados son las típicas imágenes en mazorcas de maíz, en las que sobre un bacilo central se fijan cocos, o las de tipo pilosos, con un bacilo central sobre el que se unen otras bacterias de igual morfología.

En estos coagregados pueden participar especies muy diferentes, lo que hace que las masas microbianas que surgen tengan un carácter heterogéneo.

Los análisis electroforéticos han demostrado que las proteínas salivales que primero promueven la adhesión son las ricas en prolina, seguidas por las que contienen proteína estaterina.<sup>32</sup>

### ***c) Uniones mediadas por glucanos***

Constituye un proceso especial de adhesión a superficies duras, con un cierto grado de agregación y coagregación. En él intervienen además de glucanos especialmente los insolubles ya que los solubles son fácilmente degradables y persisten poco tiempo, las proteínas superficiales que fijan glucanos, y las glucosiltransferasas. Todos estos atributos los poseen los estreptococos del grupo *mutans*, lo que hace que sea un fenómeno casi exclusivo de estos microorganismos.

Las glucosiltransferasas sintetizan los glucanos, pudiendo quedar unidas a las superficies bacterianas o ser excretadas al medio circundante, conservando su actividad y permaneciendo unido a los aceptores glucosídicos de los homopolisacáridos. Los glucanos liberados al medio, por otra parte, pueden fijarse a proteínas superficiales parietales (proteínas que unen glucanos) y actuar no sólo de nexo de unión entre glucosiltransferasas, sino también entre bacterias que posean dichas proteínas; otro tanto ocurrirá cuando queden rodeando a las superficies bacterianas.

Se forman así acumulaciones que quedarán adheridas a las superficies dentarias cuando las bacterias posean las proteínas tipo lectinas, que se fijaban a la película adquirida, o cuando las glucosiltransferasas o los propios glucanos queden adsorbidos en la misma.<sup>32</sup>

- **Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs)**

*S. mutans* sintetiza al menos dos GBPs. Estas proteínas fijan los glucanos libres del medio, sirviendo de nexo entre las bacterias, forman acumulaciones que quedan adheridas a los dientes. Los anticuerpos contra GBPs pueden interferir en la patogénesis de *S. mutans* induciendo inmunidad contra caries.<sup>32</sup>

**d) Uniones por ácidos lipoteicoicos (ALT)**

Este ácido que es un polímero aniónico, compuesto por fosfatos azucarados, generalmente glicerol y ribitol fosfato, deriva de la membrana plasmática y penetra en la pared celular de los estreptococos grampositivos.

De este modo el microorganismo se presenta con una potente carga electronegativa que le permite adherirse al ion calcio de la saliva y a través de éste, que actúa como puente, a la película acelular adquirida.

Este mecanismo de adhesión, que es el que utiliza *S. sanguis* cuando hay sacarosa en el medio, origina una placa con bajo potencial acidogénico y no cariogénica.<sup>32</sup>

Como hemos presentado, varios factores están asociados al proceso de adhesión bacteriana: interacción de proteínas, adhesinas, lectinas e interacciones hidrofóbicas. La interferencia de la adhesión bacteriana en la superficie de los dientes puede ser un camino para obtener un control del biofilm dental, influenciada por acción de agentes antimicrobianos naturales en los estadios iniciales y reversibles de la formación del biofilm, reduciendo la adherencia bacteriana a la película adquirida y previniendo la instalación de patologías orales, como la caries dental. En una segunda etapa de desarrollo, pueden ser prevenidas la síntesis de glucanos insolubles, inhibición de la actividad de la enzima GTF que ocurre via dependiente de la sacarosa.<sup>34</sup>

### **3.2.2 *Theobroma cacao* L.**

#### **3.2.2.1 Taxonomía y nomenclatura**

La clasificación del cacao según Cronquist, es la siguiente (Chia J. 2009) <sup>35</sup>

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Malvales
- Familia: Sterculiaceae
- Sección: Theobroma
- Género Theobroma
- Especie: *Theobroma cacao* L.

El científico Caroulus Linneo bautiza al árbol de cacao como “*Theobroma cacao*” que significa “alimento de los dioses”, el mismo que crecía en zonas tropicales y bosques húmedos. <sup>37</sup>

#### **3.2.2.2 Hábitat y agronomía**

Es un árbol generalmente de porte bajo, llega a alturas de 2 a 6 metros; sin embargo, ha llegado hasta los 25 metros en estado silvestre. Crece en el sotobosque ya que requiere de sombra, necesita protección del viento y un suelo rico y poroso. La altitud ideal para su desarrollo es de 400 m.s.n.m., pero se ha observado su crecimiento en altitudes que varían desde el nivel del mar hasta los 1000 m.s.n.m. El clima debe ser húmedo tropical, una gran humedad y con temperatura que varía entre los 20 °C y los 30 °C, con una mínima de 16 °C. El terreno debe ser rico en nitrógeno y en potasio.

A pesar de que sus frutos maduran durante todo el año, normalmente se realizan dos cosechas: la principal (que empieza hacia el final de la estación lluviosa y continúa

hasta el inicio de la estación seca) y la intermedia (al principio del siguiente período de lluvias). Son necesarios de cinco a seis meses entre su fertilización y su recolección.<sup>35</sup> Cada planta llega a su madurez a los 12 años y pueden vivir entre 25 y hasta 50 años.

14

### 3.2.2.3 Descripción botánica: raíces, tallo, hojas, flores, frutos, semillas

El cacao es una especie diploide ( $2n = 20$  cromosomas), y de ciclo vegetativo perenne (Fig. 6a). Este árbol crece y se desarrolla bajo sombra en los bosques tropicales húmedos de América del sur y Centroamérica.<sup>39</sup>

- **Raíces.**- La raíz principal es pivotante y puede alcanzar de 1.5 - 2.0 m. de profundidad. Las raíces laterales mayormente se encuentran en los primeros 30 cm. del suelo alrededor del árbol pudiendo alcanzar de 5 – 6 m de longitud horizontal.<sup>39</sup>
- **Tallo.**- El tallo en su primera fase de crecimiento es ortotrópico (vertical), por 12-15 meses. Luego, este tipo del crecimiento se interrumpe para dar lugar a la aparición de 4 - 5 ramitas secundarias denominada “horqueta”, que crecerán de forma plagiotrópica (horizontal) (Fig.6b). Debajo de la horqueta aparecen con frecuencia brotes verticales, denominados “chupones” que dan lugar a nuevas horquetas y este evento puede repetirse por 3 a 4 veces consecutivas en el tiempo.<sup>39</sup>
- **Hojas.**- Las hojas son enteras, de 15 – 50 cm de longitud y de 5 – 20 cm de ancho, con ápice acuminado o romo; simétricas en el brote ortotrópico y asimétricas en las ramas plagiotrópicas (Fig.6c). Presentan colores variables que van desde morado hasta verde pálido, con pecíolo corto.<sup>35,39</sup>
- **Flores.**- Las flores, son hermafroditas, pentámeras (5 sépalos, 5 pétalos, 5 estaminodios, 5 estambres, y 5 lóculos por ovario); completas (todos sus verticilios florales) y perfectas (con androceo y gineceo). Las flores aparecen

en el tronco en forma solitaria o en grupos denominados “cojines florales” (Fig. 6d ), con un diámetro que oscila entre 1 - 1.5 cm de longitud. Una planta adulta puede llegar a producir más de 50 000 flores al año, de las cuales sólo se fecundan y llegan a fructificar entre el 0,5 y 2 %. <sup>35,39</sup>

- **Frutos.-** Los frutos son bayas (Fig. 6e), conocidas como “mazorcas” con tamaños que oscilan de 10 –42 cm, de forma variable (oblonga, elíptica, ovada, abovada, esférica y oblata); de superficie lisa o rugosa. Son de diversos colores al madurar (rojo, amarillo, morado y café); contienen entre 20 y 40 semillas. Maduran entre 5 y 6 meses después de la polinización. <sup>35,39</sup>
- **Semillas.-** Las semillas o almendras son de tamaño variable (1.2 - 3 cm), de longitud cubiertas con un muscílago o pulpa de color blanco cremoso, de distintos sabores y aromas (floral, frutal, nueces), y grados de acidez, dulzura y astringencia. Al interior están los cotiledones que pueden ser de color morado, violeta, rosado o blanco, según el genotipo. Las semillas una vez secas alcanzan pesos entre 0,8 y 1,5 g cada una (Fig. 6f )



(a)



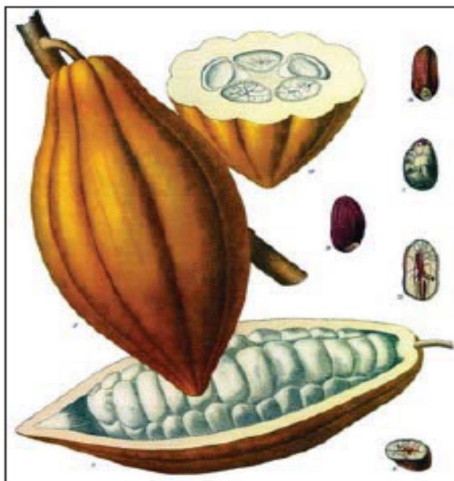
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 6. Órganos vegetativos y reproductivos del cacao

### 3.2.2.4 Reseña histórica. Origen y domesticación.

Se sabe que el nombre **cacao** deriva de la palabra azteca “cacahualt”, que significa jugo amargo y el de **chocolate** deriva de la palabra maya “chocol” y “a” que significan caliente y agua, respectivamente. Los botánicos, basados en las creencias de los mayas y aztecas, denominaron al cacao con el nombre científico de “**Theobroma cacao**”, que significa en latín “**alimento de los dioses**”. Los mayas y los mexicas elaboraban a partir de la semilla la bebida de nombre “*chocolatl*”, incluso fue utilizada como moneda en ese tiempo. De ahí es que se cree que el cacao (*Theobroma cacao* L) tiene como origen México.<sup>14</sup>

Sin embargo, hace algunos años el centro de origen de *T. cacao* es un tema que está en discusión (Dias, 2001; Motamayor *et al.*, 2002) debido a las siguientes razones <sup>35</sup>:

- Importancia de las diversas variedades domesticadas en Centroamérica.
- Dispersión de la especie por el hombre o de manera natural.
- Mayor diversidad genética en especies de la zona alta de la cuenca del río Amazonas (involucra a Brasil, Perú, Bolivia, Ecuador, Venezuela y Colombia).

Para intentar explicar el centro de origen del cacao, se plantearon 3 hipótesis (Dias, 2001; Motamayor y Lanaud, 2002), mutuamente excluyentes y conflictivas, que proponen el origen y dispersión de estas poblaciones <sup>35</sup>:

- **Hipótesis de dispersión Sur a Norte:** supone que el cacao tendría como centro de origen la cuenca alta del Amazonas, y habría sido llevado por humanos a través de los Andes hacia Centroamérica, siendo aquí donde se domesticó.
- **Hipótesis de dispersión Norte a Sur:** respalda un origen Centroamericano y dispersión del cacao en dirección opuesta a la hipótesis anterior; el centro de



origen sería Centroamérica y a partir de aquí los cacaos habrían sido transportados por Amerindios hacia Sudamérica.

- Desarrollo simultáneo e independiente de dos poblaciones de cacao, que derivaron en cacao Criollo en Centroamérica y Forastero en Sudamérica, separados por el Istmo de Panamá

Las evidencias antropológicas, históricas, paleontológicas y biogeográficas, junto con los estudios moleculares de genética de poblaciones han reforzado la hipótesis de dispersión Sur a Norte (Dias, 2001; Motamayor *et al.*, 2002).<sup>35</sup>

Prueba de ello son las investigaciones arqueológicas binacionales entre Perú y Ecuador, que han puesto al descubierto el cacao más antiguo de América en la cuenca del río Chinchipe, revelando la presencia de antiguas civilizaciones que domesticaron y utilizaron el cacao hace más de 5 200 años.<sup>37</sup> (Fig. 7, 8 y 9)



Fig. 7 Templo forma de espiral Palanda –Ecuador.



Fig. 8 Botella de cerámica con huellas de almidón de cacao con antigüedad de 5 200 años

Fig. 9 Descubrimiento arqueológico de semillas de cacao.



Fig. 10 Reconocimiento al Plan Binacional de desarrollo arqueológico entre Perú y Ecuador - Exhibicion fotografica V Salón del cacao y chocolate, Julio 2014

Este importante descubrimiento ha sido galardonado en el 2013 como uno de los 10 mejores descubrimientos arqueológicos del mundo (Fórum de Shanghái en China) (Fig. 10); quebrando el mito acerca del origen del cacao, cediéndole paso a las teorías que afirman que este fruto tiene como centro de origen la Amazonia.<sup>37</sup> El Plan Binacional de desarrollo de la región fronteriza Perú Ecuador ha recopilado valiosa información para mostrar la historia acerca del origen del cacao y como muchas familias hoy en día son guardianas de este cultivo.

En cuanto a su domesticación, desde la década del '60 se estableció que la región de domesticación del cacao fue en Centroamérica (Cuatrecasas, 1964). La domesticación por los indígenas de Centroamérica, se realizó durante la época pre-colombina siendo cultivado desde el siglo VI. Ellos lo utilizaban como bebida y también como moneda en sus transacciones.<sup>39</sup>

#### **3.2.2.5 Variedades de cacao**

Las tres grandes variedades que generan la producción mundial de cacao son: ***El Criollo, el Forastero y El trinitario***. Existe una relación directa entre la variedad del cacao y el tiempo requerido para la fermentación. Para el cacao criollo el tiempo de fermentado es 3 días, para otras variedades es de 7 días.<sup>14</sup>

- ❖ **Cacao criollo:** conocido como el cacao genuino, bautizado así por los españoles al llegar a México. Es reservado para la fabricación de chocolates finos, por su aroma y sabor. Sin embargo, son más susceptibles a enfermedades e insectos que los 'Forasteros' además tienen una alta diversidad morfológica. El fruto es generalmente alargado, con ápice acuminado y de superficie lisa o rugosa. Las semillas son generalmente grandes y gruesas, con cotiledones blancos o rosados.<sup>14,35,39</sup> (Fig. 11)

Se cultiva en México, Venezuela, Colombia, Nicaragua, Guatemala, Trinidad, Jamaica y Granada, en la zona del océano Índico y en Indonesia. Representa, como mucho, el 10% de la producción mundial. <sup>35</sup>



Fig. 11 Mazorca de cacao, variedad criollo.

- ❖ **Cacao forastero:** proviene de la cuenca amazónica, de cáscara gruesa, resistente y son poco aromáticos. Presenta el tanino más elevado, lo que le proporciona un sabor amargo al chocolate, es por eso que se le considera un cacao “corriente”. Representa la mayor parte de la producción mundial. Se cultiva en África y Sudamérica. <sup>14, 35</sup>

Según su ubicación se dividen en “Forastero del Alto amazonas” cultivados en Perú, Ecuador, Colombia, y “Forastero del Bajo amazonas” domesticado en Brasil, Surinam, Guyana Francesa y a lo largo del Orinoco (Venezuela).

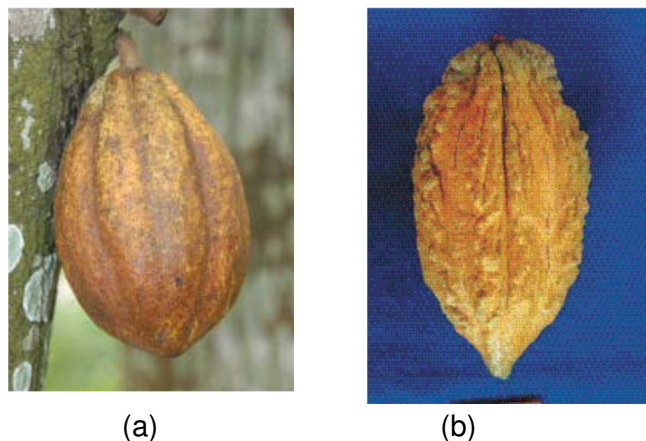


Fig. 12 Mazorca de cacao, variedad forastero. (a) Del alto amazonas. (b) Del bajo amazonas

En los Forasteros del Alto Amazonas, pueden existir mazorcas con mayor rugosidad y constricción basal acentuada. (Fig. 12a). Los granos son generalmente pequeños y algunos grandes; aplanados y de cotiledones morados o violeta, con algunas excepciones en el color, pudiéndose encontrar cotiledones blancos como en la variedad Porcelana de Piura (Perú). En los Forasteros del Bajo Amazonas, las mazorcas generalmente son más pequeñas, ligeramente rugosas y de forma amelonada, comparado con los 'Criollos'-tipo "cundeamor". (Fig. 12b) Las almendras son generalmente pequeñas e intermedias; de color de cotiledón morado y excepcionalmente, blanco como la variedad `Catongo` de Brasil. <sup>39</sup>

- ❖ **Cacao trinitario:** se trata de una población híbrida que surge en Trinidad, como cruce entre el forastero y el criollo. Posee una alta heterogeneidad variable debido a su origen híbrido. Fue anteriormente clasificado como un tipo de Forastero, es de origen reciente y puede ser reproducido artificialmente. Producen un cacao de calidad aunque inferior al Criollo. <sup>14,35,39</sup> Se cultiva en México, Trinidad, Colombia, Venezuela. <sup>35</sup> (Fig. 13)



Fig. 13 Mazorca de cacao, variedad trinitario.

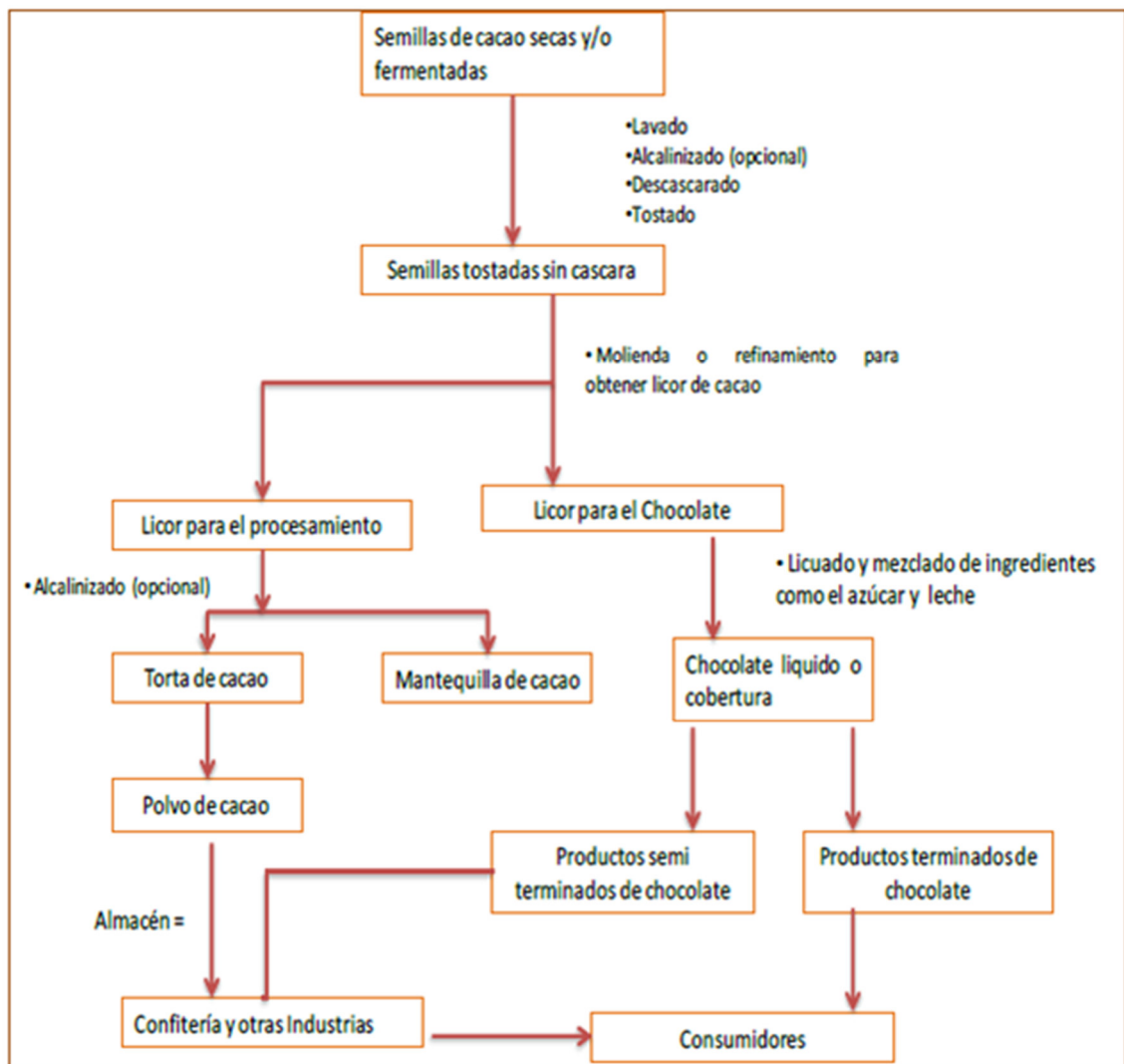
En el Cuadro 3, se muestran características que diferencian a las variedades de cacao: “criollo”, “forastero” y “trinitario”.

ÓRGANO/CARACTER	CRIOLLO	FORASTERO	TRINITARIO
<b>SEMILLA</b>			
1. Color cotiledones	Blanco o violeta	Morado, excepcionalmente blanco	Morado
2. Forma (Sec. Transversal )	Redondeada	Aplanada o intermedia	Variable
<b>FRUTO</b>			
1. Color al estado inmaduro	Rojo o verde	Verde o verde pigmentado	Rojo o verde
2. Rugosidad	Rugoso o ligeramente liso	Liso o medio	Variable
3. Constricción basal	Ausente o ligero	Variable	Variable
4. Grosor de cáscara	Delgada –media	Gruesa o media	Delgada o media
5. Número de semillas	20 -40	20 -60	30 -45
<b>AGROINDUSTRIAL</b>			
1. Inicio de la producción	4 -6° año	3° -5° año	3° -4° año
2. Periodo de fermentación	3 -4 días	5 -7 días	5 -6 días
3. Sabor y aroma	Extrafino –fino	Corriente	Fino –medio
4. Contenido de grasa	Bajo (<54%)	Variable (45 -60%)	Variable (45-57%)

**Cuadro 3. Características diferenciales entre las variedades de cacao: “criollo”, “forastero” y “trinitario”**

### 3.2.2.6 Derivados de la semilla de cacao

La industria obtiene la semilla de cacao de los exportadores en dos posibles estados, 1) Semilla de cacao secas y 2) Semillas de cacao fermentadas y secas, para luego someterlas a los procesos industriales que básicamente procuran la calidad organoléptica de los derivados, lo que logran disminuyendo las concentraciones naturales de polifenoles mediante el tostado, alcalinizado, además de agregar otros ingredientes.<sup>14</sup> (Fig. 14)



**Fig. 14 Diagrama industrial del proceso de elaboración de derivados de cacao**

### Licor de cacao

Las semillas de cacao fermentadas, secadas y tostadas, pasan por un proceso de molienda obteniéndose así el licor de cacao. Este se compone más de la mitad de su peso de cacao en polvo (53%) y el resto es manteca de cacao (17%) y otros elementos como taninos. Este es uno de los primeros productos obtenidos, y primordial para la elaboración de diversos subproductos, utilizado como cobertura o para la futura elaboración de chocolate.<sup>14</sup>



Fig. 15 Colocación de semillas de cacao en el molino y obtención del licor de cacao

El licor de cacao, pasa por un siguiente procedimiento para separar la manteca de cacao (el componente graso) del licor de cacao, dejando libre el cacao puro (torta de cacao) que después al pasar por la pulverización se vuelve polvo de cacao. <sup>14, 15</sup>

### **Manteca de cacao**

Es la grasa natural comestible de la semilla de cacao, que solo tiene un suave aroma y sabor a chocolate, se obtiene al someter a presión y calor al licor de cacao. En estado fundido es un líquido oleoso, límpido. Es usado en la producción de chocolates blancos, helados, así como en la industria cosmética (cremas humectantes, jabones) e industria farmacéutica. <sup>14, 35</sup>



Fig. 16 Manteca de cacao y sus usos



## Torta de cacao

Es el producto luego de que el licor de cacao ha pasado por el proceso de **prensado**, donde se separa la fase líquida (manteca de cacao) de los sólidos (torta de cacao) mediante prensas hidráulicas o mecánicas. Esta torta de cacao es triturada y envasada, también para su exportación. <sup>14,15</sup>



Fig. 17 Torta natural de cacao obtenida luego del proceso de prensado.

## Polvo de cacao

La torta de cacao también puede ser pulverizada y envasada como polvo de cacao. Es un polvo seco, de color café oscuro o bien claro, que tiene el sabor característico del cacao. Usado para exportación, o utilizada para mezclar con azúcar vitaminas y otros ingredientes para comercializar localmente como cocoa para bebidas. <sup>14,15</sup>

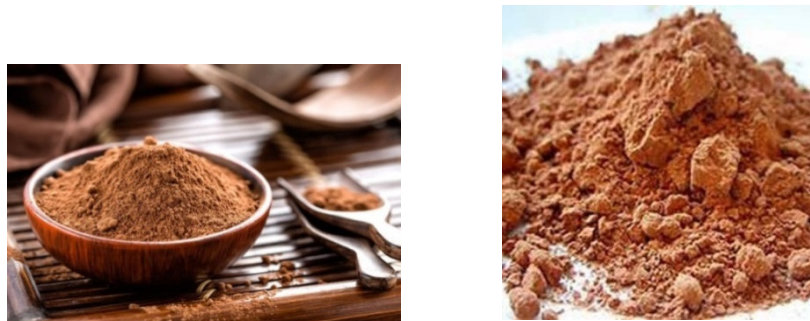


Fig.18 Polvo de cacao

## Chocolate

El chocolate es el derivado que se obtiene mezclando azúcar con dos productos provenientes de la manipulación de las semillas del cacao: una materia sólida (la pasta de cacao) y una materia grasa (la manteca de cacao). A partir de esta combinación básica, se elaboran los distintos tipos de chocolate, usando el licor de cacao, azúcar, leche y emulsificantes, en algunos casos frutos secos (pasas, almendras, etc.). Otros utilizan diferentes edulcorantes como xilitol. <sup>14,15,17</sup>



Fig. 19 Diferentes presentaciones de chocolate (cobertura, con leche, blanco y de taza)

La industria procura constantemente mejorar las propiedades reológicas de los derivados estudiando la interacción y sustitución de ingredientes específicos manteniendo o mejorando el valor nutritivo.

### Cáscara de cacao

Si bien no es un derivado, se considera el principal producto de desecho en la industria del chocolate. <sup>21</sup> Se obtiene luego del tostado de las semillas, las cuales son separadas de la cáscara para luego pasar por el proceso de molienda. <sup>14,15</sup> Se pueden utilizar para preparar infusiones.



Fig. 20 Cáscara de cacao.

Se han desarrollado estudios donde se utiliza para la alimentación de porcinos y gallos, como fuente comercial de pectinas, en la producción de espumas de poliuretano para uso hortícola y algunos hacen referencia a la actividad antibacteriana de extractos de la cáscara de cacao frente a *Streptococcus mutans*. <sup>21</sup>

#### 3.2.2.7 Producción y consumo en el mundo

El cacao ocupa el **tercer lugar**, después del azúcar y el café en el mercado mundial de materias primas. <sup>15</sup> La producción mundial de cacao en grano se concentra en países tropicales, principalmente de los continentes de África, América (América Central, Sudamérica) y el sureste de Asia. (Fig. 21) Según la producción anual los ocho países productores en el mundo son (en orden descendente): Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Papua Nueva Guinea (ICCO, 2008). Estos países representan el 90% de la producción mundial. <sup>35,37</sup>

Se observa que los mayores rendimientos de kilos por hectárea (kg/ha) los produce Indonesia, que alcanza niveles de 1 183 kg /ha, mientras que Perú promedia los 502 kg/ha, en el año 2006. <sup>41</sup> Este rendimiento ha ido en aumento en los siguientes años hasta la actualidad.

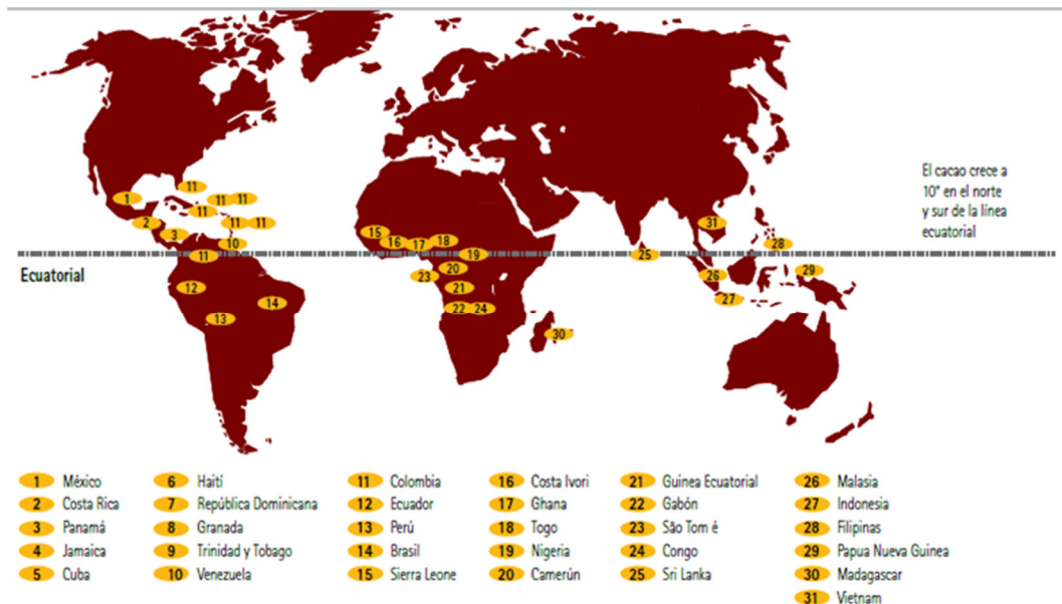


Fig. 21 Países productores de cacao en el mundo

En el año 2005, el Perú participó con el 0.7% de la producción de cacao mundial, y para el 2008 con el 1% de la producción mundial. <sup>43</sup>

A nivel de producción regional, el Perú se encuentra en cuarta posición con el 7%. En la región la mejor producción la tiene Brasil. <sup>41</sup> (Cuadro 4)

En cuanto al consumo, se da principalmente en países desarrollados, por ejemplo: los Estados Unidos, Alemania, Francia y el Reino Unido, que abarcan más del 50 % de la demanda mundial (DGPA, 2007). Asimismo, son los principales transformadores y productores del chocolate. <sup>35</sup>

**Cuadro. 4. Base de datos de producción regional de cacao**

País	Área cosechada (HA)	Producción (TON)	Rendimiento (kg/ha)	Part. %
Brasil	627 276,00	199 412,00	317,90	53%
Ecuador	357 706,00	93 659,00	261,83	25%
Colombia	92 105,00	37 099,00	402,79	10%
Perú	50 313,00	25 257,00	502,00	7%
Venezuela	51 825,00	17 151,00	330,94	5%
Bolivia	5 340,00	4 474,00	837,83	1%
<b>Total general</b>	<b>1 184 565,00</b>	<b>377 052,00</b>		

### 3.2.2.8 Producción en el Perú

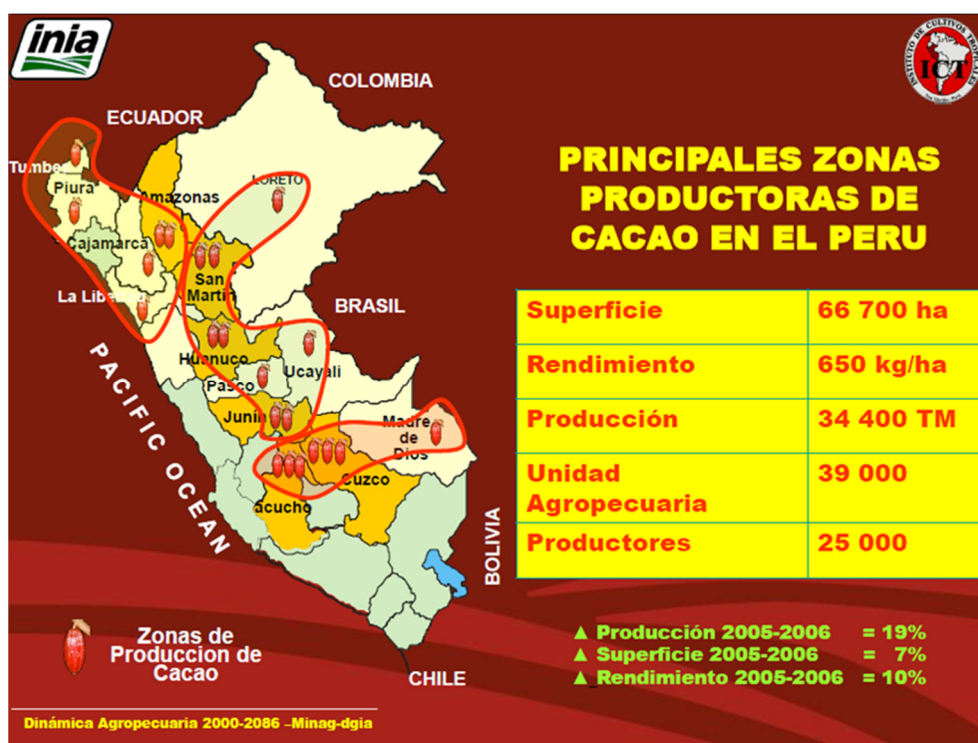


Fig. 22 Principales zonas de cultivo de cacao en el Perú. 2006

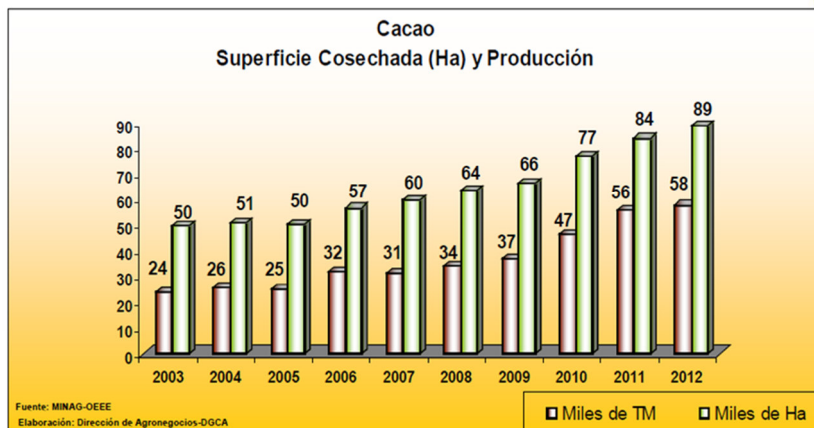
La producción de cacao en el Perú se concentra en la parte baja de la vertiente oriente de los Andes entre los 200 y 900 metros sobre el nivel de mar. El 75% de la producción por encima de los 600 msnm. Las principales zonas de cultivo se ubican principalmente en el valle del Río Apurímac- Ene (Junín, Ayacucho y Cusco), el valle de la Convención (Cusco), el valle del Huallaga (Huánuco y San Martín), el valle del Tambo (Junín), y el valle del Marañón (Cajamarca y Amazonas).<sup>40,43,44</sup> (Fig. 22 y 23)



Fig. 23 Producción de cacao por Departamentos –MINAG 2008

Hacia el 2012, el Ministerio de Agricultura (MINAG) declaró “Patrimonio Natural de la Nación al Cacao Peruano: *Theobroma cacao* L”, y creó el Registro Nacional de Cultivares de Cacao Peruano (RNCCP).<sup>42</sup>

Según datos del MINAG en este año (2012), el Perú figuraba como segundo productor mundial de cacao orgánico, cuyo crecimiento se debe a programas efectivos de transferencia de tecnología y a la calidad intrínseca de la almendra del cacao peruano.<sup>42</sup>



Aproximadamente 14 mil hectáreas con certificación orgánica

Fig. 24 Producción en toneladas y hectáreas de cacao en el Perú. MINAG 2012

El Perú es una de las naciones con mayor calidad del cacao, y solo el año pasado (nota de prensa MINAG, abril 2012) <sup>42</sup> la producción de ese fruto llegó a 56.5 mil toneladas, generando 5.7 millones de jornales, beneficiando de manera directa a 30 mil familias, e indirectamente a 150,000 personas. Al final de ese año, se estima que la producción crecerá entre 15% y 16%. El 90% de cacao y sus preparaciones se destinan a la exportación. <sup>42</sup>

Así mismo, como una manera de incentivar el cultivo y producción de este fruto, el MINAG dispuso declarar el primero de octubre de cada año como el “Día del Cacao y el Chocolate”, y promover, junto con otras entidades, la realización del “Salón del Cacao y Chocolate”, actividad similar al evento del Salon Du Chocolat de París (Francia), que congrega a las muestras del fruto a nivel mundial. (Fig. 25)



Fig. 25 5to Salón del cacao y chocolate, realizados los días 4,5,6 julio 2014- Parque de la Reserva, Lima

Actualmente el cacao se ha vuelto un cultivo de renta importante y premisor en el Perú.<sup>43</sup> Este crecimiento de los cultivos, y por consiguiente de la producción, se debe en parte a que se ha promocionado el cultivo cacao como una alternativa al cultivo ilegal de la hoja de coca en muchas regiones pobres del Perú.<sup>35,37,39</sup> El Programa de las Naciones Unidas para la Fiscalización Internacional de Drogas, PROAMAZONIA en su informe refuerza esta afirmación al indicar que a mediados de la década 1990 se incentivó la promoción del cultivo en las zonas de La Convención, el valle del río Apurímac y el Alto Huallaga, como alternativa a la producción de coca, fomentando así el aumento de áreas de cultivo.<sup>43</sup>



### 3.2.2.9 Variedades del cacao peruano: el cacao “chuncho” del Cuzco.

El cacao que se produce en el Perú es del tipo aromático y está caracterizado por su alto contenido de grasa (hasta un 57%). Esto le confiere un mayor valor comercial en el mercado internacional.<sup>35</sup>

MACRORREGIONES PRODUCTORAS DE CACAO		
MACRORREGIÓN	REGIÓN	VARIEDADES DE CACAO
Norte	Piura y Tumbes	En Tumbes se encontraron variedades híbridas, producto del cruce de trinitarios con nacional, a las que se ha denominado criollas. En Piura se ha encontrado la variedad denominada Porcelana.
	Selva norte: Jaén, San Ignacio (Cajamarca) Bagua y Utubamba (Amazonas)	Se ha encontrado material genético muy disperso con procedencia local y foránea. En Jaén, el Banco de germoplasma de cacao posee una amplia diversidad de clones.
	San Martín	Tiene una amplia diversidad de material genético híbrido, y pocas variedades trinitarias que ocupan más del 70% de las plantaciones de cacao a nivel de la región. Existe una amplia variación genética en sus caracteres morfológicos, tanto a nivel de frutos como a nivel de semillas.
Centro	Huánuco (Tingo María)	En esta región, el clon CCN-51 ocupa un área significativa.
	Junín (Satipo)	Existe material genético que corresponde a híbridos segregantes de cacao Trinitario y/o cruces de Trinitario con Forastero.
Sur	Valle del río apurímac –Ene VRAEM (Ayacucho)	Exhiben plantaciones de cacao denominados “criollos”, que corresponden a una mezcla de híbridos interregionales procedentes de la Estación Experimental Agrícola de Tulumayo (Tingo María).
	Cuzco	Se tiene una variedad nativa denominada “Chuncho”, que exhibe una amplia diversidad genética entre y dentro de las poblaciones. Existen además variedades de híbridos introducidos hace 30 años.

Cuadro 5. Macrorregiones productoras de cacao en el Perú.

Fuente: Sistematización del concurso del superárbol de cacao chuncho del Cusco. 2009. Municipalidad Distrital de Echarate. Gobierno Regional del Cusco.

En el estudio “Caracterización del Potencial Genético del Cacao en el Perú”<sup>39</sup> se describe la situación de variedades del cacao, dividiendo al país en tres: macrorregiones norte, centro y sur. La macrorregión norte comprende las regiones de Tumbes, Piura, Cajamarca, Amazonas y San Martín; la macrorregión centro, las regiones de Huánuco y Junín, y la macrorregión sur, las regiones de Ayacucho y Cusco.<sup>39, 41</sup> (Cuadro 5)

En este mismo estudio se refiere que en nuestro país se ha observado en pequeñas áreas y en contadas oportunidades, presencia de clones ICS (ICS -1, ICS -6 e ICS -95), UF (UF -613), Forasteros del Alto Amazonas (IMC -67), y el clon TSH -565, como clones acompañantes al clon CCN-51 y en muy baja proporción, al interior de las plantaciones clonales y algunas selecciones del agricultor. <sup>39</sup>

En la región Cusco, la producción del cacao se concentra en la provincia de La Convención y es específicamente en el distrito de Echarate donde se desarrolla la mayor actividad cacaotera.

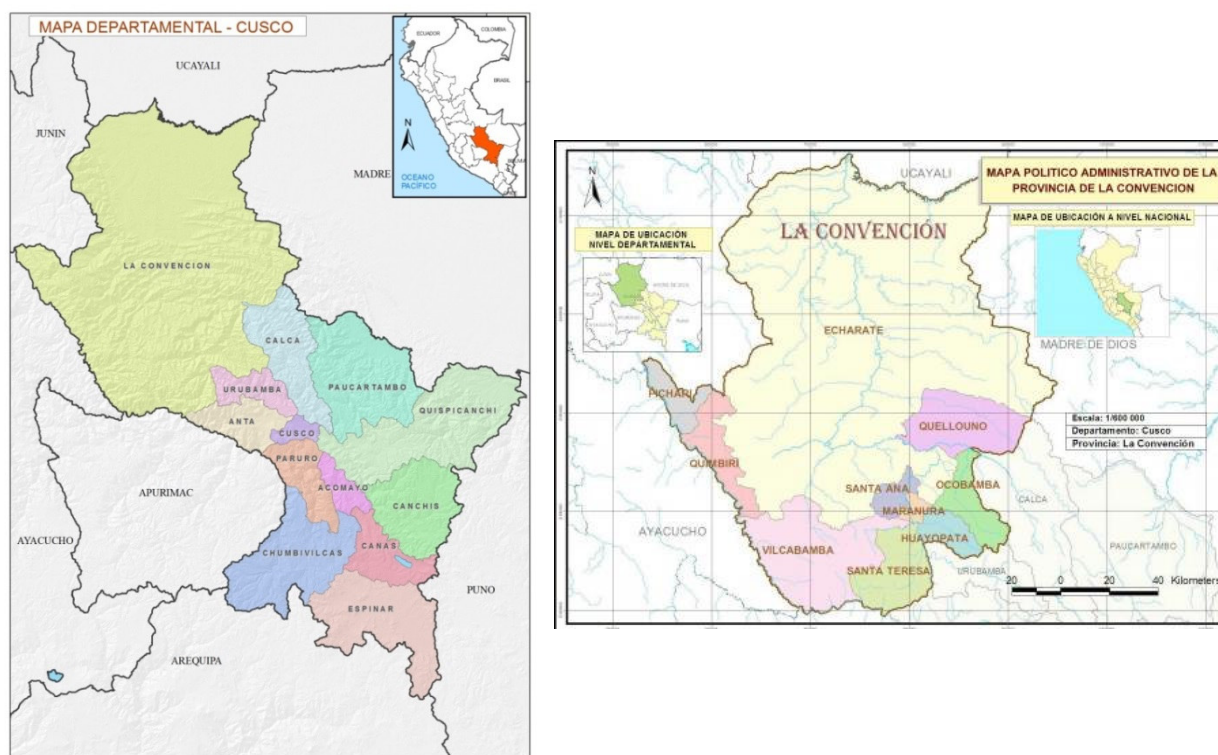


Fig. 26 Ubicación geográfica de la provincia de La Convención –Región Cuzco

La Convención cuenta con 10 distritos y su capital es la ciudad de Quillabamba situada en el centro sur de la provincia de La Convención en el distrito de Santa Ana. El distrito de mayor extensión territorial es Echarate con 19,135.50 Km<sup>2</sup> que representa el 63.65% del total provincial y altitudes que van desde los 300 hasta 1,000 msnm. Con

una configuración topográfica generalmente abrupta y suelos con pendientes mayores del 20%. <sup>39</sup> (Fig. 26)

La provincia de La Convención está ubicada en la “ceja de selva”, zona que se extiende desde los 1 400 hasta los 400 m.s.n.m. Posee condiciones edafoclimáticas óptimas para el desarrollo del cultivo de cacao. <sup>41</sup>

Presenta un paisaje tropical de sabana con precipitaciones en el verano austral y estación seca de abril a septiembre. La temperatura en Quillabamba es en promedio de 23.3 °C y la precipitación oscila de 1,400 – 2,200 mm valor que es menor al rango óptimo para el cultivo del cacao. El pH, dependiendo de los lugares puede oscilar de 5 – 6.5 y el contenido de M.O del suelo es generalmente medio (3 - 4%) <sup>39</sup>

En el valle de La Convención existen 14 500 ha de cacao. Los fundos cacaoteros poseen plantaciones de entre 40-80 años, con rendimientos que oscilan en 250-350 kg/ha. Esta actividad tiene una importancia económica relevante por la capacidad generadora de trabajo. El 80% de los cultivos se encuentran en parcelas menores a 2 ha, y el 20% restante en extensiones que varían entre 2 ha y 5 ha. <sup>41</sup>

En esta región del valle de La Convención se cultiva una variedad de cacao denominada “**Chuncho**” que ocupa el 80% del área cultivada con edades que fluctúan entre 40 - 80 años. Esta raza local fue domesticada por la comunidad nativa “Matsiguengas” y su área inicialmente cultivada fue ampliada en la época de las haciendas. El 20% de los cultivos pertenecen a la variedad híbridos. <sup>39,41</sup> (Fig. 27)



Fig. 27 Mazorca y semillas de cacao, variedad "Chuncho"

En esta zona, las épocas de cosecha son distintas de acuerdo a la variedad y al piso ecológico. El cacao Chuncho se cosecha en su mayor volumen entre los meses de diciembre a febrero, y el restante hasta la quincena de abril. Los híbridos se cosechan todo el año, siendo el mayor volumen entre los meses de abril a julio. La principal dificultad para la cosecha es la altura de las plantas de cacao chuncho que en muchos casos alcanza los 10 o 12 m. de altura.<sup>39, 41</sup>

### 3.2.2.10 Efectos adversos del cacao

Entre las cualidades "negativas" que se atribuyen al chocolate, tenemos a las alergias y la obesidad; pero éstas no se deben directamente al cacao, sino a los productos adicionales que se agregan en su elaboración, tales como la leche, nueces, azúcares, etc.<sup>35</sup> Por ello, muchos consumidores están tendiendo a adquirir los chocolates con alto contenido de cacao, en porcentajes que varían de 60% hasta el 80%.

El cacao contiene teobromina, teofilina y cafeína, sustancias químicas que tienen efectos estimulantes. Algunas personas pueden experimentar aumentos en la energía, la motivación y el estado de alerta al tomar cacao, como señala Drugs.com.<sup>45</sup> Aunque

los niveles de cafeína son bajos, algunas personas son sensibles a esta sustancia, e incluso pequeñas cantidades pueden causar efectos secundarios desagradables. Estos efectos pueden incluir agitación, nerviosismo, irritabilidad y problemas de concentración. Los signos físicos de exceso de cafeína pueden incluir temblores en las manos, dolores de cabeza y latidos cardíacos adicionales. El contenido de cafeína debe limitarse durante el embarazo.<sup>45</sup>

Aunque es poco probable, algunas personas pueden experimentar una reacción alérgica a los suplementos de cacao. Se ha reportado asma ocupacional en trabajadores de fábrica de confitería.<sup>46</sup> El cacao no es tóxico cuando se ingiere en cantidades típicas. Sin embargo, si se ha evidenciado su toxicidad en animales (perros), puesto que los perros son deficientes en la metabolización de la teobromina.

<sup>45,47</sup>

Los ingredientes farmacológicamente activos de las semillas de cacao incluyen aminas, alcaloides, ácidos grasos, polifenoles (incluyendo los flavonoides), tiramina, magnesio, feniletilamina y N-aciletanolaminas.<sup>45</sup>

### 3.2.3 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (POLIFENOLES)

Los polifenoles son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y distribuidos entre las especies vegetales, con más de 8 000 estructuras químicas reportadas, caracterizados por tener en su estructura química al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y frecuentemente se encuentra como derivado de ésteres, éteres y glucósidos.<sup>15</sup> Son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes de la dieta, poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante.<sup>38</sup>

Los polifenoles constituyen uno de los grupos más comunes y extendidos de sustancias de la floración de plantas, que están presentes en todos los órganos vegetativos, así como en las flores y frutas.<sup>47</sup> Participan en la defensa química de los vegetales contra los depredadores, protección al ataque de patógenos o herbívoros, actúan como señalizadores químicos, indicando a los insectos que planta es apropiada para su alimentación, oviposición o simplemente guiándolos y facilitando así la polinización.<sup>16,38,47</sup>

Desde el punto de vista químico los compuestos fenólicos son caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos.<sup>14</sup> Fig. 28

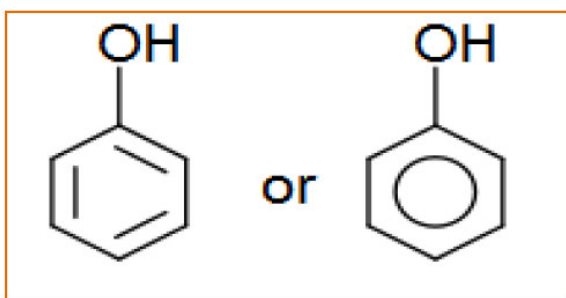


Fig. 28 Estructura química de los fenoles

Los polifenoles se relacionan directamente con algunas características de los alimentos como son el sabor, color, la palatabilidad y el valor nutricional. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos y flavonoides como el ácido cumárico y la quercetina y los taninos, entre los cuales el más activo biológicamente es la **epicatequina**. Estos fenoles con peso molecular relativamente alto tienen un poder antioxidante 20 veces más fuerte que la vitamina E.<sup>24</sup>

### 3.2.3.1 Diferentes tipos de compuestos polifenólicos y efectos en la salud

Los polifenoles se dividen en varias clases según el número de anillos de fenol que contienen y a los elementos estructurales que se unen estos anillos entre sí. Los principales grupos de polifenoles son: flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos.<sup>48</sup> Los flavonoides constituyen la más grande y diversa familia de polifenoles. Más de 4.000 flavonoides han sido identificados en plantas y la lista está en constante crecimiento.<sup>48</sup>

En cuanto a los flavonoides se refiere (término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas) la estructura básica de consta de dos anillos aromáticos unidos por 3 átomos de carbono, más a menudo formando un anillo heterocíclico, éstos se representa bien en la Figura 29.<sup>15, 48</sup>

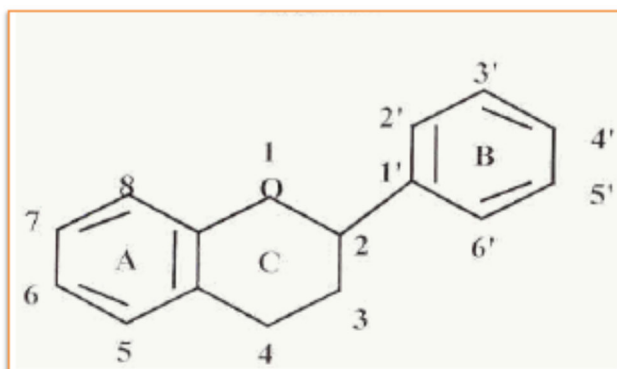


Fig. 29 Estructura básica de los flavonoides sin sustituyentes

La mayor parte de los polifenoles extraíbles (PE) presentes en alimentos forma parte del grupo de los flavonoides (principalmente flavanoles, flavonoles, flavanonas y antiocianidinas), por ser el grupo de polifenoles presente de manera más extensa en los alimentos vegetales. <sup>38</sup>

La estructura y cantidad de los compuestos polifenólicos está estrechamente ligada a su acción biológica ya que influirá en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos y por tanto en sus efectos sobre diferentes partes del organismo humano. <sup>38</sup>

Los beneficios para la salud de los polifenoles incluyen efectos antioxidante, anticancerígena, y anti-inflamatorios. Por otra parte, los estudios experimentales, apoyan fuertemente un papel de los polifenoles en la prevención de enfermedad cardiovascular. En particular, se ha demostrado que el consumo de polifenoles limita el desarrollo de lesiones ateromatosas, inhibiendo la oxidación de lipoproteína de baja densidad. <sup>48</sup>

Los efectos antimicrobianos de los polifenoles también han sido ampliamente informado que tiene su capacidad para inactivar las toxinas bacterianas, y hay un creciente interés en este tema porque polifenoles de las plantas podría representar una fuente nueva contra agentes patógenos humanos resistentes a los antibióticos. <sup>49</sup>

Los antioxidantes como los polifenoles, actúan a menudo como agentes reductores y ejercen funciones preventivas (neuroprotectoras) contra enfermedades tan importantes como las coronarias y otras igualmente temidas por el hombre como el Parkinson y Alzheimer, que se caracterizan particularmente por la disminución de la funcionalidad de células cerebrales. <sup>14</sup>

Numerosos estudios clínicos sobre efectos de polifenoles en salud (Cuadro 6) utilizan compuestos aislados o alimentos ricos en polifenoles. <sup>38</sup>



### **3.2.3.2 Los polifenoles en la salud oral**

En la mucosa oral, los polifenoles (PF) alcanzan una concentración más alta con respecto a todos los demás tejidos. Proteínas ricas en prolina y estatinas junto con los PF forman complejos estables en la cavidad oral que permanecen estables a lo largo de todo el tracto gastrointestinal. Su actividad antioxidante y efecto preventivo contra enfermedades de la cavidad oral se hacen presentes ya que estos compuestos entran en contacto directo con los tejidos de la boca antes de ser absorbido y metabolizado. <sup>5</sup>

Algunos hidroxilos de los PF son muy reactivos, pero hay otras funciones defensivas importantes con respecto a su efecto sobre las enfermedades dentales, similar a la defensa de las plantas contra los microorganismos patógenos; los ácidos fenólicos son antimicrobianos y están directamente involucrados en la respuesta a los microorganismos. <sup>5</sup>

Estos compuestos fenólicos muestran actividad sobre las enfermedades de la cavidad oral.

Modo de administración	Compuesto polifenólico	Dosis por día	Efectos en salud
Extracto de Gingo Biloba Cebolla	Quercetina Quercetina	120-320 mg 114 mg	Disminución presión arterial Disminución radicales libres
Dieta rica en polifenoles	Quercetina y kaempferol	21 mg quercetina + 9 mg kaempferol	Aumento de la actividad de superóxido dismutasa
Suplementación	Quercetina	30-500 mg	Disminución del daño oxidativo en DNA Disminución de incidencia de cáncer de pulmón y gástrico Aumento resistencia oxidación LDL
Alimentos derivados de soja	Genisteina, Daidzeína	25-45 mg	Aumento densidad ósea
Soja	Genisteina, Daidzeína	40 mg	Decrecimiento síntomas posmenopáusicos
Extracto isoflavonas	Genisteina, Daidzeína	100 mg	Disminución en LDL colesterol
Proteína de soja	Isoflavonas	90-130 mg	Menor resistencia a insulina
Suplementación	Isoflavonas	60-130 mg	Disminución de riesgo de cáncer de próstata
Té verde y negro Extractos	Catequinas Catequinas	450-1000 ml 18 mg - 375 mg	Aumento de la capacidad antioxidante plasmática Disminución de MDA en plasma Disminución de peso corporal Disminución riesgo diferentes cánceres
Cacao	Procianidinas	70-900 mg	Disminución de la presión sistólica y diastólica
Chocolate	Procianidinas	320 mg	Disminución de oxidación de LDL
Vino tinto	Procianidinas	250-500 ml vino	Disminución peróxidos en plasma
Zumo de uva, arándanos, mora	Procianidinas	50-500 ml zumo	Disminución MDA, agregación plaquetaria, aumento vit C
Zumo de granada	Procianidinas	1,5 mmoles	Aumento CAO plasma, resistencia oxidación LDL
Extracto de pepitas de uva	Procianidinas	100 mg	Disminución de circulación de anticuerpos a LDL oxidadas Disminución riesgo cáncer colon

Cuadro 6. Efectos en la salud de los compuestos polifenólicos de alimentos.

Fuente: Arranz Martínez, S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. (Memoria para optar el grado de doctor). Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2010.

Así se ha visto por ejemplo, que las catequinas del té inhiben la producción de metaloproteinasas importantes, por lo tanto reducen potencialmente la invasión y la migración, la inducción de la apoptosis y la detención del crecimiento para el **cáncer oral** y las líneas celulares como **leucoplasias orales**. La prevención del estrés oxidativo, la modulación del metabolismo carcinógeno y la prevención de daños en el ADN se han sugerido como posibles mecanismos de prevención de cáncer de los polifenoles derivados del té. <sup>5</sup>

Los polifenoles también pueden contribuir a aumentar la actividad antioxidante de los fluidos orales. Cuando hay un desequilibrio entre el estrés oxidativo y la actividad antioxidante, puede parecer la destrucción del tejido periodontal. Esto sugiere que las dietas ricas en antioxidantes podrían inhibir el desarrollo de la **enfermedad periodontal** y la progresión, sobre todo en los sujetos expuestos a fuentes ambientales y dietéticas de estrés oxidativo. <sup>5</sup>

Además, también se sabe que los PF tienen actividad antimicrobiana sobre patógenos periodontales, previenen la formación de biofilm e incluso disminuyen la profundidad de la bolsa con la aplicación local. Existen estudios que muestran que los polifenoles del té tienen un efecto promoviendo la proliferación de los fibroblastos del ligamento periodontal. San Román SI (2013), <sup>3</sup> comprobó que existe igual actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* "romero" a una concentración de 75mg/ml comparado con la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con **periodontitis crónica**.

Su actividad frente a **caries dental** ha sido reportada en numerosas investigaciones, que coinciden en su efecto antibacteriano sobre el *S. mutans* y sus mecanismos de patogenicidad. Nalina T. y Rahim Z.H.A (2006) <sup>50</sup>, determinaron que el extracto crudo de Piper betle L. tenía efectos sobre el crecimiento, la hidrofobicidad de la superficie celular, la propiedad adherente y actividad glucosiltransferasa de los *S. mutans*.

Smullen J y col (2007) <sup>25</sup>, en su estudio determinó que los extractos de plantas que contienen niveles altos de polifenoles (té verde, té negro, cacao fermentado, sin fermentar, semilla de uva, canela en polvo, extracto de vino tinto, concentrado de limón) inhibieron el crecimiento de *Streptococcus mutans* y otras bacterias. La inhibición de *S. mutans* se produjo en presencia tanto de sacarosa y glucosa. <sup>25</sup>

Los efectos anti-cariogénicos contra estreptococos alfa hemolítico se determinaron por los polifenoles de cacao, café y té en un estudio realizado por Ferrazzano y col. <sup>48</sup> También sugieren más estudios para una posible aplicación de estas bebidas en la prevención de la patogenia de la **caries dental**.

Como se observa existe suficiente evidencia de los beneficios de los polifenoles en la salud oral, pese a ello se necesitan más estudios en humanos para confirmar los prometedores resultados proporcionados por muchos estudios experimentales in vitro. Un mejor conocimiento de la estructura, la dosis y la biodisponibilidad de los polifenoles de la dieta será esencial en el futuro para evaluar adecuadamente su papel en la prevención de las enfermedades bucodentales. <sup>5</sup>

### **3.2.3.3 Mecanismo de acción**

Los polifenoles son agentes naturales antibacterianos y antioxidantes.<sup>5</sup>

En el cuerpo humano una vez ingeridos los polifenoles (por medio de diversos derivados como el chocolate) son digeridos, pasan a la sangre aumentando la **capacidad antioxidante** en nuestro organismo. Estas sustancias actúan como potentes secuestradores de especies reactivas de oxígeno y además son capaces de inhibir a enzimas productoras de radicales libres, reduciendo el riesgo de contraer diversas enfermedades neoplásicas, enfermedades cardiovasculares, e incluso previniendo enfermedades como el alzhéimer y párkinson.<sup>14,20</sup>

Según una hipótesis, la actividad antioxidante de los polifenoles (PP) contra varias formas de cáncer, enfermedades proliferativas, la inflamación y la neurodegeneración

se ejerce principalmente a través de la inhibición y modulación de las actividades contra una amplia gama de receptores, enzimas y moléculas de transcripción.<sup>5</sup>

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero.<sup>16</sup>

Dentro de sus efectos antibacterianos, los polifenoles desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, donde pueden retrasar el crecimiento debido a que cambian las condiciones del medio y penetran en la membrana celular de los microorganismos provocando lisis. Algunos flavonoides tienen su participación en la inhibición debido a que estos generalmente se relacionan con la inhibición de síntesis de ADN y ARN y otras macromoléculas. Los componentes polifenólicos con más de 3 grupos hidroxilo tienen una alta actividad antimicrobiana, debido a que impiden la captación de iones hierro e hidrógeno vitales para la síntesis de proteínas en la célula.<sup>3</sup>

Los polifenoles confieren efecto inhibitorio en el desarrollo del *Streptococcus mutans* y también sobre los hongos.<sup>11</sup>

#### **3.2.3.4 El cacao como fuente de polifenoles**

En la semilla de cacao los polifenoles se encuentran en la cáscara y en el cotiledón, el cual se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con polifenoles específicos como las catequinas y antocianinas. Los polifenoles en la semilla de cacao constituyen aproximadamente entre el 8% y el 10% del peso seco de la semilla.<sup>14</sup>

Figura 30

<u>Compuesto</u>	(%) de compuestos polifenólicos en la célula almacenadora	(%) de compuestos polifenólicos en los cotiledones
Catequina	25,0	3,0
Proantocianidina	21,0	2,5
Polímeros de Proantocianidina	17,5	2,1
Antocianinas	3,0	0,4
Fenoles totales	66,5	<b>8,0</b>
Teobromina	14,0	1,7
Cafeína	0,5	0,1
Azúcares libres	1,6	-
Polisacáridos	3,0	-
Otros	14,4	-




Fig. 30 Porcentaje de polifenoles en semilla de cacao.  
 Fuente: Suazo Mercado Y. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense. Pamplona: Universidad Pública de Navarra, 2012.

Se estima que del total de polifenoles en esta semilla, el 60% son flavanoides.<sup>14</sup>

Los flavonoides ocupan un lugar muy importante entre los antioxidantes naturales provenientes de la dieta. Las manzanas, el té, el vino, los arándanos, entre otros frutos, han sido identificados como ricos en estos polifenoles; pero sin lugar a duda el cacao y sus productos derivados (polvo de cacao, licor de cacao) se caracterizan por tener un alto contenido de estos compuestos.<sup>15</sup>

Dentro de estos metabolitos tipo flavonoide, existen especialmente 3 grupos básicos en la semilla de cacao: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es (-)-epicatequina que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles del grano.<sup>15</sup>

Además de ello, estos compuestos tienen un amplio rango de actividad biológica, entre los que se identifican efectos antibacterianos, antiinflamatorios, antialérgicos,

hepatoprotectores, antitrombóticos, antivirales, anticarcinogénicos y vasodilatadores, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas. <sup>15,16</sup>

Diferentes estudios demuestran que la actividad inhibitoria sobre enzimas como la glucosiltransferasa, se atribuye a los polifenoles presentes en las semillas de cacao <sup>1</sup>, por tanto puede inferirse que este fruto tiene propiedades bacteriostáticas frente a bacterias cariogénicas, entre ellas el *Streptococcus mutans*. <sup>1,2,3</sup>

En cuanto a su actividad antibacteriana, Cuéllar GO y Guerrero AG. 2012., evaluaron la actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, con el fin de buscar nuevas alternativas de uso del principal desecho en la cadena de elaboración de chocolate. <sup>37</sup> Se observó que la fracción clorofórmica inhibió el crecimiento de *Bacillus cereus* y *Streptococcus agalactiae*, así como presentó efecto bacteriostático frente al microorganismo Gram negativo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. <sup>37</sup>

### **3.2.3.5 Procesos que influyen en la concentración de polifenoles de la semilla de cacao. Fermentado, secado, tostado.**

Las concentraciones de polifenoles dependen de varios factores, pero principalmente de los procesos pos cosecha a la que es sometida la semilla durante la elaboración de derivados. Esto es debido a que los procesos post cosecha tienen como principal objetivo el perfil organoléptico de los derivados como el chocolate, pese a ello, este derivado conserva importantes concentraciones de compuestos con poder antioxidantes, importante en la salud humana. <sup>14</sup>

### ❖ Procesos de pre industrialización: fermentado y secado

El fermentado comienza con la extracción de la semilla, las cuales son removidas de la mazorca, que se parte con objetos de madera. (Fig. 31) Las semillas son transferidas a cajas de madera donde se dejan para su fermentación (Fig. 32), que dura de 2 -3 días para el cacao criollo, y de 5 -7 días para el cacao forastero, tiempo durante el cual los polifenoles se oxidan bajando su concentración inicial y provocan cambios en el color de la semilla. <sup>14,15</sup>

Cualquiera que sea el método empleado siempre se deberá realizar volteos periódicos y oportunos a la masa de semillas en fermentación. <sup>14</sup>



Fig. 31 Partido apropiado del fruto de cacao para la obtención de semillas



Fig. 32. Cajones de madera para fermentar semillas de cacao, tapados de diferentes formas.

Luego de esto, las semillas pasan por un proceso de secado, el cual puede ser en hornos calentados de diversas formas o al sol. <sup>14</sup> Se utiliza el secado al sol (Fig. 33), en zonas de cultivo donde la cosecha coincide con una estación seca, mientras que en época lluviosa se usa el secado en horno. (Fig. 34)



El objetivo del secado es reducir la humedad de los granos hasta un 5 -7%, para permitir su almacenamiento y transporte, porque con una humedad superior aumenta la probabilidad de contaminación fúngica. <sup>15</sup>



Fig. 33 Secado al sol de semillas de cacao fermentado



Fig. 34 Secado en hornos a leña de las semillas de cacao fermentadas

#### ❖ Proceso de industrialización

La semilla ya fermentada y secada por los productores, es llevada a la industria para ser procesada (tostada, molida, mezclada con otros ingredientes como leche, azúcar, etc).

El **tostado** es una operación de procesado del cacao muy importante que determina en gran medida el color, aroma y sabor de los derivados del cacao. Durante el tostado el color del cacao sufre un pardeamiento adicional al observado durante las etapas previas de fermentación y secado. <sup>14</sup> (Fig. 35)

Una tosti3n correcta es un proceso dependiente del tiempo y la temperatura, donde el tiempo puede variar entre 5 y 120 minutos y la temperatura entre 120 y 150 °C. <sup>15</sup>

Durante el tueste de la semilla a temperaturas menores se estima un 14% de p3rdidas en la concentraci3n de polifenoles. <sup>14</sup>

Al tostar el grano, este pierde su cobertura externa, la c3scara la cual es removida f3cilmente y da lugar a la almendra que continuara con el proceso de molienda para obtener el licor de cacao. <sup>15</sup>



Fig. 35 Tostado artesanal de semillas de cacao

Frente a estos procesos, Gil. J (2012) <sup>15</sup>, en un estudio a partir de un mismo lote de cacao seleccionado, encontró una disminución del 60% para el contenido de polifenoles y 45% para la actividad antioxidante, durante la fermentación y el secado al sol; sumado a un 4.0 y 17.6% adicional de pérdida durante la industrialización. Se perdió un 88.2% (12.7 a 1.5 mg/g) de epicatequina, desde el inicio de la fermentación de los granos hasta la obtención del licor a nivel industrial. <sup>15</sup>

Suazo Y (2012) <sup>14</sup>, determinó que los valores en la concentración de polifenoles totales (PT) y actividad antioxidante (AA) fueron mucho más elevados en el cacao sin fermentar (CSF) que en las muestras de cacao fermentado. Además el tostado del cacao provocó un descenso del contenido en PT, en particular en los cacaos fermentados, y más acusado a temperaturas de tostado de 130°C y 150°C que a 110°C.

La oxidación enzimática durante la fermentación y el incremento de la temperatura durante el secado en campo son factores importantes vinculados a la pérdida de polifenoles, disminuyendo hasta cerca de 80% durante estas etapas de procesamiento, <sup>15</sup> además del porcentaje disminuido por el tostado.

### 3.2.3.6 Metodología para la extracción de compuestos fenólicos

Hasta el momento no hay un único procedimiento estándar y adecuado para la extracción de todos los compuestos polifenólicos o de las diferentes clases de polifenoles.<sup>38</sup>

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos.<sup>38</sup>

Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua. El filtrado final se concentra y se remueve el solvente. Esto es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas.<sup>16</sup>

Ruiz y Roque<sup>19</sup>, evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de *Cassia reticulata*, *Ilex guayusa* Loes, *Piper lineatum* y *Terminalia catappa*. La extracción se realizó por maceración a temperatura ambiente con etanol al 95%, metanol y solución hidro-alcohólica. Luego el solvente fue evaporado a sequedad en rotavapor a temperatura menor a 40 °C.

Gracia M.<sup>16</sup>, realizó una cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Para la extracción utilizó metanol, removiendo inicialmente los compuestos que no son de interés utilizando acetona y hexano. Posteriormente se utilizó el rotaevaporador hasta la completa evaporación del disolvente.

Doroteo V. y col,<sup>20</sup> determinaron el contenido de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales; así como la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de 6 plantas peruanas. Se maceraron las muestras en una mezcla de

etanol y agua destilada (7:3) por 4 días a temperatura ambiente. Luego se evaporó el solvente en un rotavapor a temperatura menor de 40 °C.

Para el caso del cacao, se han reportado desde extractos acuosos simples (Ito K. y col. 2003; Mariani y col. 2010; Rosas M. 2009) <sup>1,6,17</sup>, en base a la muestra del cacao (polvo de cacao) diluida en diferentes concentraciones con agua destilada, hasta extractos más complejos, como el descrito por Padilla y col. <sup>24</sup> que evaluó el contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces, entre ellas el *Theobroma cacao*. Las semillas de cacao fueron sometidas a previo desengrasado con hexano. Luego 1g de muestra se extrajo a temperatura ambiente con una mezcla acidificada de metanol-agua (50:50) por 1h con agitación constante, se centrifuga a 3000 rpm y se filtra, el residuo se extrae luego con acetona-agua (70:30), se centrifuga y se filtra, los filtrados se combinan en el balón aforado de 100ml y se lleva a volumen con una mezcla 50:50 de las dos soluciones extractivas. <sup>24</sup>

Con respecto a la etapa de desengrasado, Gil J (2012) <sup>15</sup> observó las variaciones en la cantidad de polifenoles totales, cuando las muestras son sometidas o no al proceso de desengrase. Se encontró que el contenido de polifenoles totales para las muestras desengrasadas y no desengrasadas fue  $49.9 \pm 0.252$  y  $48.8 \pm 0.473$  mg GAE/g respectivamente. Si bien es cierto existe una diferencia estadísticamente significativa, esta es de 1mg/g muestra; además los resultados del perfil cromatográfico demuestran que los compuestos polifenólicos no se ven alterados ni en composición ni cantidad por este proceso, lo que hace concluir que el proceso de desengrase no es necesario en este método analítico, lo que reduce costos, tiempo y solventes. <sup>15</sup>

Cuellar y col <sup>21</sup>, evaluaron la actividad antibacteriana esta vez de cáscara de *Theobroma cacao* L., para ello se evaluaron extractos a partir de la cáscara de cacao molida previamente desengrasada con hexano. El solvente fue una mezcla de etanol absoluto: agua (1:1), bajo agitación magnética, a 25°C por 2 horas. El extracto crudo se

filtró al vacío y se conservó protegido de la luz a 4°C. A partir de este extracto crudo se hizo un fraccionamiento líquido-líquido empleando cloroformo, acetato de etilo y *n*-butanol. La fracción clorofórmica resultó promisoría inhibiendo el crecimiento de las bacterias evaluadas. <sup>21</sup>

Independientemente del tipo de disolventes que se utilicen, la extracción siempre es incompleta y una cantidad de compuestos polifenólicos puede quedar en los residuos de la extracción. <sup>38</sup>

Como vemos son variados los métodos de extracción, pero todos coinciden en utilizar solventes orgánicos que permitan obtener estos compuestos en menor o mayor grado, los cuales pueden luego ser cuantificados bajo otros protocolos.

### **3.2.3.7 Metodología para la determinación y cuantificación de polifenoles totales.**

La importancia del análisis de los compuestos polifenólicos en los alimentos radica, no sólo, en encontrar el mejor método de extracción sino también en la cuantificación e identificación completa y precisa de estos compuestos <sup>38</sup>, a fin de controlar la calidad y los beneficios para la salud que presentan sus derivados.

Existen numerosos métodos espectrofotométricos basados en diferentes principios químicos que identifican desde polifenoles totales hasta determinados grupos de compuestos de manera más específica. Entre estos métodos se encuentran el método de Folin -Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales o el método de la vainillina para determinación de proantocianidina, entre otros. <sup>38</sup>

El **método de Folin -Ciocalteu**, es un análisis por espectrofotometría que se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado es el reactivo de Folin-Ciocalteu. <sup>16</sup> La aplicación de esta metodología para la determinación de polifenoles totales, está ampliamente documentada. <sup>8,14,15,16,20,24,38,50</sup>

En los últimos años la mayoría de los trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en la utilización de métodos cromatográficos <sup>38</sup>, cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) o electroforesis capilar (EC) acoplados muchas veces a espectrometría de masas (MS), como por ejemplo las descritas por Cala M. y col. 2011, Cuéllar GO y Guerrero AG. 2012., que permiten la identificación de compuestos fenólicos de manera más específica y cuantitativa.<sup>21,36</sup> La implementación de metodologías que permitan la determinación y cuantificación de catequinas en muestras vegetales, es de importancia para tareas de bioprospección, desarrollo de ingredientes para las industrias farmacéutica, de alimentos y cosmética, para el control de calidad, y muchas otras aplicaciones. <sup>36</sup>

#### **3.2.3.8 Actividad de los polifenoles del cacao sobre el *Streptococcus mutans***

Existe una gran cantidad de evidencia que demuestra el papel anticariogénico que tiene el cacao, sea en sus semillas como en su cáscara. Los efectos de los polifenoles se han estudiado a través de ambos estudios in vitro que investigan el efecto de los polifenoles contra *Streptococcus mutans* y estudios in vivo en animales y seres humanos. <sup>49</sup>

Existen estudios como el de PERCIVAL, y col. 2006 que evaluaron el efecto de los polifenoles del cacao sobre el crecimiento, el metabolismo y la formación de biopelículas por *S. mutans* y *S. sanguis*. Se observó una inhibición del crecimiento de ambas bacterias; así como una reducción en la producción de ácido de *S. mutans*. Los autores concluyeron que polifenoles de cacao pueden reducir la formación de biopelículas por *S. mutans* y *S. sanguinis*, e inhibir la producción de ácido por *S. mutans*. <sup>7</sup>

Los **polifenoles del cacao**, así como del café, parecen tener un efecto relevante en contra de la adhesión de bacterias a la superficie del diente, mientras que los polifenoles del té verde parecen tener otros efectos, siendo activos frente al crecimiento de *S. mutans*.<sup>48</sup>

También se ha visto que los polifenoles del cacao, tienen un efecto anticariogénico, inhibiendo a la enzima glucosiltransferasa GTF, de esta manera se reduce la síntesis de glucanos que forman parte de la matriz extracelular primordial para la adhesión bacteriana a la superficie del esmalte.

La cáscara de grano de cacao ha demostrado que posee dos tipos de sustancias cariostáticas, una que muestra actividad anti-glucosiltransferasa (GTF) y la otra actividad antibacteriana. (OSAWA, y col. 2001). En este estudio, se realizaron pruebas cromatográficas que demostraron la presencia de compuestos fenólicos en la cáscara de cacao, predominantemente epicatequinas; así como ácidos grasos: oleico y linoleico.<sup>9</sup>

Recientemente un estudio evaluó el efecto de las cáscaras molidas de granos de cacao, que son un producto de la fabricación de cacao y que tienen un alto contenido de polifenoles, se utilizaron para preparar un enjuague bucal para los niños. El uso regular de este enjuague bucal dio una reducción de 20,9% en el recuento de estreptococos mutans y fue aún más eficaz en la disminución de los índices de placa.

53

### **3.2.4 CLORHEXIDINA**

La clorhexidina es un antimicrobiano catiónico de amplio espectro.<sup>55</sup>

La clorhexidina se desarrolla en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra por científicos en un estudio contra la malaria, aunque nunca fue utilizada con este fin. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos 20 denominados polibiguanidas que demostraron tener un

amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para las heridas de la piel. Posteriormente comenzó a utilizarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano. En odontología empezó a utilizarse para desinfección de la boca y en endodoncia.<sup>3</sup>

Vale la pena considerar que en 1985 la Asociación Dental Americana-ADM y la Junta de Terapéutica Dental aprobaron agentes quimioterapéuticos para el control de la gingivitis y de la placa supragingival. Solamente dos antimicrobianos fueron aceptados: el Listerine® compuesto de fenol y aceites esenciales de timo y eucalipto, mezclados con metilsalicilato en un vehículo hidroalcohólico al 26.9%6 y el gluconato de clorhexidina.<sup>54</sup>

#### 3.2.4.1. Características

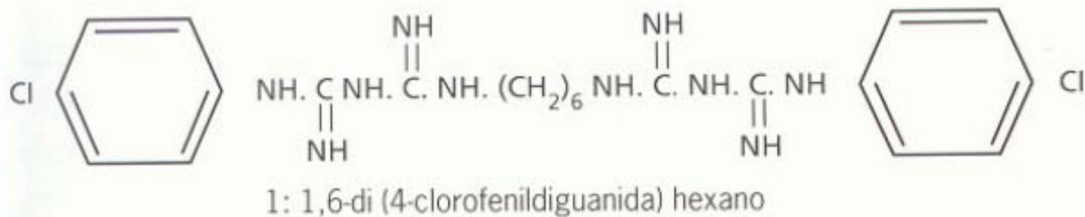


Fig. 36 Estructura química de la clorhexidina

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que decimos que es una bisguanida, la cual está conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida. (Fig. 36) Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a PH superior a 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que lo hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y su dificultad para formularla en productos.



Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en su forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua.<sup>3</sup>

#### **3.2.4.2. Mecanismo de acción**

La actividad antiséptica de la clorhexidina es superior a la de la povidona, la espuma de alcohol y el hexaclorofeno.<sup>56</sup>

Clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).<sup>3</sup>

La clorhexidina precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular. En las bacterias Gram-negativas, la clorhexidina afecta la membrana exterior permitiendo la liberación de las enzimas periplasmáticas. La membrana interna de estos microorganismos no es destruida, pero sí es impedida la absorción de pequeñas moléculas.<sup>56</sup>

En boca se adsorbe rápidamente a las superficies de contacto, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. Los depósitos de clorhexidina se forman por la interacción reversible de la molécula de clorhexidina con grupos fosfato, sulfato y carboxilo de los tejidos blandos y duros.<sup>3</sup>

Se une a las bacterias salivales interfiriendo de esta forma con su adherencia al diente. En un estudio, Poveda RM y cols. (2006)<sup>54</sup> determinaron que después de realizar varias aplicaciones de gluconato de clorhexidina al 0.12% se produce una inhibición de la adhesión del *Streptococcus mutans in vitro* a la superficie de restauraciones de polimetilmetacrilato.

Los siguientes microorganismos muestran una alta susceptibilidad a la clorhexidina: Estreptococos, estafilococos, *Cándida albicans*, *Escherichia coli*, salmonellas, y bacterias anaeróbicas.<sup>56</sup>

Estos microorganismos no tienen el mismo grado de sensibilidad a clorhexidina. Por ejemplo los microorganismos Gram + son más sensibles que los Gram -, mientras que los estreptococos son más sensibles que los estafilococos.<sup>3</sup>

### **3.2.4.3. Indicaciones**

Se aplica en la antisepsia de la piel en solución acuosa al 4 % con base detergente para el lavado corporal prequirúrgico del paciente y lavado de manos quirúrgico. También y en solución acuosa al 5 % para antisepsia del campo quirúrgico. Por su afinidad con la piel tiene una acción remanente de varias horas de duración. En heridas se utiliza a la concentración 0.1 ó 0,5 % en solución acuosa. Además puede emplearse en Ginecología, en quemaduras (ya que puede mezclarse con antibióticos de acción sinérgica) y en higiene del personal hospitalario.<sup>3</sup>

Una de sus aplicaciones es la higiene bucal, para ello se usa unida a edulcorantes potentes, pues tiene un sabor muy amargo.<sup>3</sup> Se utiliza para enjuagues bucales en el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal.

Además se ha observado sus múltiples aplicaciones en afecciones odontológicas como: estomatitis subprotesis, candidiasis bucal, pericoronaritis, periodontitis, gingivitis, perimplantitis, la estomatitis aftosa y para la irrigación de conductos en tratamientos de endodoncia.<sup>56</sup>

#### **3.2.4.4. Efectos adversos**

La efectividad de la clorhexidina ha sido demostrada ampliamente, al igual que los efectos adversos relacionados con su concentración como manchas en las superficies de los dientes y en la lengua; para reducir estas complicaciones se usan agentes antioxidantes y se disminuye la dosis diaria, métodos que solo han obtenido un éxito parcial.<sup>53</sup> Se ha identificado que esta tinción en dientes, restauraciones incluso porcelanas, es el efecto colateral más frecuente.<sup>3</sup>

No parece claro si la tinción es dosis dependiente así Rebstein en 1978 concluyó que no lo era, ya que reduciendo la concentración de clorhexidina al 0.0025 %, seguían presentándose las manchas.<sup>3</sup>

Otros efectos adversos descritos por la literatura son adormecimiento del sentido del gusto, lesiones descamativas gingivales, posible esfacelación de la mucosa e incremento en la formación de cálculo supragingival.<sup>54</sup>

Se ha comunicado parotiditis (inflamación de las glándulas salivares con obstrucción del conducto de la parótida) sobre todo en niños de 10 a 18 años tratados con enjuagues orales de clorhexidina. También se han descrito casos de irritación de la lengua.<sup>56</sup>

Se han descrito también lesiones descamativas en la mucosa alveolar después de enjuagues con clorhexidina al 0.2 %. La descamación de células epiteliales puede suceder con alta concentración más frecuentemente que con baja.<sup>3</sup> Uno de los métodos para reducir estos efectos colaterales, es la combinación de la clorhexidina con otro agente antimicrobiano de tal manera que la formulación sea equivalente y con mayor actividad antibacteriana.<sup>54</sup>

### 3.3 DEFINICIÓN Y TÉRMINOS BÁSICOS

- **Polifenoles:** son metabolitos reactivos presentes en los alimentos derivados de plantas, especialmente frutas, semillas y hojas; y se caracterizan por la presencia de varios grupos fenol, que se derivan a partir de L-fenilalanina. Son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta.
- **Flavonoides:** Los flavonoides constituyen la más grande y diversa familia de polifenoles. Más de 4.000 flavonoides han sido identificado en plantas y la lista está en constante crecimiento. La estructura común consta de dos anillos aromáticos unidos por 3 átomos de carbono, más a menudo formando un anillo heterocíclico.
- **Bacteriostático:** Sustancia que dificulta la reproducción bacteriana. Una sustancia bacteriostática no produce la muerte de las bacterias, pero al dificultar o impedir su reproducción la cepa bacteriana envejece y desaparece, sin dejar descendencia.
- **Bactericida:** Las sustancias bactericidas sí que causan la muerte a las bacterias. Provocan la lisis y muerte de microorganismos. Ej: Penicilinas, Cefalosporinas.
- **Esmalte dental:** es un material extracelular libre de células, por eso en rigor de la verdad no se le puede calificar como tejido. Esta capa esta mineralizada y su dureza es mayor que la del tejido óseo. Su elemento básico es el prisma adamantino constituido por cristales de hidroxiapatia.
- **Glucosiltransferasa (GTF):** grupo de enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias, encargadas de la síntesis de polisacáridos extracelulares que servirán como sitios de unión para la adherencia bacteriana. Su actividad puede ser modulada por condiciones ambientales tales como el pH, la concentración de iones, y el potencial de oxidación-reducción.

- **Catequinas:** compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los flavonoides y con alta actividad antioxidante, así como influencia en varios procesos bioquímicos y fisiológicos del ser humano. En las plantas representa un metabolito secundario.
- **Epicatequina:** es la principal catequina, que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles del grano de cacao. También se encuentra en las cáscaras y en hojas de otras plantas como el té.
- **Extracto etanólico:** Extracto obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, en proporción variable, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, obteniendo los principios activos requeridos.
- **Método de Folin –Ciocalteu:** método usado en la determinación de polifenoles, basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico.
- **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un pocillo embebido de una sustancia en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con microorganismos.

### 3.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES

#### 3.4.1 Hipótesis

##### Hipótesis general

Existe actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L., sobre el crecimiento *in vitro* de *S. mutans*; y sobre su adherencia al esmalte dentario.

#### 3.4.2 Variables

**Variable independiente:** extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. (cacao) variedad “chuncho”.

**Variables dependientes:**

- Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre el crecimiento *in vitro* de *S. mutans*.
- Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre la adherencia *in vitro* de *S. mutans* al esmalte dental.

**Variables de control**

- Control Positivo: clorhexidina 0.12%
- Control negativo: Agua destilada y etanol

### 3.5 Operacionalización de variables

Variables	Conceptualización	Indicadores	Escala	Categoría
<p><b>Variable independiente</b></p> <p>Extracto etanólico de <i>Theobroma cacao</i> L.</p>	<p>Soluciones del extracto etanólico a diferentes concentraciones, de semilla y de cáscara.</p>	<p>Concentración del extracto etanólico de semilla</p> <p>Concentración del extracto etanólico de cáscara</p>	<p>Cualitativa Nominal</p> <p>Cualitativa Nominal</p>	
<p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Inhibición del crecimiento in vitro de <i>S. mutans</i></p>	<p>Reducción en la proliferación de una bacteria en un medio de cultivo enriquecido y con agentes antimicrobianos</p>	<p>Diámetro del halo de inhibición</p>	<p>Cuantitativa Razón</p>	<p>mm</p>
<p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Adherencia in vitro del <i>S. mutans</i> a esmalte dental</p>	<p>Interrelación que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedador (esmalte dental), lo que permite la colonización bacteriana.</p>	<p>Unidades formadoras de colonias (UFC)</p>	<p>Cuantitativa Razón</p>	<p>UFC/ml</p>

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Tipo de investigación

La presente investigación se realizó con un diseño de **tipo experimental**, porque se evaluó el efecto de una de las variables sobre las otras y se manipulo las condiciones del estudio; de tipo **prospectivo**, porque los datos se analizaron al cabo de un tiempo; e **in vitro**, porque las técnicas para los ensayos microbiológicos se realizaron en un medio controlado fuera de un organismo vivo.

### 4.2 Población y muestra

#### **Población:**

Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

#### **Muestra**

Extracto etanólico de cáscara de cacao

Extracto etanólico de semilla de cacao

#### **Unidad de análisis**

Diámetro de halos de inhibición en placas de agar TSA expresados en milímetros.

Unidades formadoras de colonias adheridas de *Streptococcus mutans* a esmalte dental, expresado en UFC/ml.



## **4.3 Recursos y materiales**

### **4.3.1 Recursos humanos**

El investigador conseguirá las muestras de cáscara y semilla de cacao de la variedad “chuncho” del Cuzco, para la posterior obtención del extracto etanólico a utilizar, así como los trámites necesarios para el uso de las instalaciones de los diferentes departamentos donde se realizara cada una de las etapas del proyecto. En tanto la recolección de los datos, así como su análisis y tabulación, será realizada por el mismo. Se necesitará la colaboración del asesor respectivo.

### **4.3.2 Recursos materiales y equipos**

- 3kg de semilla de cacao variedad “chuncho” (fermentada y secada)
- 3kg de cáscara de cacao variedad “chuncho”
- Solución etanol (alcohol) 80%
- Agua destilada
- Suero fisiológico
- Clorhexidina 0.12%
- Campos descartables
- Papel filtro (filtrado rápido y semi)
- Gasas
- Recipientes estériles (para almacenamiento de piezas dentales)
- Solución de fomalina 2%
- Frascos de vidrio (para maceración del extracto etanólico)
- Discos diamantados y fresas para los cortes de esmalte dental

- Jeringas de tuberculina
- Placas de agar TSA
- Placas de agar Mitis Salivarius
- Caldos BHI + 10% sacarosa
- Sacabocado
- Agitador vortex
- Estufa a temperatura menor a 40°C para la obtención de extracto etanólico
- Balanza de precisión
- Micromotor
- Autoclave
- Mecheros de vidrio
- Estufa a 37°C para la incubación de cultivos

#### **4.3.3 Infraestructura**

- Se solicitó apoyo en la preparación del extracto etanólico de cacao, de cascara y de semilla, así como el análisis de polifenoles totales, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.
- Se solicitó el apoyo del Laboratorio de Patología de la Facultad de Estomatología de la UPCH, para la obtención de cortes de esmalte de las piezas dentarias.
- Se emplearon equipos y las instalaciones del laboratorio de Productos Naturales, en la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM, para la preparación del extracto etanólico en mayor cantidad.
- Se solicitó las instalaciones y equipos del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, para las pruebas microbiológicas a realizar en el estudio.

## **4.4 Procedimientos y técnicas**

### **4.4.1 Obtención del extracto etanólico de cacao**

Las muestras de cacao utilizadas son de la variedad “chuncho” del Cuzco, una de las variedades nativas del Perú. Las muestras de cacao fueron proporcionadas por la hacienda y albergue turístico EL MANGAL S.R.L ubicado en el distrito de Maranura, provincia de La Convención –Cuzco. Se obtuvieron semillas de cacao “chuncho” nativo orgánico debidamente fermentadas y secadas, y posteriormente tostadas; a las cuales se les retirará las cascarillas y se separaran de las semillas, hasta obtener 1kg de cáscara de cacao y 1kg de semilla de cacao pulverizado, el cual se realizó de manera manual, con mortero.

Ambas muestras, tanto de cáscara como de semilla, serán colocadas en 3 recipientes diferentes color ambar, con diferentes concentraciones de solución hidroalcohólica (50%, 80% y 96%). En total se obtendrán 6 envases (3 de cáscara y 3 de semilla), los cuales se dejaran macerar por 7 días. Luego de ello se filtran, con gasa estéril y luego con papel de filtrado rápido, hasta obtener los 6 precipitados diferentes que se llevaran a la estufa a temperatura menor a 40°C, hasta la total evaporación del solvente. Pasado ese tiempo se procederá a recolectar las muestras de extracto etanólico obtenidos de cáscara y de semilla a diferentes concentraciones de etanol 50%, 80% y 96%.

Luego de ello, las 6 muestras serán llevadas a análisis para la determinación de polifenoles totales, mediante reactivo de Folin –Ciocalteu, de tal manera que se determine cuál de los extractos obtenidos tiene mayor cantidad de componentes fenólicos para su posterior uso en los ensayos microbiológicos. Estos procedimientos se realizaron en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. (Ver tabla de Método de Folin –Ciocalteu en ANEXOS)

Una vez determinado el porcentaje de solvente que proporciona una mayor cantidad de polifenoles totales, en este caso el extracto al 80%) se repitió la extracción con mayor cantidad de muestra de semilla y cáscara pulverizada (3kg), para utilizar en los ensayos microbiológicos.

Las muestras de cáscara y semilla tostadas (3kg cada una) se colocaron en recipientes debidamente rotulados. Se agregó etanol al 80% en los frascos con las respectivas muestras ya pulverizadas. Se dejó en maceración por 8 días, con agitación diaria de 15min.

Luego de esos días, se procedió a filtrar cada uno de los macerados, primero a través de gasa estéril y luego a través de papel de filtro semirápido; obteniéndose 4 litros de solución filtrada para cada una de las dos muestras.

Posteriormente, se procedió a la eliminación del solvente, la cual se hizo con la utilización de Rotavapor BUCHI R3000, hasta obtener una solución de 300ml de extracto etanólico, para cada una de las muestras. Finalmente ambos extractos se colocan en la estufa a temperatura menor a 40°C por 5-6 días, para la eliminación de la mayor cantidad del solvente.

Al finalizar este periodo de tiempo, se obtienen 100g de extracto etanólico, para cada una de las muestras.

Estos procedimientos fueron trabajados en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

#### **4.4.2 Actividad antimicrobiana**

Para establecer la actividad del extracto etanólico de cáscara y de semilla de cacao sobre el **crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans***, se utilizó la técnica del cultivo en agar (agar TSA) por el método de difusión en pocillos, evaluando el efecto de los extractos obtenidos puros, así como un control negativo con etanol al 80%, y un control positivo de Clorhexidina 0.12%.

Para establecer la actividad del extracto etanólico de cáscara y de semilla de cacao sobre la **adherencia del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario**, se utilizaran cuerpos de prueba de esmalte dentario en contacto con el *Streptococcus mutans* en un medio de cultivo enriquecido (caldo BHI + 10% de sacarosa) y con los extractos obtenidos puros, así como un control sin extracto, y otro sin inóculo de bacteria.

#### **4.4.3 Evaluación del extracto etanólico de cacao sobre el crecimiento *in vitro* de *S. mutans***

Se trabajó con cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC25175, las cuales fueron mantenidas con un replicaje en agar TSA, hasta su utilización.

La estandarización de la cepa es según escala de Mc Farland 0.5, para lo cual se utilizó un inóculo de colonias de *Streptococcus mutans* en 2 ml de suero fisiológico hasta obtener la misma turbidez que el patrón de Mc Farland 0.5.

Bajo condiciones estériles se procederá a sembrar con un hisopo el inóculo bacteriano en 15 placas que contienen agar TSA, hasta obtener una distribución uniforme del inóculo.

Se procederá a realizar los pocillos en la superficie del agar TSA, con un sacabocado. En cada placa se colocaron 4 pocillos: P1 =extracto etanólico de semilla de cacao, P2 =extracto etanólico de cáscara de cacao, P3 =solución etanol 80% y P4 =clorhexidina 0.12%.

Se dejara reposar la placa por 20-30 minutos, y luego se colocara bajo condiciones de anaerobiosis no estricta, en una estufa a 37°C para su incubación por 48h, para luego hacer las lecturas de los halos de inhibición.

Se procederá a la lectura de las placas de cultivo: de orden cualitativo, en referencia a la aparición de halos de inhibición alrededor de los pocillos, y en orden cuantitativo en relación a las medidas de diámetros de los halos de inhibición, con la ayuda del pie de rey o calibrador. Los datos se procesaron mediante estadística descriptiva.

#### **4.4.4 Obtención de cuerpos de prueba de esmalte dentario**

Se recolectaran 30 terceros molares humanos recién extraídos en la práctica particular, los cuales se tendrán almacenados en suero fisiológico y posteriormente en solución de formalina al 2% hasta su utilización. Las coronas recibirán secciones seriadas usando discos diamantados para corte de tejido duro. Estos procedimientos se realizaron de la mano del Departamento de Patología de la Facultad de Estomatología de la UPCH. Se obtendrán 40 cuerpos de prueba de esmalte dentario, de 5mm de espesor, a partir de las caras libres de las coronas de las molares. Para estandarizar el tamaño de la superficie, los cuerpos de prueba serán pintados con esmalte de uñas dejando solo el área de las caras libres, de acuerdo a la metodología descrita por Carretto y col. Luego de eso, se les colocara un soporte echo con alambre de ligadura 0.10 y serán llevados a esterilizar en autoclave (121 °C/20 minutos).

Se dividirá estos 40 cuerpos de prueba en 4 grupos (n=10): G1 =sometido a extracto etanólico de semilla de cacao, G2 =sometido a extracto etanólico de cáscara de cacao, G3 =control positivo (sin ningún extracto), G4 = control negativo (sin inculo de bacteria).

#### **4.4.5 Evaluación de la actividad del extracto etanólico de cacao sobre la adherencia *in vitro* del *S. mutans* a esmalte dentario**

Fueron utilizados muestras de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, reactivada en caldo cerebro corazón, (BHI), en microaerofilia a 37 °C, siendo repicada cada 48 horas.

#### ❖ Evaluación de la inhibición de la adherencia de *S. mutans*

El test de adherencia se realizó utilizando microplacas de cultivo de 24 pozos (Placa de ELISA). En cada pozo se colocó: 2ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) enriquecido con 10% de sacarosa, combinado con el respectivo extracto: G1 =sometido a extracto etanólico de semilla de cacao, G2 =sometido a extracto etanólico de cáscara de cacao, G3 =control positivo (solo 2ml de caldo BHI + 10% sacarosa), G4 = control negativo (solo 2ml de caldo BHI + 10% sacarosa). Además en cada pozo se colocó 0.1ml de suspensión de *S. mutans* y el cuerpo de prueba de manera vertical sobre su soporte de alambre de ligadura. En el G4 al ser control negativo, no se coloca suspensión de *S. mutans*. Se repitió esta distribución en 10 pozos, para cada uno de los 4 grupos.

Las microplacas fueron tapadas e incubadas a 37°C por 48 horas, en microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>)

Luego de esto, los cuerpos de prueba fueron retirados de los pozos y colocados en tubos de ensayo con 1ml de solución fisiológica. Luego los tubos fueron llevados a agitación en Vórtex por 3 minutos, para provocar el desprendimiento de las bacterias adheridas a la superficie del esmalte. Las bacterias desprendidas fueron diluidas en 1/10 en suero fisiológico, para ello se tomó una muestra de 0.1ml de cada uno de los tubos agitados y se colocó en unos nuevos tubos conteniendo 0.9ml de suero fisiológico (dilución 1/10). Luego se tomó una muestra de 0.1ml y se colocó en placas con agar Mitis Salivarius. Las placas fueron llevadas a incubación a 37°C por 48 horas en microaerofilia.

Al cabo de este tiempo, se determinó el número de unidades formadoras de colonia que crecieron en cada una de las placas, y finalmente se calcula mediante factor de conversión la UFC/ml, para cada muestra.

#### **4.4.6 Procesamientos de datos**

Los valores del efecto sobre el crecimiento fueron cuantificados mediante la medición de los halos de inhibición, que se registraron en una ficha elaborada previamente para este estudio (ANEXO 1). En esta tabla se colocaron la presencia o ausencia de inhibición en cada una de las placas, así como la medida del diámetro de los halos de inhibición. (ANEXO 2). Para el caso del test de adherencia también se usó una ficha para recolectar la información del conteo de UFC por placa en cada uno de los grupos; estas UFC fueron convertidas a UFC/ml, para su posterior análisis estadístico. (ANEXO 3).

#### **4.4.7 Análisis de los resultados**

Los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición del crecimiento; mediante la medición de los halos de inhibición en los diferentes grupos; fueron evaluados mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y el Test post –hoc de Bonferroni, para el análisis estadístico por pares; a fin de evaluar las diferencias estadísticas que puedan existir en relación al promedio del diámetro de inhibición.

En cuanto al efecto sobre la adherencia, se realizó el análisis del conteo de UFC/ml en cada uno de los grupos, se utilizaron métodos no paramétricos, en este caso la prueba de Kruskal –Wallis.



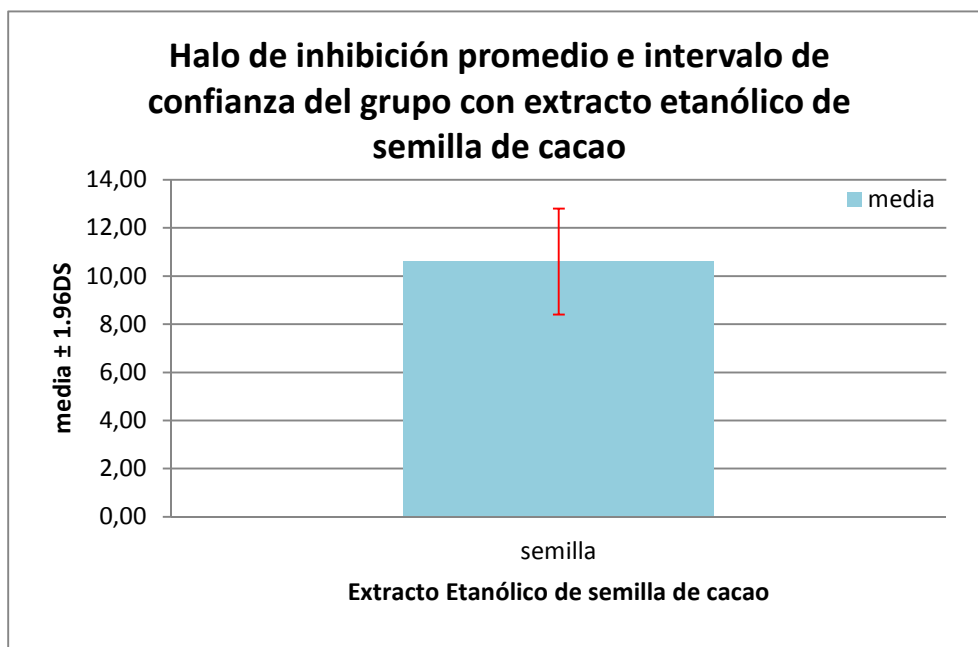
## V. RESULTADOS

Para la determinación de la actividad inhibitoria de los extractos de *Theobroma cacao* L. sobre el **crecimiento** *in vitro* de *Streptococcus mutans*, se procedió a la lectura de halos de inhibición expresados en milímetros.

En el primer grupo (n=15) el extracto etanólico de semilla de cacao, obtuvo una media de 10.6mm, con valores mínimo de 9mm, hasta 12mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición. (Cuadro 7)

**CUADRO 7. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de semilla de cacao sobre el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans*.**

Media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
10.60	1.12	11	10	12	9	12

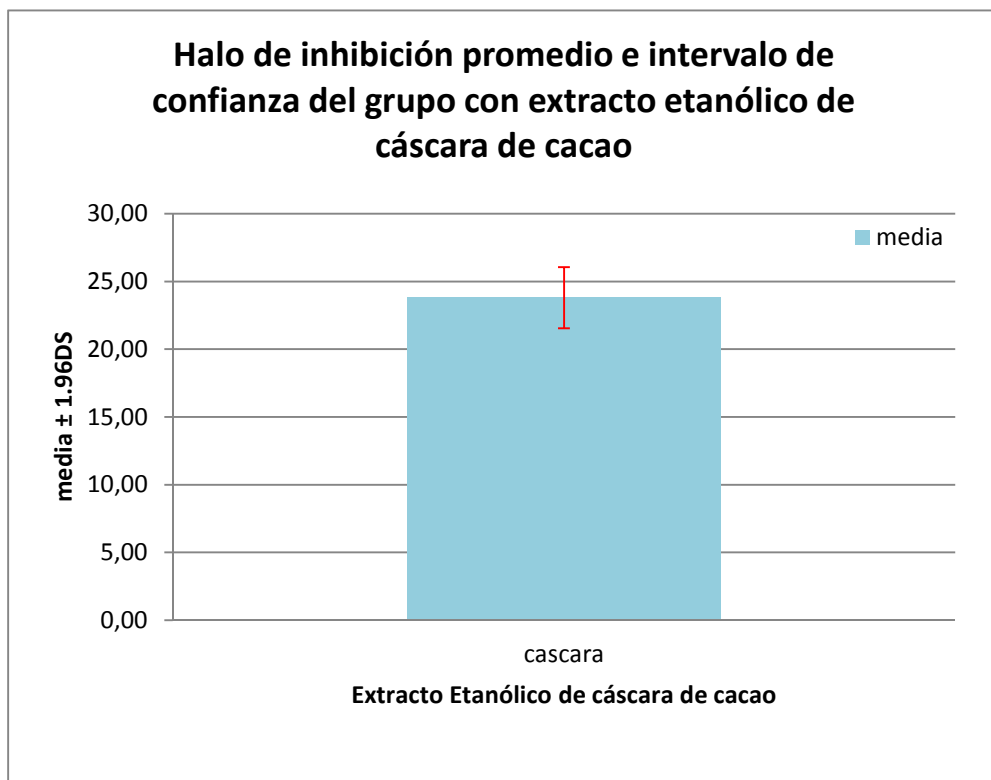


**GRAFICO 1. Media del halo de inhibición del grupo con extracto de semilla de cacao (en mm)**

En el segundo grupo (n=15) donde se sometió a prueba el extracto etanólico de cáscara de cacao, se obtuvo una media de 23.8mm, con valores mínimo de 22mm, hasta 26mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición. (Cuadro 8)

**CUADRO 8. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de cáscara de cacao sobre el crecimiento in vitro del *Streptococcus mutans*.**

Media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
23.80	1.15	24	23	25	22	26



**GRAFICO 2. Media del halo de inhibición del grupo con extracto de cáscara (en mm).**

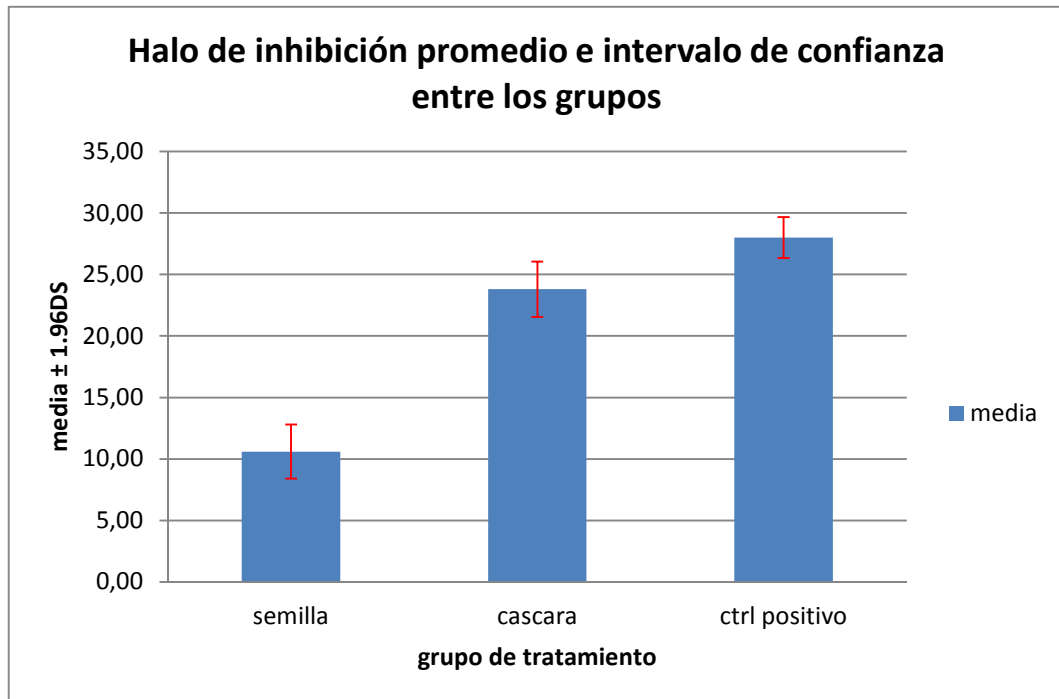
Al comparar la actividad inhibitoria de los extractos de semilla y cáscara, frente al control positivo de clorhexidina 0.12%, en base a los diámetros de halo de inhibición; se observa una menor media (10.6mm) de halo de inhibición del extracto de semilla de cacao, frente a un mayor promedio (23.8mm) correspondiente a los halos de inhibición producidos por el extracto de cáscara de cacao.

Con respecto al grupo control positivo clorhexidina 0.12% presentó una media de 28mm, el mayor valor de los grupos evaluados. (Cuadro 9)

El control negativo (etanol 80%) no registro presencia de halos de inhibición.

**CUADRO 9. Comparación de la actividad inhibitoria de semilla y de cáscara de cacao frente a un grupo control (clorhexidina 0.12%); mediante la medición de halos de inhibición de los grupos.**

Grupo	N°	media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
<b>Semilla</b>	15	10.60	1.12	11	10	12	9	12
<b>Cáscara</b>	15	23.80	1.15	24	23	25	22	26
<b>Control positivo</b>	15	28.00	0.85	28	27	28	27	30



**GRAFICO 3. Comparación de la media de los grupos experimentales y el control positivo**

Se evaluó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas entre los datos obtenidos, al cumplir con estos supuestos se decidió utilizar la técnica de **ANOVA** que nos permite comparar más de dos grupos obteniendo un estadístico **F = 1129.07**, y un valor de **P = 0.0000**, por lo que podemos concluir que existe diferencias altamente significativas entre los grupos.

Para comparar entre quienes hay diferencias significativas, se utilizó la prueba post-hoc de Bonferroni (para muestras pequeñas) obteniendo los siguientes resultados:

**CUADRO 10. Valor P luego del test post –hoc de Bonferroni para los pares de grupos.**

Grupos	Diferencia de medias	P
Extracto de semilla y extracto de cáscara	13.20	0.000
Extracto de semilla y control positivo	17.40	0.000
Extracto de extracto de cáscara y control positivo	4.20	0.000

Se encontró diferencias altamente significativas entre todos los pares de grupos ( $P < 0.001$ )

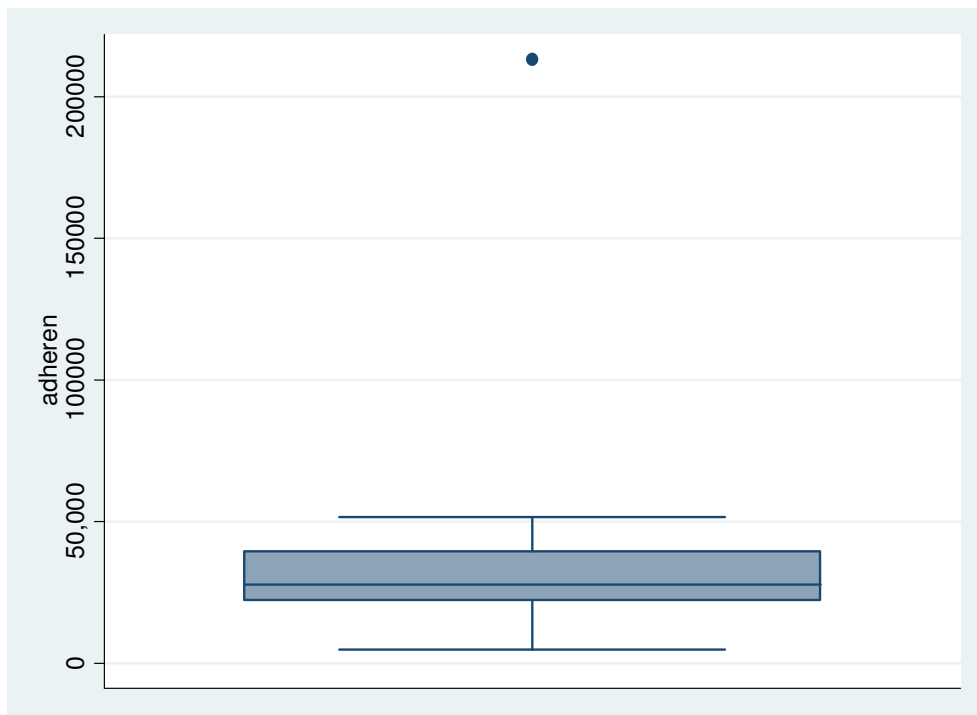
Para la determinación de la actividad inhibitoria de los extractos de *Theobroma cacao* L. sobre la **adherencia** *in vitro* del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario, se tomó en cuenta el recuento de unidades formadoras de colonias, expresados en UFC/ml para cada uno de los grupos evaluados.

En el primer grupo (n=10) sometido a extracto etanólico de semilla, se registró un valor de la media de 46 340 UFC/ml, y una mediana de 27 700 UFC/ml.

Los valores registrados tras la lectura de colonias, se encontraban entre 4 700 UFC/ml como valor mínimo, y un pico de 213 200 UFC/ml como valor máximo. (Cuadro 11)

**CUADRO 11. Adherencia *in vitro* sobre esmalte dental mediante recuento de UFC/ml, después del uso de extracto etanólico de semilla de cacao.**

n	media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
10	46340	59997.2	27700	22400	39400	4700	213200



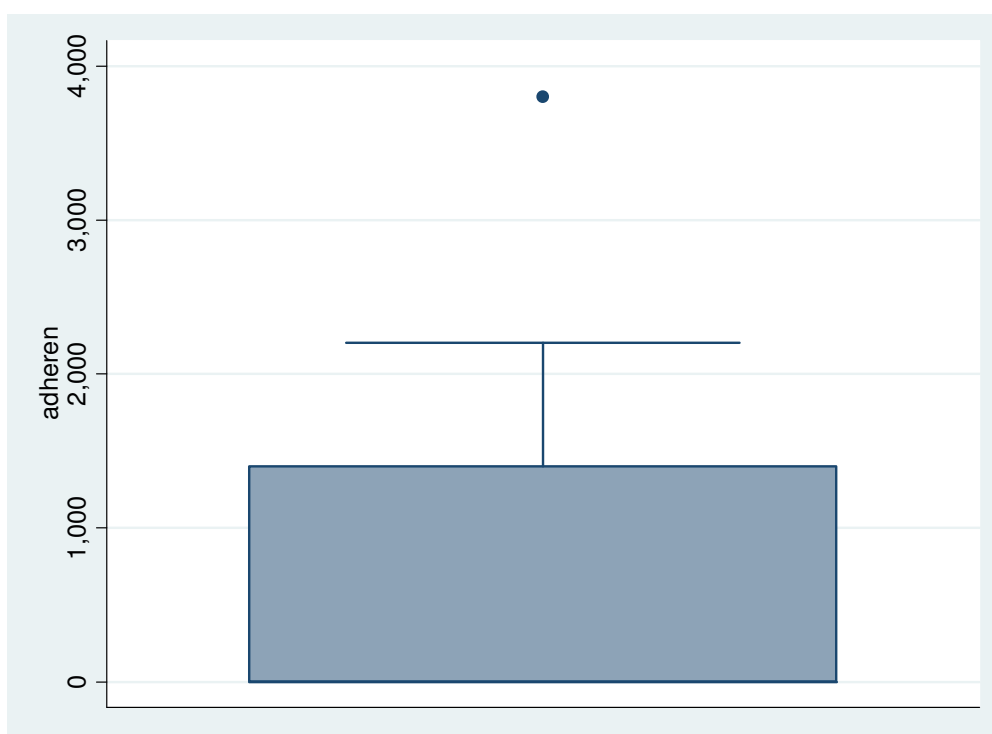
**GRÁFICO 4. Recuento de UFC/ml del grupo sometido a extracto etanólico de semilla de cacao. (Grupo A)**

En el segundo grupo (n=10) sometido a extracto etanólico de cáscara, se registró un valor de la media de 740 UFC/ml, y una mediana de 0 UFC/ml.

Los valores registrados tras la lectura de colonias, se encontraban entre 0 como valor mínimo, y 3 800 UFC/ml como valor máximo. (Cuadro 12)

**CUADRO 12. Adherencia *in vitro* sobre esmalte dental mediante recuento de UFC/ml, después del uso de extracto etanólico de cáscara de cacao.**

N°	media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
10	740	1323.46	0	0	1400	0	3800



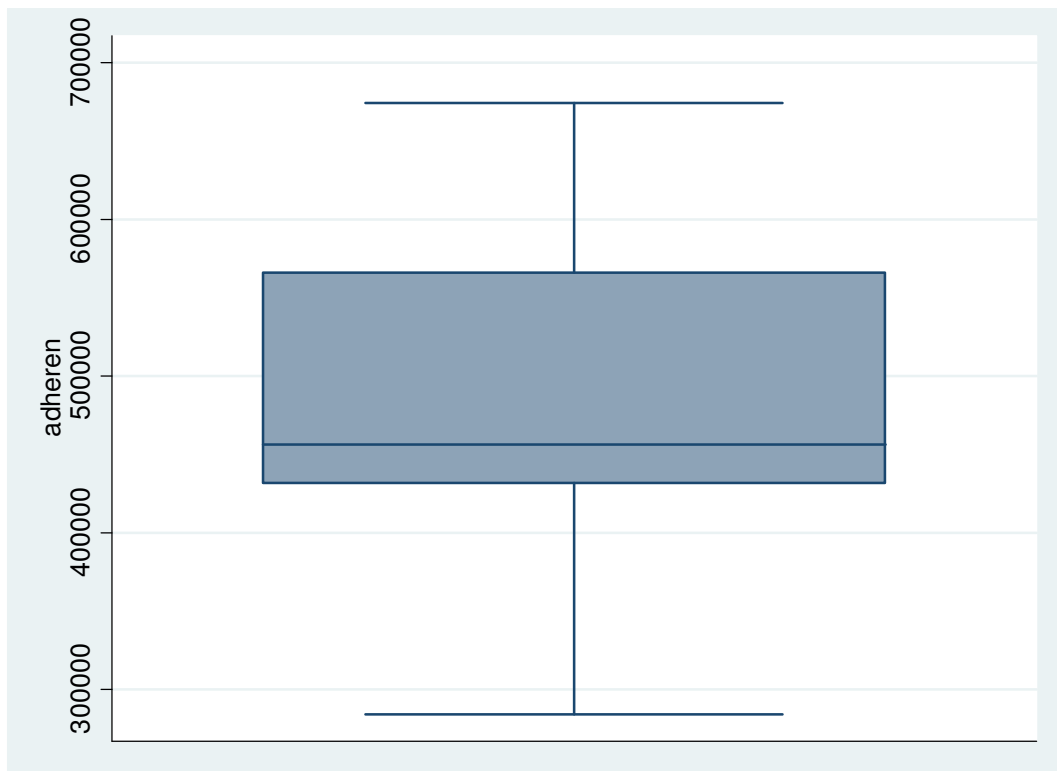
**GRÁFICO 5. Recuento de UFC/ml del grupo sometido a extracto etanólico de cáscara de cacao (Grupo B)**

En el grupo control positivo (n=10) los cuerpos de prueba no fueron sometidos a ningún extracto, para cuantificar la adherencia que se produce sobre los cuerpos de esmalte dentario. Se registró un valor de la media de 483 920 UFC/ml, y una mediana de 456 500 UFC/ml.

Los valores registrados tras la lectura de colonias, se encontraban entre 284 400 UFC/ml como valor mínimo, y 674 400 UFC/ml como valor máximo. (Cuadro 13)

**CUADRO 13. Adherencia *in vitro* sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, en un grupo control (sin extracto).**

N°	media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
10	483920	118880	456500	432000	566000	284400	674400



**GRAFICO 6. Recuento de UFC/ml del grupo control positivo (Grupo C)**

Se realizó la comparación del grupo expuesto a semilla de cacao (A), del grupo expuesto a cáscara de cacao (B) y del grupo control que no fue expuesto a ningún extracto (C).



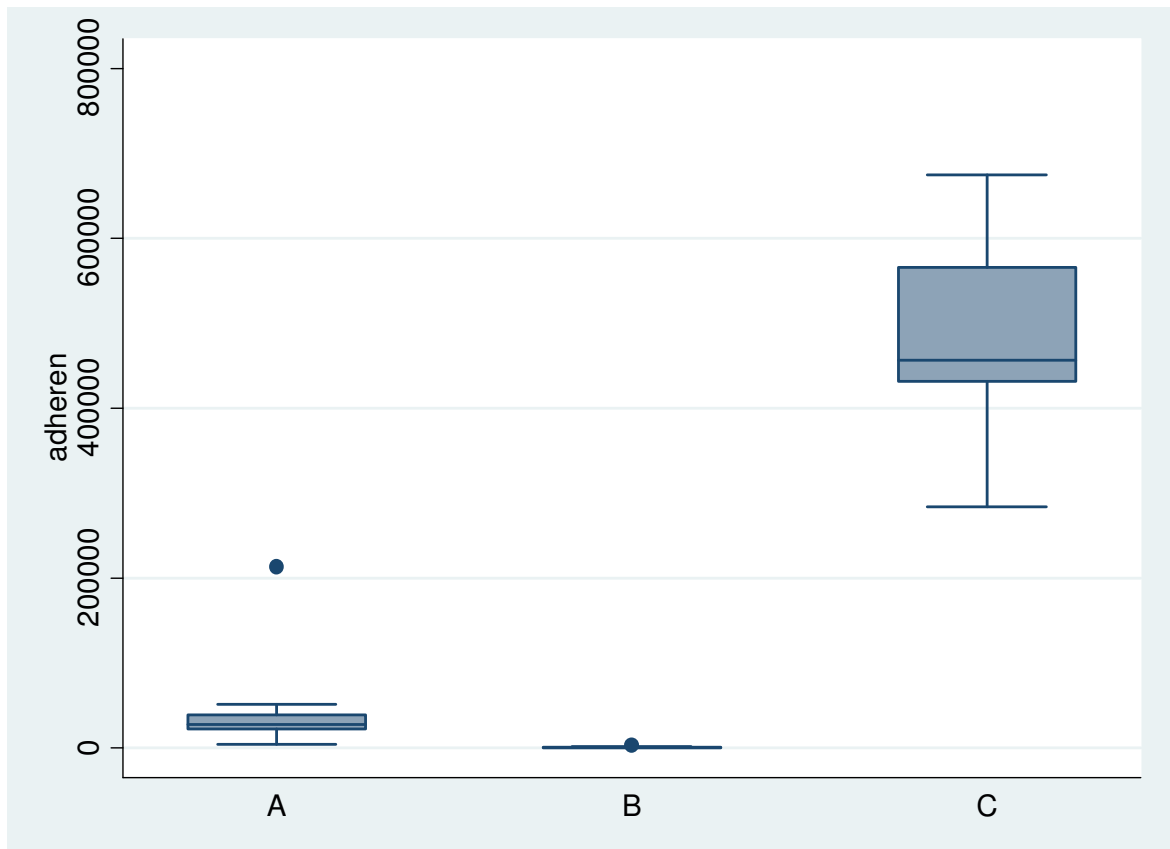
El grupo control negativo (D) que no fue expuesto ni a extractos ni a la suspensión de bacterias, no registró niveles de adherencia.

Se observa una mayor efectividad antiadherencia en el grupo B, donde se reduce la cantidad de UFC/ml hasta una media de 740 UFC/ml siendo el menor valor promedio; mientras que el grupo A registra una media de 46 340 UFC/ml. Ambos grupos experimentales (A y B) presentaron valores de media menores, con respecto al grupo C en donde se registró un valor medio de 483 920 UFC/ml, el mayor de los tres grupos. (Cuadro 14)

**CUADRO. 14 Comparación de la adherencia *in vitro* sobre esmalte dentario mediante recuento de UFC/ml, en los grupos de extracto etanólico de semilla (A), cáscara (B) y grupo control (C)**

grupo	N°	media	D.S.	Mediana	P25	P75	Mínimo	Máximo
<b>A</b>	10	46340	59997.2	27700	22400	39400	4700	213200
<b>B</b>	10	740	1323.46	0	0	1400	0	3800
<b>C</b>	10	483920	118880	456500	432000	566000	284400	674400

Se observa la efectividad de los extractos etanólicos de semilla y cáscara de *Theobroma cacao L.* inhibiendo la adherencia al esmalte dental, en función al conteo de UFC/ml para cada uno de los grupos, los cuales son menores en estos grupos (Grafico 7)



**GRAFICO 7. Recuento de UFC/ml entre los grupos A, B y C**

En vista que los datos registrados tienen una dispersión muy alta, se decidió utilizar métodos no paramétricos para su evaluación estadística, como la prueba de Kruskal – Wallis.

**Cuadro 15. Valor P luego de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis**

grupo	N°	Mediana	P25	P75	Rango suma	P
A	10	27700	22400	39400	155.00	0.0001
B	10	0	0	1400	55.00	
C	10	456500	432000	566000	255.00	

Prueba de Kruskal Wallis ( $X^2$ ) = 26.132, P = 0.0001

Por lo tanto, si existe diferencias altamente significativas entre los tres grupos ( $P < 0.001$ ).

Para el análisis estadístico de los datos se realizó lo siguiente:

1. Análisis descriptivo de los datos a través de media, desviación estándar, mediana, percentil 25(P25), percentil 75 (P75), mínimo, máximo, en el caso del halo de inhibición se consideró la media y desviación estándar y para la adherencia luego del tratamiento, al existir mucha dispersión en los datos se consideró la mediana, P25 y P75.
2. Se elaboraron las gráficas correspondientes, la de barras e intervalos de confianza para el halo de inhibición y gráfica de caja y bigote (boxplot) para adherencia luego del tratamiento.
3. Para comparar entre los grupos respecto al efecto sobre el halo de inhibición se utilizó la técnica del análisis de varianza (ANOVA) que nos arroja el estadístico  $F = 1129.07$  con el valor de significancia estadística  $P = 0.0000$ . Al encontrar diferencias significativas se utilizó la prueba post-hoc de Bonferroni para el análisis por pares, por tratarse de muestras pequeñas ( $n < 30$ ).
4. Para comparar entre los grupos con respecto al efecto sobre la adherencia luego del tratamiento se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis que nos arroja el estadístico  $X^2 = 26.132$  con el valor de significancia estadística  $P = 0.0001$ .

El nivel de significancia que se utilizó para todas las comparaciones fue de 0.05.

Se utilizó el Office Excel 2013 para el procesamiento, tablas y gráficas y el programa de Stata v12 para el análisis estadístico

## VI. DISCUSIÓN

La caries dental sigue siendo la enfermedad bucal más prevalente en la actualidad, por lo que es importante la búsqueda de nuevas estrategias para prevenirla, más aun desde etapas tempranas.

Diversos compuestos son empleados para el control de la caries dental, utilizando criterios como: actividad antimicrobial, actividad anti-glucosiltransferasa, inhibición enzimática y reemplazo de sacarosa por otros edulcorantes.<sup>1</sup>

En este contexto se decidió evaluar la efectividad del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.* al ser este fruto una fuente rica en polifenoles, y uno de los productos más producidos y consumidos dentro del mercado de materias primas. Además en vista de recientes investigación que colocan al cacao peruano como uno de los más importantes, no solo por su calidad organoléptica sino también por el impacto favorable en la economía del país, se decidió utilizar este producto para determinar su efectividad frente al *Streptococcus mutans*, microorganismo catalogado en la iniciación de la principal enfermedad bucal, la caries dental.

El posible efecto protector del cacao en la caries dental ha venido recibiendo cada vez más atención, sin embargo estudios relacionados en nuestro país son escasos, teniendo en cuenta lo importante que está siendo este fruto.

MARIANI, M. Y COL. (2010), determinó el efecto bacteriostático del extracto de semillas de *Theobroma cacao l.*, sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Evaluó la presencia de inhibición y el tamaño del halo formado alrededor de las discos con extractos acuosos entre 0% y 17,5% de concentración, concluyendo que el extracto de semillas de Cacao inhibe significativamente el crecimiento y desarrollo del *Streptococcus mutans*.<sup>1</sup>

Sin embargo, otro estudio indicó que una dieta alta en sacarosa era igualmente cariogénico en presencia o ausencia de polvo de grano de cacao (FERRAZZANO GF.

Y COL, 2009), mientras que la incorporación de polvo de cacao o chocolate en la dieta de hámster se informó a reducir la caries.<sup>48</sup>

Posteriormente se sugirió la posibilidad de que compuestos fenólicos podrían ser responsables de los efectos anticaries observados para el cacao en polvo. Además se mostró que un extracto soluble en agua de cacao en polvo reduce significativamente las puntuaciones de caries en ratas infectadas con *S. sobrinus*. Según los autores, el efecto observado podría ser debido a la acción inhibidora de extracto de agua de cacao en la síntesis de glucanos insolubles en agua (ITO K. y col, 2003)<sup>6</sup>

ROSAS, M. 2009, encontró efecto inhibitorio *in vitro* de 04 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*; siendo la generación de halos de inhibición de gran longitud para la manteca de cacao. Se concluyó que los 04 derivados comerciales de cacao presentan efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*.<sup>17</sup>

Otro estudio ha demostrado que los polifenoles del cacao inhibieron el crecimiento de *S. sanguinis*, pero el de *S. mutans* no se vio afectado (PERCIVAL, RS. Y COL, 2009) pese a ello, el pentámero de polifenoles de cacao (500 lm) redujo significativamente el pH terminal, e inhibió la tasa de producción de ácido por *S. mutans* a pH 7,0.<sup>7</sup>

Si bien es cierto existen reportes de la acción antibacteriana de este fruto sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, existe también evidencia de sus efectos sobre la adherencia. La adherencia bacteriana a la superficie del diente es de gran importancia para el desarrollo de lesiones de caries, y la interferencia con algunos de los mecanismos de adhesión pueden evitar la formación de lesiones de caries.<sup>49</sup>

SMULLEN, J y col. (2007) en su estudio informó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cacao sin fermentar fue de 4mg/ml, y del cacao fermentado

8mg/ml, al igual que del licor de cacao, utilizando extracto en base a propanona acuosa disponible en el mercado; se observaron efectos bacteriostáticos y además redujeron la producción de ácido cuando se añaden las concentraciones mínimas inhibitorias a cultivos de *S. mutans* cultivadas en un medio enriquecido con glucosa o sacarosa. Los extractos también redujeron la adhesión de *S. mutans* al vidrio, lo que demuestra que estos extractos pueden tener un papel interfiriendo la adherencia bacteriana a superficies, lo que está de acuerdo con los resultados observados en el presente estudio. <sup>25</sup>

Se ha encontrado que los productos de cacao contienen inhibidores de la enzima glucosiltransferasa, responsable para la formación de los polisacáridos extracelulares encargados de la adhesión bacteriana a la superficie dental. Fue así como OSAWA, K. y col. (2001) aislaron sustancias cariostáticas en la cáscara de grano de cacao: algunas de actividad anti-GTF y otras actividad antibacterial. Realizó un estudio por cromatografía de alto peso molecular, que reveló compuestos polifenólicos y ácidos grasos insaturados como componentes activos, a partir de un extracto etanólico al 50% de cáscara del grano de cacao.

Los efectos anti-cariogénicos contra estreptococos alfa hemolítico mostrados por los polifenoles de cacao, café y té en un estudio realizado por FERRAZZANO y col. 2009 también sugieren más estudios para una posible aplicación de estas bebidas en la prevención de la patogenia de la caries dental. <sup>48</sup>

Recientemente SRIKANTH, R.K y col. 2008, en su estudio ha informado que la cáscara de granos de cacao, que es un subproducto de la fabricación de chocolate, se utilizó para preparar un enjuague bucal para niños. El uso regular de este enjuague ha dado una reducción de 20.9% del recuento de estreptococos mutans, y fue aún más eficaz en la disminución de puntuaciones de la placa <sup>58</sup>

Como vemos, el *Theobroma cacao L.*, presenta compuestos fenólicos con importante acción sobre la caries dental, no solo en su semilla sino también en la cáscara, y con resultados más prometedores.

Se realizó previamente a los extractos de semilla y cáscara empleados en este estudio, un análisis para cuantificación de polifenoles totales con el método de Folin – Ciocalteu, el cual arrojó un valor mayor para el extracto etanólico de cáscara (**20,15 ± 0,46**) que el de semilla (**18,70 ± 0,16**). Estos resultados respaldan la teoría de que estos compuestos son los que tienen los efectos antibacterianos y antiadherentes que se registraron en este estudio.

Pese a sus notables resultados, estos compuestos pueden verse afectados por los procesos de pre industrialización, tal como lo reportan SUAZO, Y. (2012) y GIL, J (2012), mencionando que se observa una pérdida considerable de polifenoles luego de estos procesos. Teniendo en cuenta estos detalles, se podría realizar estudios con los productos antes de ser sometidos a estos procesos, a fin de conservar sus principios activos.

Estas propiedades antibacterianas y antiadherentes del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.*, por tanto son atribuidas a los polifenoles que están en su composición, entre ellos principalmente las catequinas y epicatequinas; las cuales aparentemente son mayores en la cáscara de cacao que en la semilla. Esto se ve evidenciado en nuestro estudio, puesto que el extracto etanólico de cáscara de *Theobroma cacao L.* presentó mayor efectividad inhibiendo el crecimiento y la adherencia del *Streptococcus mutans* al esmalte dental.

Serian importantes nuevos estudios que evalúen la efectividad de los componentes del cacao en etapas previas a su industrialización a fin de evitar la reducción en sus

principios activos y los beneficios que estos presentan; así como estudios iniciales en animales de experimentación y posteriormente en humanos, utilizando los principios activos de la cáscara de cacao, haciendo extracciones más específicas de los compuestos que tienen actividad sobre el *Streptococcus mutans* como las catequinas y epicatequinas, en presentaciones tales como gel o colutorios. De esta manera se contribuiría a reducir la incidencia de caries dental previniendo desde etapas tempranas.



## VII. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Theobroma cacao L*; presenta actividad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*.
- El extracto etanólico de cáscara de cacao, presentó mayor efectividad en la inhibición del crecimiento, que el extracto etanólico de semilla de cacao, siendo estadísticamente significativa sus diferencias.
- El extracto etanólico de *Theobroma cacao L*; presenta actividad inhibitoria sobre la adherencia del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario *in vitro*.
- El extracto etanólico de cáscara de cacao, reduce significativamente la adherencia del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario *in vitro*, en comparación con el extracto etanólico de semilla de cacao y con el control.
- El extracto etanólico de cáscara de *Theobroma cacao L*, presentó mayor efectividad en la inhibición de crecimiento y en la inhibición de la adherencia.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.*
- Realizar investigaciones con soluciones de extracto etanólico a partir de cáscara de *Theobroma cacao L.* en diferentes concentraciones.
- Realizar estudios inicialmente en animales de experimentación con el extracto etanólico de *Theobroma cacao L.* y posteriormente en humanos con alta prevalencia de caries dental a fin de verificar si existe actividad en la reducción del crecimiento y adherencia bacteriana.
- Ampliar la investigación hacia formulaciones de gel y/o colutorios dentales a partir el extracto etanólico de cáscara de *Theobroma cacao L.* y promover la extracción de sus principales compuestos activos en forma más específica.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Mariani M, Jaimes G, Fernandez –da Silva R. Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* in vitro. ODOUS científica. 2010 Ene; 11 (1): 15-22.
2. Carretto C, Navas E, Paradella T, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. Rev Odontol UNESP. 2007; 36(3):281 286.
3. San Román Suarez I. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal. (Tesis para optar el título de cirujano dentista) Lima: FO –UNMSM. 2013.
4. Landucci LF, Oliveira LD, Brandão EH, Koga-Ito CY, Gaett-Jardim JE, Jorge AOC. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. Cienc Odontol Bras. 2003; 6: 58 -62.
5. Lolayekar N, Shanbhag Ch. Polyphenols and oral health. RSBO. 2012 Jan-Mar; 9(1):74-84
6. Ito K, Nakamura Y, Tokunaga T., Iijima D., Fukushima K. Anti –cariogenic properties of water –soluble extract from cacao. Biosci. Biotechnol Biochem. 2003; 67 (12): 2567 -2573

7. Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *European Journals of Oral Diseases*. 2006; 114: 343 -348
8. Kyoung-Heon K, Ki L, Dong K, Hyung P, Ik K, Hyong L. Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Process Biochemistry*. 2004; 39(12):2043-6.
9. Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res*. 2001; 80(11):2000-2004. Disponible en <http://jdr.sagepub.com/content/80/11/2000>
10. Cassanho ACA, Oliveira LD, Brandão EHS, Landucci LF, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Efeitos de diferentes soluções de café sobre a aderência de *Streptococcus mutans* às superfícies de esmalte e dentina [resumo Ib051] *Pesqui Odontol Bras*. 2005; 19 (Supplement): 73.
11. Moromi H, Martinez E. Efecto del té verde en la formación de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. *Rev Científica Odontología Sanmarquina*. 2006; 9 (2)
12. Romero M, Hernandez Y, Gil M. Actividad inhibitoria de la *Matricaria recutita* “manzanilla alemana” sobre el *Streptococcus mutans*. *Rev Lat de Ortodoncia y Odontopediatría*. 2009 MAR; 9 (1): 1-13 Disponible en <http://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp>

13. Cosco Robles D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla. (Tesis para optar el título de cirujano dentista) Lima: FO –UNMSM; 2010.
14. Suazo Mercado Y. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense. (Memoria de investigación: trabajo de fin de máster) Pamplona: Universidad Pública de Navarra, 2012.
15. Gil Quintero, J. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. (Trabajo de grado para optar el título de magíster en ciencias farmacéuticas). Medellín: Universidad de Antioquia, 2012.
16. García Nava, M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad autónoma de Querétaro. 2007. (Citado el 7 de octubre de 2014). Disponible en [http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf)
17. Rosas Urbina, M. Efecto in vitro de 04 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans*. (Tesis para optar el grado de bachiller en estomatología) Trujillo. Facultad de medicina. EAP Estomatologia. UNT. 2009.
18. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in –vitro and animal experiments. Archives of oral biology. 2000. 45: 639 -645.

19. Ruiz J., Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor –oriente peruano. *Ciencia e Investigación* 2009; 12(1): 41-47
20. Doroteo VH, Diaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. *Rev Soc Quím Perú.* 79 (1) 2013.
21. Cuéllar G O., Guerrero AG. Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao *Theobroma cacao L.* *Rev. MVZ Córdoba* 2012; 17(3):3176-3183.
22. Nasution AI, Zawil C. The comparison of enamel hardness between fluoride and theobromine application. *Int J Contemp Dent Med Rev* 2014; p:1-4.
23. Kargul B, Özcan M, Peker S, Nakamoto T, Simmons W. Evaluation of human enamel surfaces treated with Theobromine: A Pilot Study. *Oral Health Prev Dent* 2012; 10: 275-282.
24. Padilla F. C, Rincon A. M, Bou –Rached L. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archiv Latinoamericanos de Nutrición.* 2008. 58 (3): 303 -308.
25. J. Smullen, G.A. Koutsou, H.A. Foster, A. Zumbé, D.M. Storey. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Research* 2007;41:342–349.
26. Barrancos MJ, Rodriguez AG. Cariología. En: Barrancos MJ. *Operatoria dental: Integración clínica.* 4ta Edición. Buenos Aires. Médica Panamericana, 2006. p. 297 -339.

27. Campaña Otero, S. Estudio comparativo de la colonización de *Streptococo mutans* en niños de 8 años de edad portadores y no portadores de aparatología ortopédica removible de la Unidad Educativa Municipal Experimental “Antonio José de Sucre” del cantón Quito período escolar 2011/2012. (Tesis para la obtención del título de odontóloga). Quito: FO –Universidad Central del Ecuador. 2012.
28. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a ed. en español. Madrid. Ed. Iberoamericana-Mc.Graw-Hill. 2002.
29. Moromi NH y col. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. FO –UNMSM. 2008.
30. Urzúa AI, Moncada GA. Salud y estética dental, mediante la terapia no restauradora y minimamente invasiva de la caries. En: Henostroza H G. Estética en odontología restauradora. 1era edición. Madrid. Ripano S. A. 2006. p. 166 - 182.
31. Henostroza H G. Caries dental: principios y procedimientos para su diagnóstico. 1° ed. Lima. UPCH. Ripano. 2007.
32. Chávez Alvarado, E. Adherencia del *Streptococcus mutans* después del uso de la IgY extraído de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas. (Tesis para obtener el título de cirujano dentista). Lima: FO –UNMSM. 2009.
33. Bowen. WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* –Derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Research 2011;45:69–86

34. Battagin J. Cinética enzimática e efeito de extratos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* [Tesis]. Bragança paulista, Brasil: Universidade são Francisco.2010.
35. Chia Wong J. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao L.*) de la UNAS –Tingo María. (Tesis para optar el grado de académico de magíster en Biología molecular) Lima: UNMSM. 2009.
36. Cala, M., A. Vásquez, A. García, J. R. Martínez, E. Stashenko: Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2011. (136): 371-379.
37. Arteaga, William (Promperu) y panelistas. El mercado mundial del cacao, tendencias y oportunidades para américa latina. El Perú como país de origen. En: V Salón del Cacao y Chocolate. Parque de la reserva, Lima. 2014, del 4 -6 julio.
38. Arranz Martinez, S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. (Memoria para optar el grado de doctor). Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2010.
39. Proyecto UE –PERÚ/ PENX, MINCETUR, APPCACAO. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. (Informe final) Lima. 2008.



40. Aponte Martinez, A. Desarrollo del cacao en Perú. Dirección general de competitividad agraria –Ministerio de agricultura. Managua 2013.
41. Perú. Ministerio de Agricultura. Gobierno Regional del Cusco. Municipalidad Distrital de Echarate. Sistematización del concurso del superárbol de cacao chuncho del cusco. 2009.
42. Portal del Ministerio de agricultura y riego. [Página principal en Internet] MINAG declara patrimonio natural de la nación al cacao peruano. (Nota de prensa) Lima, abril 2012. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/index.php/notas-de-prensa/notas-de-prensa-2012/6836-minag-declara-patrimonio-natural-de-la-nacion-al-cacao-peruano>. Acceso el 23 enero 2015.
43. Ministerio de Agricultura. Plan estratégico. Cadena agroproductiva de cacao. Abril, 2007
44. Benito J, Arevalo E, Garcia L. Situación actual y perspectivas de investigación en cacao (*Theobroma cacao* L) en el Perú. INIA. 2009.
45. Drugs.com Herbal Database [homepage en Internet]. Cocoa Uses, Benefits & Dosage. Consultado el 11 abril 2015. Disponible en: <http://www.drugs.com/npp/cocoa.html>
46. Perfetti L, Lehrer SB, McCants M, Malo JL. Occupational asthma caused by cacao. *Allergy* . 1997;52(7):778-780.
47. Kovalkovičová N, Šutiaková I, Pistl J and Šutiak V. Some food toxic for pets. *Interdiscip Toxicol*. 2009 September; 2(3): 169–176. Consultado el 13 abril 2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2984110/?tool=pubmed>

48. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. Anti –cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 2009; 80: 255 -262.
49. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G. Plant polyphenols and their anti –cariogenic properties: a review. *J Molecules*. 2011; 16: 1486 -1507.
50. Nalina T., Rahim ZH. Effect of Piper betle L. Leaf extract on the virulence activity of *Streptococcus mutans* -an in vitro Study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2006; 9 (8): 1470 -1475.
51. Khanafari A., Hosseini S., Tajabadi M. Investigation of probiotic chocolate effect on *Streptococcus mutans* growth inhibition. *Jundishapur J Microbiol*. 2012; 5 (4): 590 -597.
52. Bursal E., Köksal E., Gülçin I., Bilsel G., Gören A. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium L.*) determined by LC–MS/MS. *Food Research International*. 2013; 51: 66 -74.
53. Srikanth, R.K.; Shashikiran, N.D.; Subba Reddy, V.V. Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent*. 2008; 26: 67-70.
54. Poveda RM, Sanchez GS, Medina GE. Gluconato de clorhexidina al 0.12% en la inhibición de la adherencia de *Streptococcus mutans* en restauraciones

provisionales de polimetilmetacrilato *in vitro*. Revista Odontológica Mexicana 2006; 10 (1): 24-29.

55. Pedro ND, García BL. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2010; 9(2): 156-166

56. Clorhexidina en Vademecum [homepage en Internet]. Monografía creada el 21 agosto de 2013. Consultado el 23 abril 2015. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c090.htm>

57. Gonzales Villa, A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. (Trabajo final, línea de profundización: tecnología de alimentos) Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales. 2004.

58. Srikanth, R.K.; Shashikiran, N.D.; Subba Reddy, V.V. Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 2008; 26: 67-70.

**X. ANEXOS**

**10.1 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**FICHA DE REGISTRO DE ACTIVIDAD INHIBITORIA**

**Placa número:** .....

**Cepa:** .....

**Concentración:** .....

**Medio de cultivo:** .....

**Fecha de lectura:** .... / .... / .....

**Hora de lectura:** .....

	<b>Extracto etanólico semilla 80%</b>	<b>Extracto etanólico de cáscara 80%</b>	<b>Control negativo (Etanol 80%)</b>	<b>Control Positivo (CHX)</b>
<b>Presencia de inhibición</b>				
<b>Ausencia de inhibición</b>				

## FICHA DE REGISTRO DE DIÁMETRO DE INHIBICIÓN

Placa número: .....

Cepa: .....

Concentración: .....

Medio de cultivo: .....

Fecha de lectura: ..../..../.....

Hora de lectura: .....

	Diámetro del halo de inhibición en mm
Extracto etanólico semilla 80%	
Extracto etanólico cáscara 80%	
Control negativo (Etanol 80%)	
Control positivo (CHX)	

## FICHA DE REGISTRO DE TEST DE ADHERENCIA

GRUPO	DILUCIÓN	1/10
	TIEMPO DE INCUBACIÓN	48 horas
N° PLACA	UFC/por placa	UFC/ml
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

**Para obtener UFC/ml**

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Unidades formadoras de colonias por placa} \times \text{Factor de dilución}^*}{\text{ml de muestra colocada en la placa}}$$

\*Factor de dilución= inversa de la dilución

## 10.2 TABLAS DE RESULTADOS

**TABLA 1. Medidas del diámetro de halo de inhibición en placas de agar TSA**

N° DE PLACA	GRUPOS EXPERIMENTALES			
	MEDIDA DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	G1	G2	G3	G4
1	10	23	0	29
2	11	24	0	27
3	11	23	0	27
4	12	23	0	28
5	9	24	0	28
6	10	26	0	28
7	9	24	0	28
8	10	22	0	29
9	12	25	0	28
10	10	24	0	27
11	9	25	0	28
12	11	23	0	28
13	12	25	0	30
14	11	22	0	27
15	12	24	0	28
<b>PROMEDIOS</b>	10.6	23.8	0	28

<b>N° DE PLACAS</b>	15
<b>G1</b>	EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLA DE CACAO AL 80%
<b>G2</b>	EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO AL 80%
<b>G3</b>	CONTROL NEGATIVO: ETANOL AL 80%
<b>G4</b>	CONTROL POSITIVO: CLORHEXIDINA 0.12%

**TABLA 2. Recuento de UFC/ml en placas de Agar mitis salivaris**

N° DE PLACA	PRUEBA DE ADHERENCIA			
	UFC/ml			
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
1	4700	0	284400	0
2	23200	2200	432000	0
3	35200	3800	566000	0
4	22400	0	470000	0
5	18200	0	398000	0
6	24200	0	437000	0
7	31200	1400	443000	0
8	39400	0	674400	0
9	213200	0	657600	0
10	51700	0	476800	0
<b>PROMEDIO</b>	46340	740	483920	0
<b>MEDIANA</b>	27700	0	456500	0

<b>GRUPO A</b>	Cuerpos de esmalte dental expuestos a extracto etanólico de semilla de cacao
<b>GRUPO B</b>	Cuerpos de esmalte dental expuestos a extracto etanólico de cáscara de cacao
<b>GRUPO C</b>	Control positivo: Cuerpos de esmalte dental NO expuestos al extracto
<b>GRUPO D</b>	Control negativo: Cuerpos de esmalte dental, en caldo BHI; sin extracto; sin bacteria.



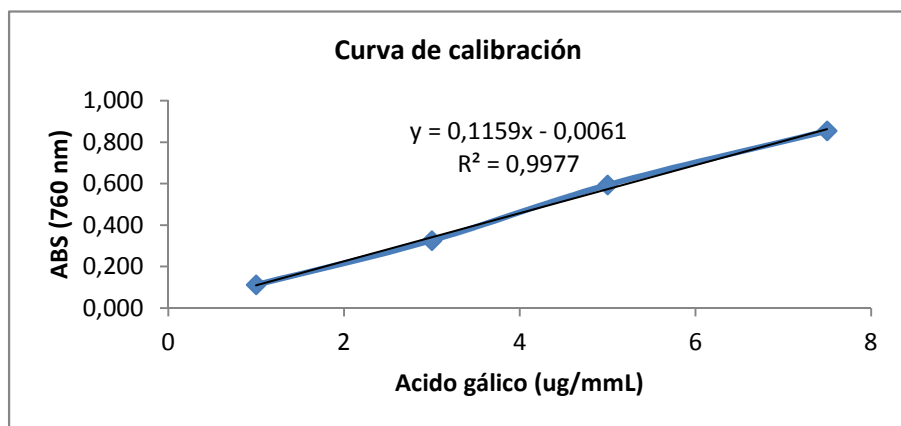
## CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

### Metodología empleada:

Determinación de compuestos fenólicos: Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por García et al. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 1-7.5 ug/mL. Los extractos hidroalcohólicos de las muestras vegetales fueron evaluados a una concentración de 0,1 mg/mL. A 100 µL de la muestra se le añadió 250 µL de la solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 3 con agua milli-Q), se sonicó por 5 min, luego se le añadió 1250 µL de carbonato de sodio al 20% y 400 µL de agua ultra pura. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 90 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto hidroalcohólico.

1. **García Nava M.J. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales.**  
[http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_IUAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_IUAQGarciaNava.pdf) (último acceso 8 de octubre del 2015).

corrida 1				
CURVA DE CALIBRACION 1				
ug AC GALICO/ml	serie 1	serie 2	serie 3	promedio
1	0,114	0,115	0,108	0,112
3	0,32	0,334	0,325	0,326
5	0,596	0,604	0,582	0,594
7,5	0,825	0,865	0,875	0,855



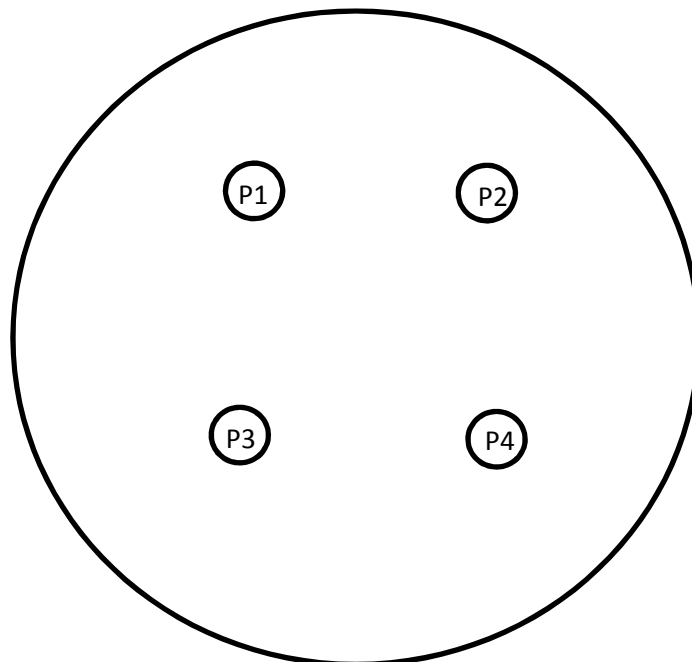
**TABLA 3. Cuantificación de compuestos fenólicos con el método de Folin - Ciocalteu**

Muestra	Contenido de compuestos fenólicos expresados en mgEAG/g extracto
1. Semilla de cacao 50%	13,45 ± 0,51
2. Semilla de cacao 80 %	18,70 ± 0,16
3. Semilla de cacao 96 %	7,00 ± 0,19
4. Cáscara de cacao 50 %	16,12 ± 0,56
5. Cáscara de cacao 80 %	20,15 ± 0,46
6. Cáscara de cacao 96 %	8,36 ± 0,55

EAG = equivalente al ácido gálico

### 10.3 CUADROS Y GRÁFICOS

#### DISPOSICIÓN DE LOS POCILLOS EN LAS PLACAS PETRI



**P1:** extracto etanólico de semilla de cacao

**P2:** extracto etanólico de cáscara de cacao

**P3:** control negativo (etanol 80%)

**P4:** control positivo (clorhexidina 0.12%)

## FLUXOGRAMA DEL TEST DE ADHERENCIA

### Preparación de soluciones

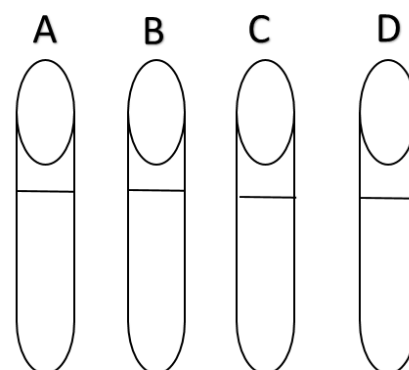
Cada tubo contiene 10ml de caldo BHI +10% sacarosa.

A: se agrega 0.5mg del extracto de semilla

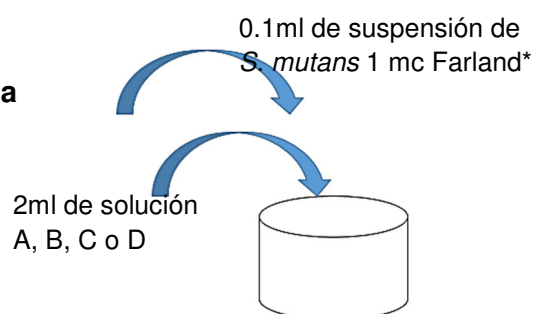
B: se agrega 0.5mg del extracto de cáscara

C: no se agrega extractos

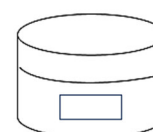
D: no se agrega extractos



### Preparación de cada pozo de la microplaca

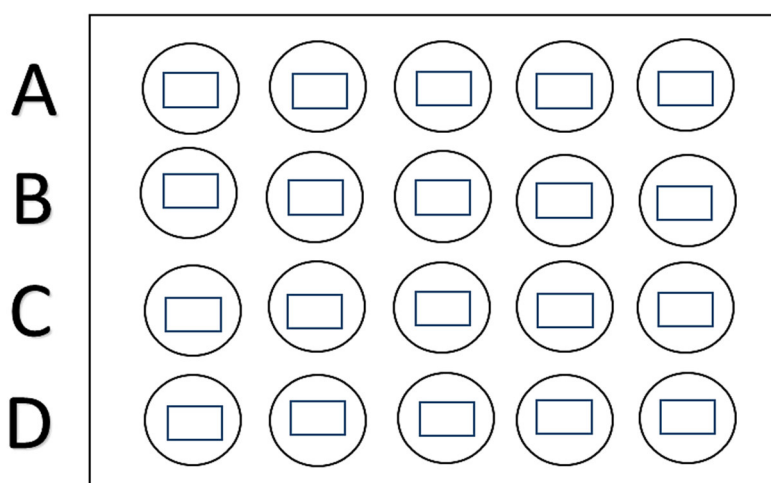


Colocación del cuerpo de prueba en el pocillo



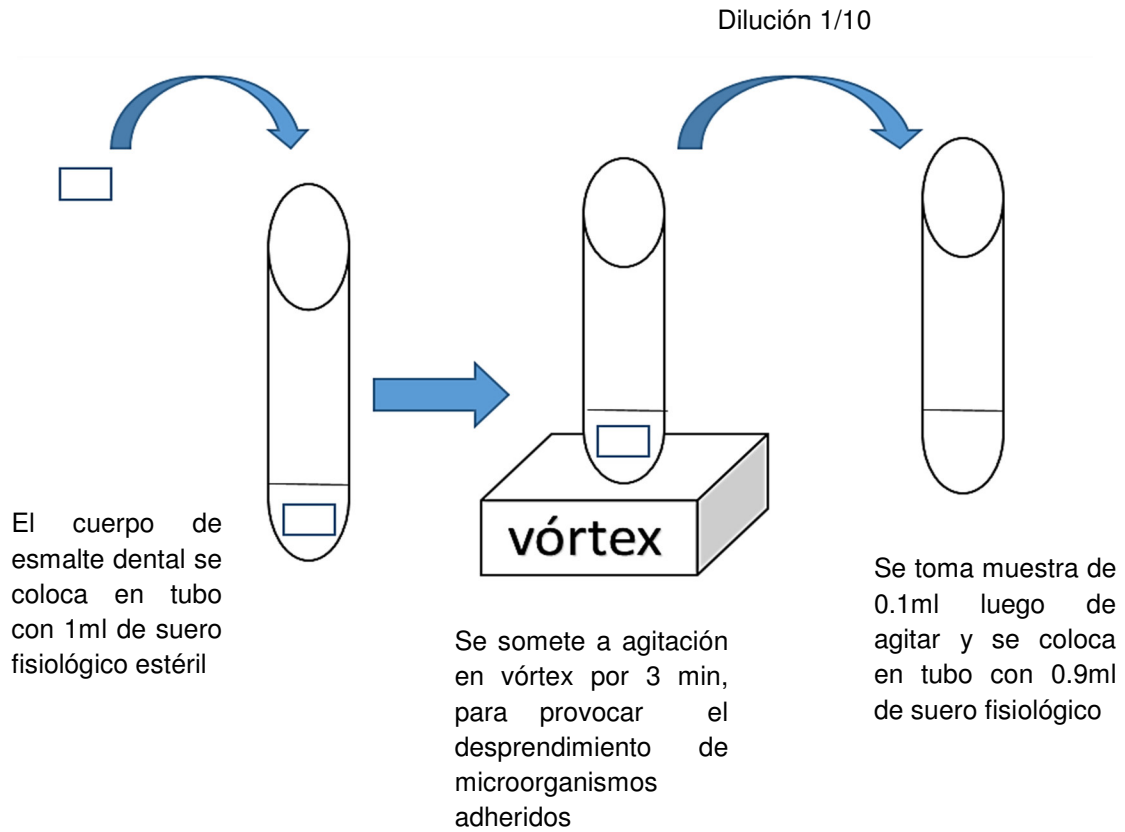
\*En los pozos correspondientes al grupo D, no se añade suspensión del *S. mutans*

Distribución de cuerpos de prueba en cada uno de los pozos de la microplaca

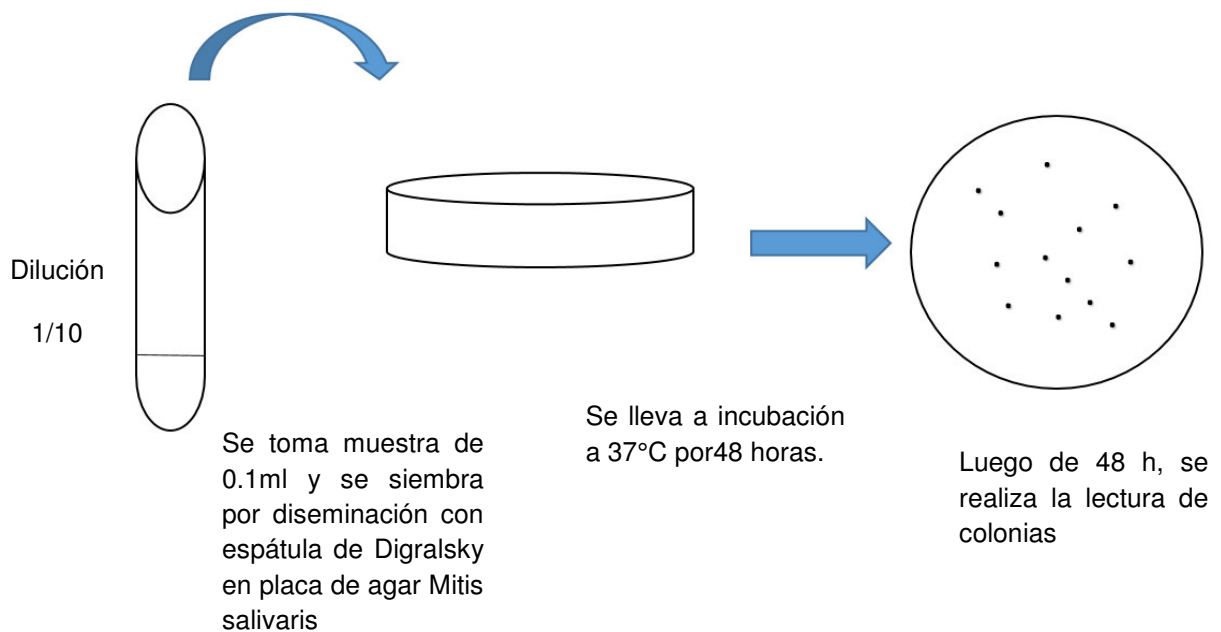


Incubación de microplaca a 37° C por 48 horas, a 5% CO<sub>2</sub>

## Desprendimiento de microorganismos



## Sembrado y lectura de colonias



#### 10.4 FOTOGRAFÍAS

Muestras secas de semilla y cáscara de *Theobroma cacao* L., variedad “chuncho”



Fig. A

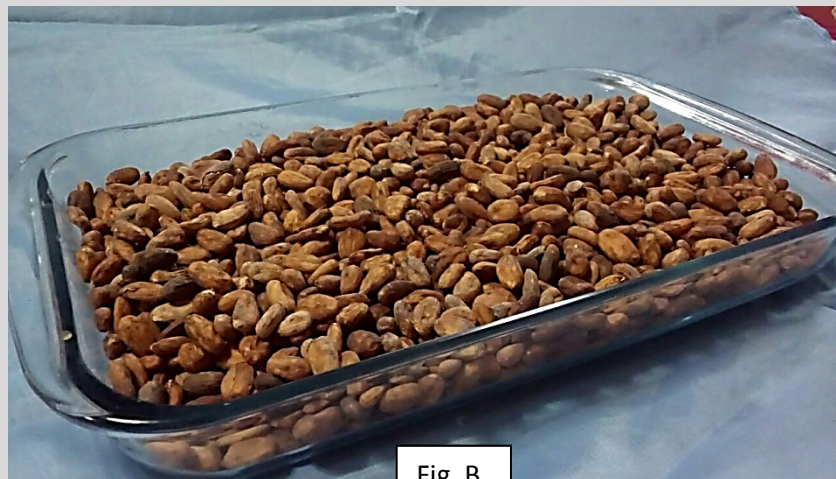


Fig. B



Fig. C

FIGURA 1. (A) Muestras de semilla, cáscara y nibs de cacao. (B) Muestra de semillas de cacao secadas y tostadas (C) Muestras de cáscara de cacao retiradas de las semillas.

## Elaboración del Extracto etanólico de semilla y cáscara de cacao

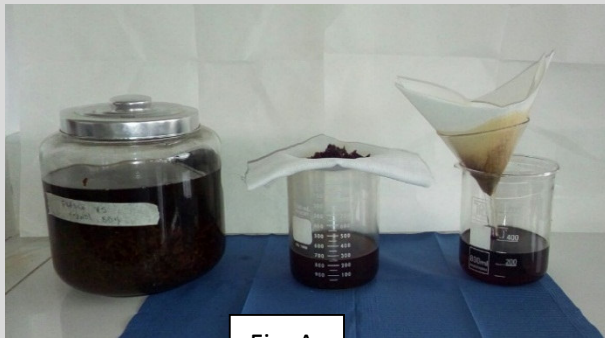


Fig. A



Fig. B



Fig. C



Fig. D



Fig. E

FIGURA 2. (A) Filtrado por gasa y papel de filtro semirapido. (B) Recipientes con filtrado (4L cada uno) (C) Eliminación del solvente con rotavapor. (D) Extractos luego del procesado por rotavapor (E) Extractos etanólicos de cáscara y semilla, luego de evaporación en estufa  $< 40^{\circ}\text{C}$ .

### Prueba de actividad antimicrobiana en pocillos

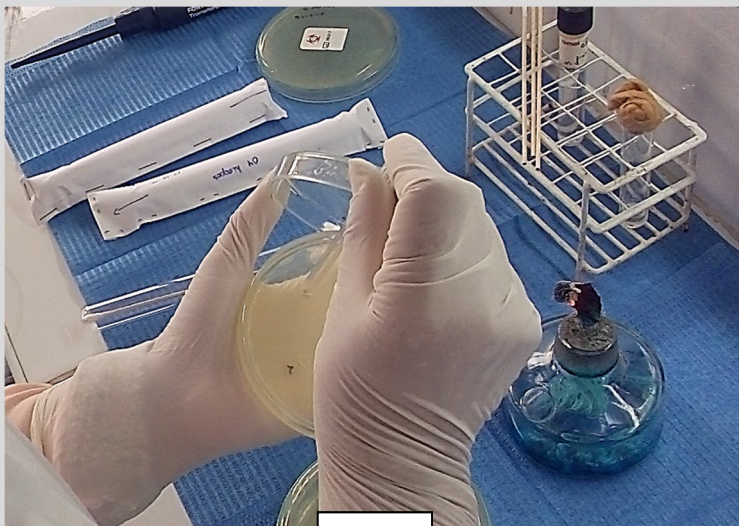
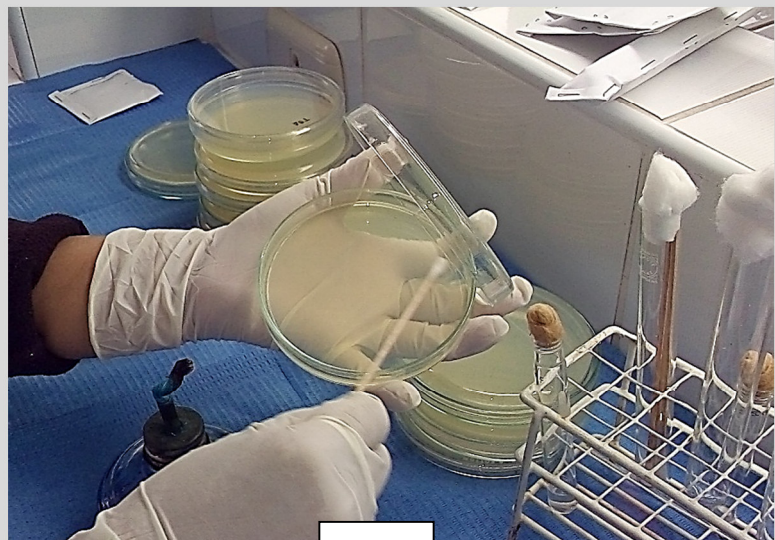
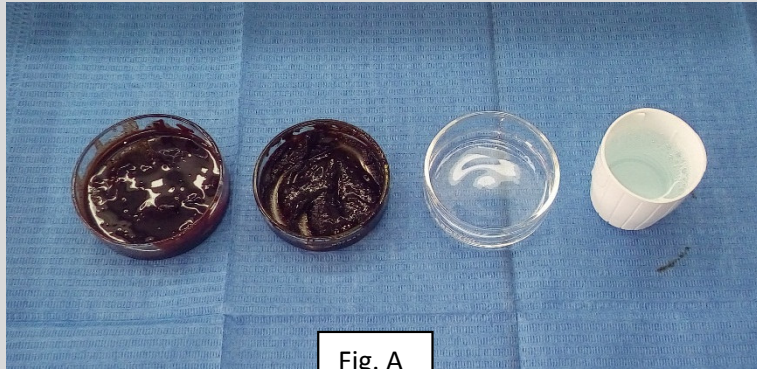


FIGURA 3. (A) Muestras de extracto de semilla, de cáscara de cacao, etanol 80% y clorhexidina 0.12%. (B) Colocación de muestras de *S. mutans* en placas TSA, (C) Confección de pocillos en placas con Agar TSA.



Fig. A

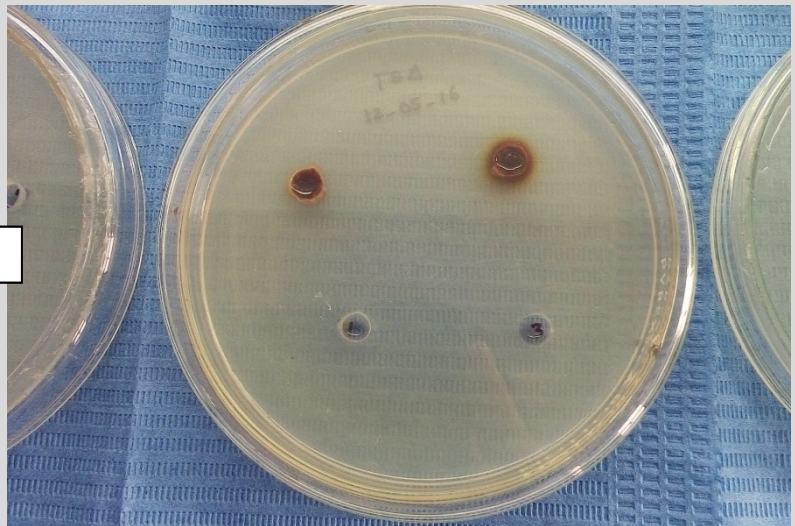


Fig. B

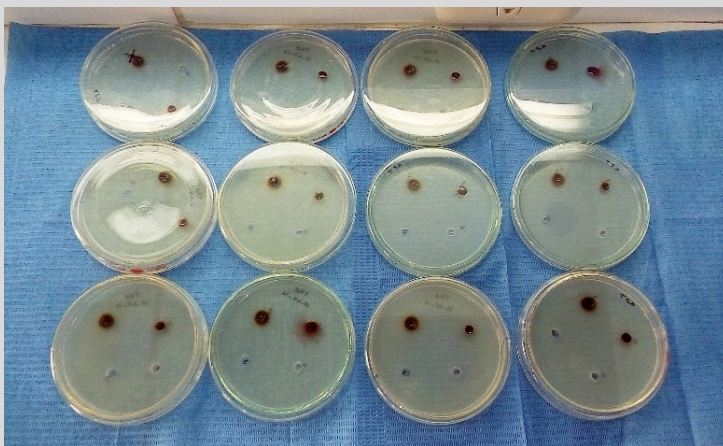


Fig. C



Fig. D

FIGURA 4. (A) Colocación de muestras de extracto en los pocillos (B) Placa de Agar TSA preparada. (C) Placas de agar TSA antes de ser incubadas. (D) Incubación a 37°C x 48h, 5% CO<sub>2</sub>



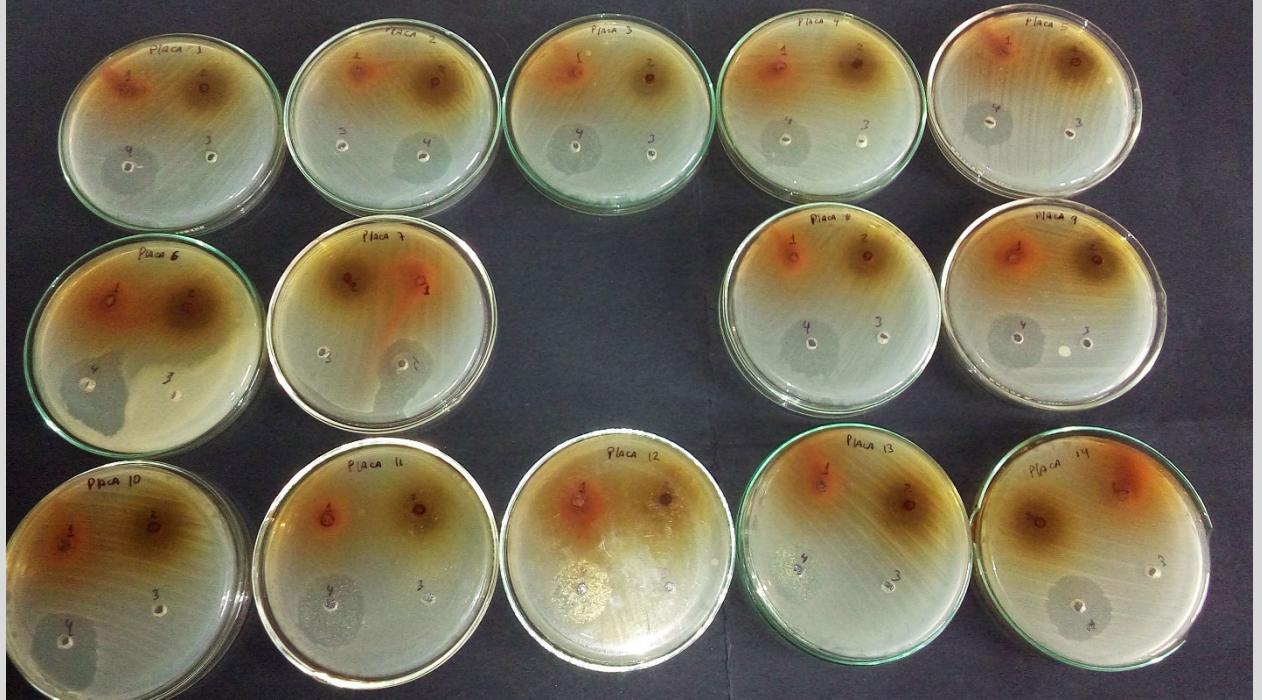


Fig. A

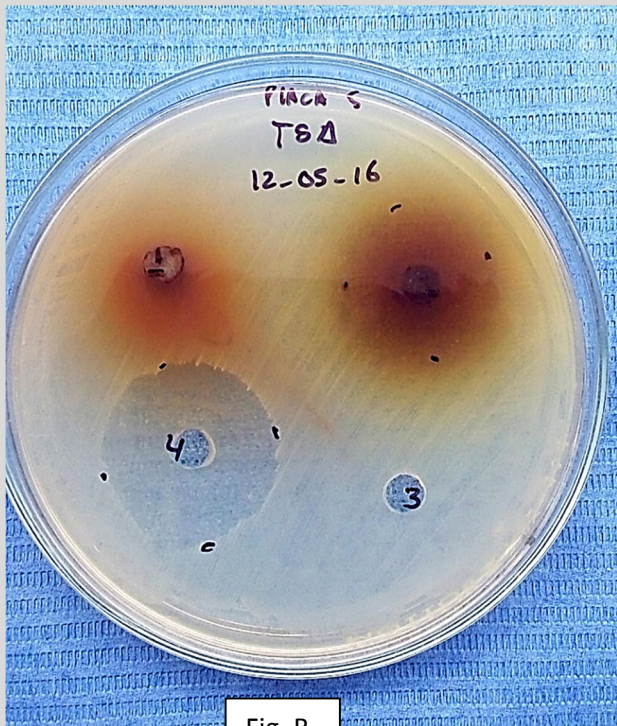


Fig. B

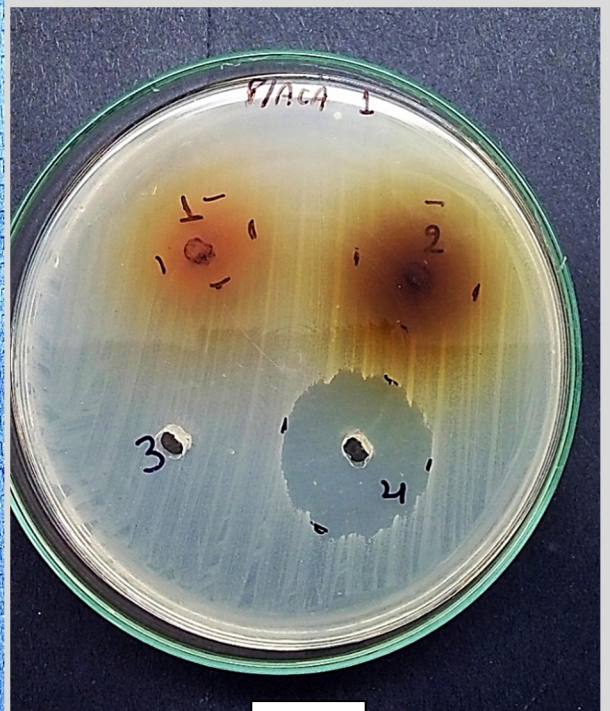


Fig. C

FIGURA 5. (A) Placas con agar TSA luego de su incubación (B y C) Formación de halos de inhibición.

## Confección de cuerpos de prueba



Fig. A



Fig. B



Fig. C

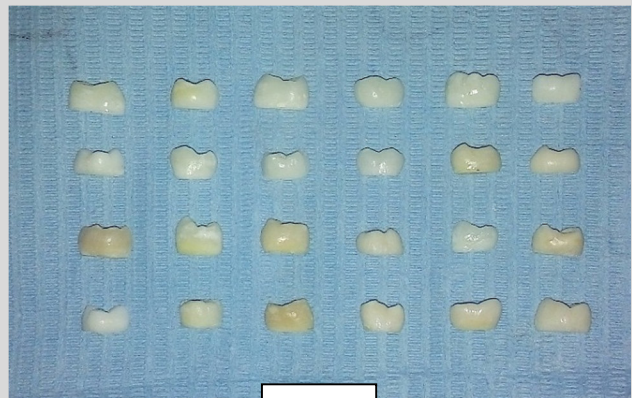


Fig. D

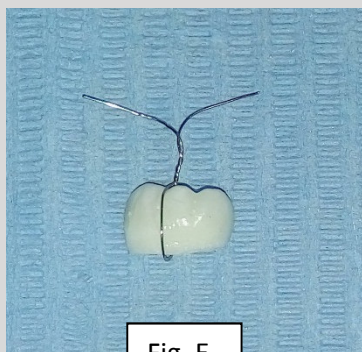


Fig. E

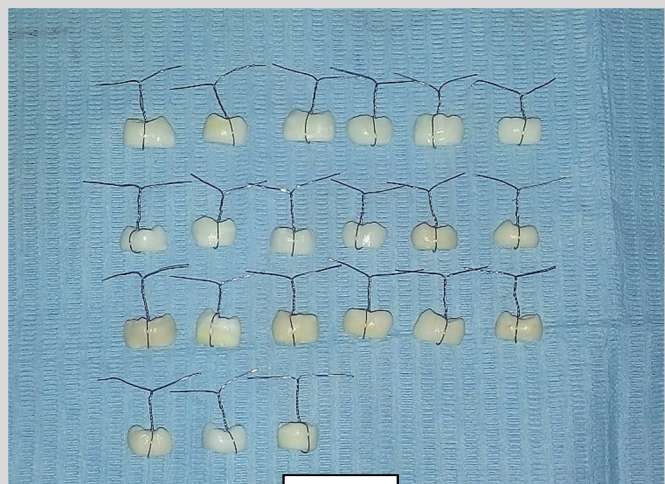


Fig. F

FIGURA 6. (A) Piezas dentales recolectadas (B) Almacenamiento en formalina 2%. (C) Cortes sagitales de las piezas (D) Fragmentos de esmalte utilizados para el test de adherencia. (E) Cuerpo de prueba con soporte de alambre (F) Cuerpos de prueba preparados para su esterilización en autoclave y usar en las pruebas de laboratorio.

## Test de adherencia

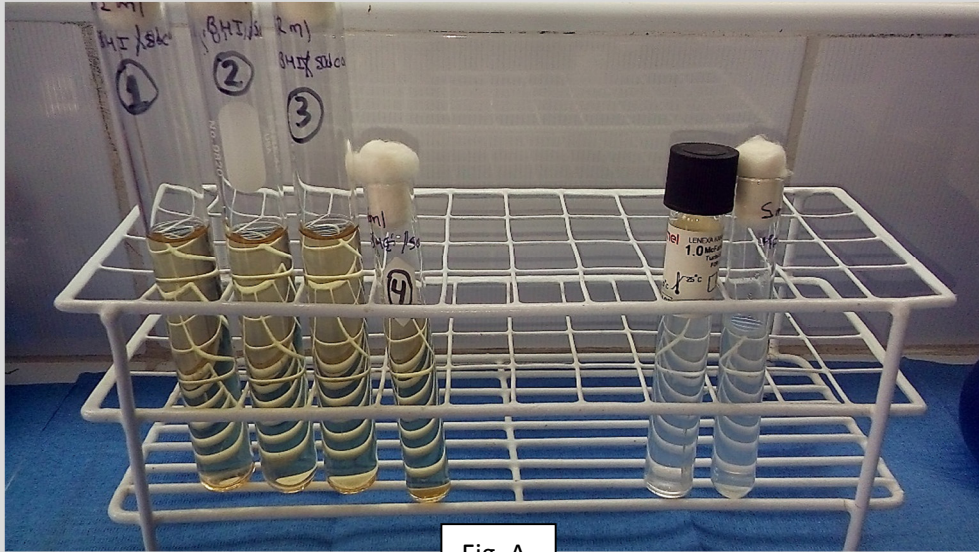


Fig. A

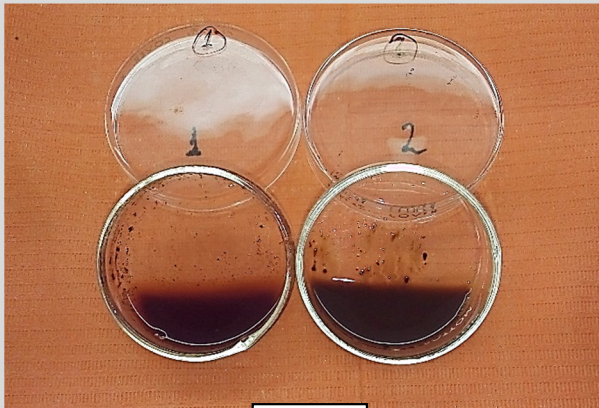


Fig. B

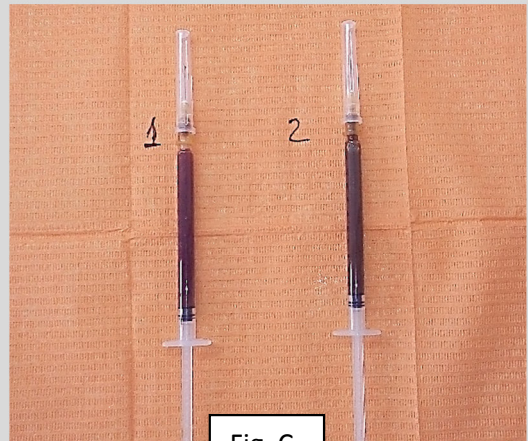


Fig. C



Fig. D

FIGURA 7. (A) Tubos con caldo BHI + 10% sacarosa y suspensión del *S. mutans* 1 Mc farland. (B) Dilución de extractos 0.5g/ml cada uno. (C) Extractos diluidos y colocados en jeringas de tuberculina (D) Tubos de caldo BHI con los respectivos extractos (tubo 1 y 2) y los controles (tubo 3 y 4)

1° etapa: contaminación de cuerpos de prueba en microplaca de 24 pozos



Fig. A

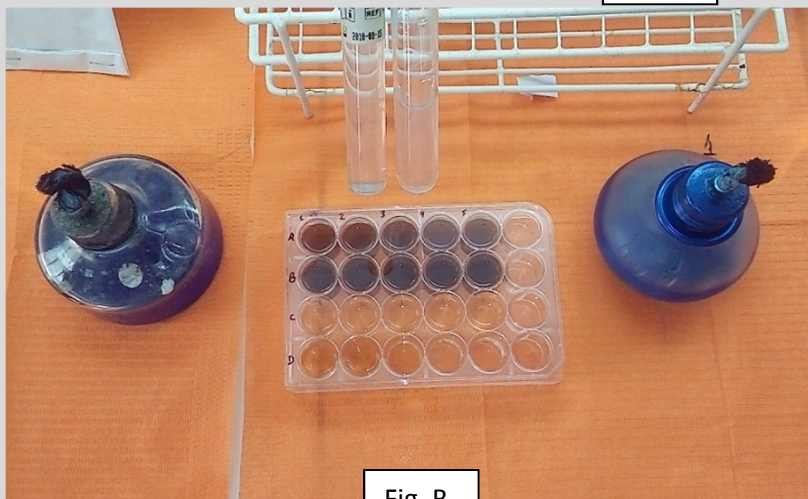


Fig. B

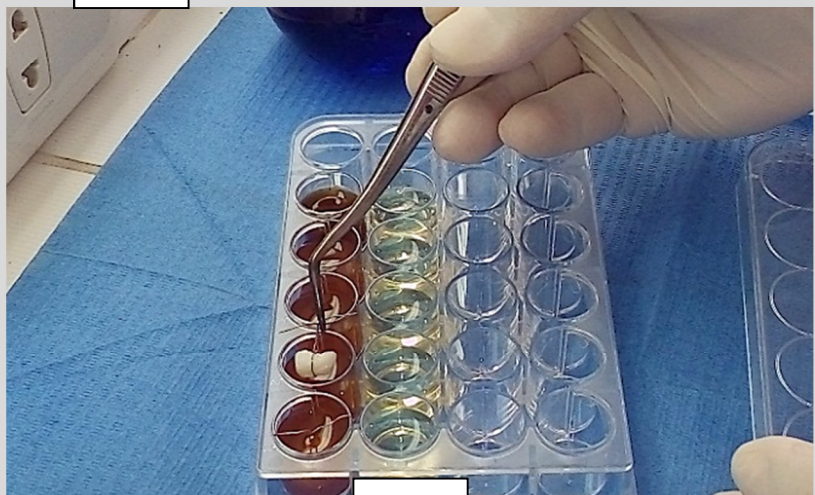


Fig. C

FIGURA 8. (A) Tubos con caldo BHI + 10% sacarosa divididos en 4 grupos y microplaca de 24 pozos donde serán distribuidos. (B) Distribución en microplaca y contaminación con 0.1ml suspensión del *S. mutans*. (C) Colocación de cuerpos de prueba en sus respectivos pozos.

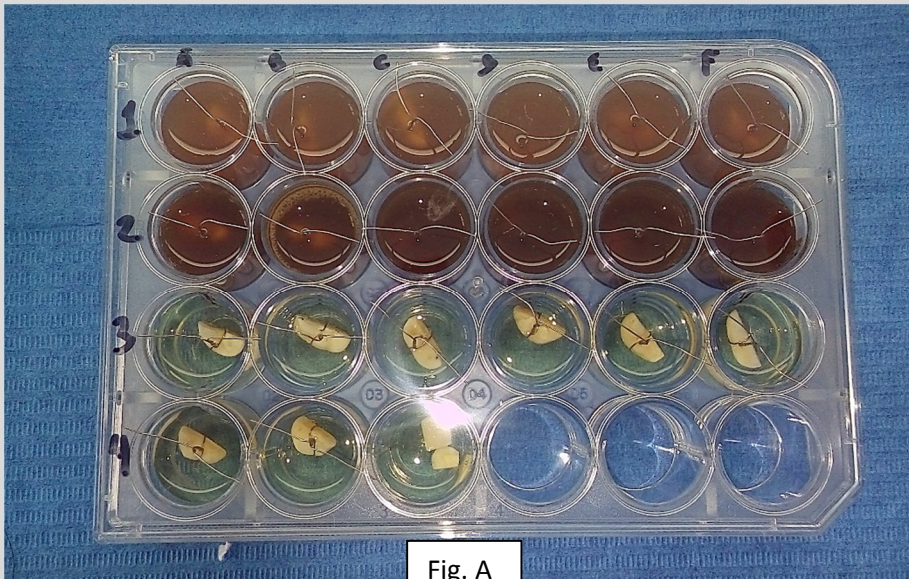


Fig. A

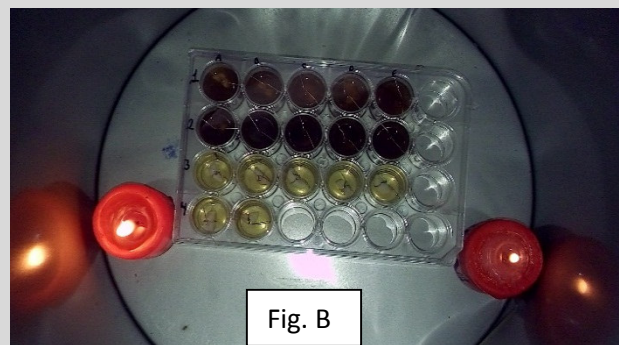


Fig. B

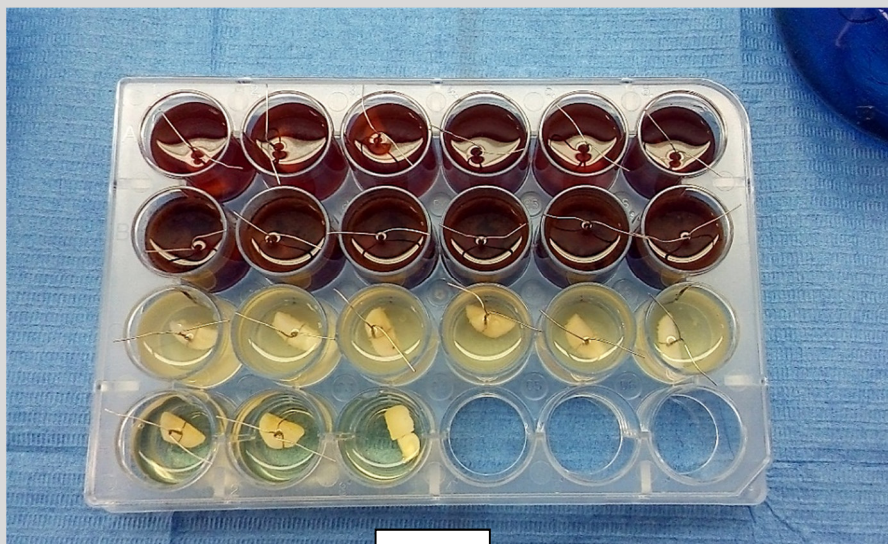


Fig. C

FIGURA 9. (A) Microplaca con los cuerpos de prueba distribuidos en 4 grupos (B) Incubación a 37°C x 48h (C) Cuerpos de prueba luego de su incubación, nótese el nivel de turbidez del grupo 3 donde no se colocó extracto, el grupo 4 no se colocó extracto ni suspensión de bacteria.

## 2° etapa: Valoración de la adherencia

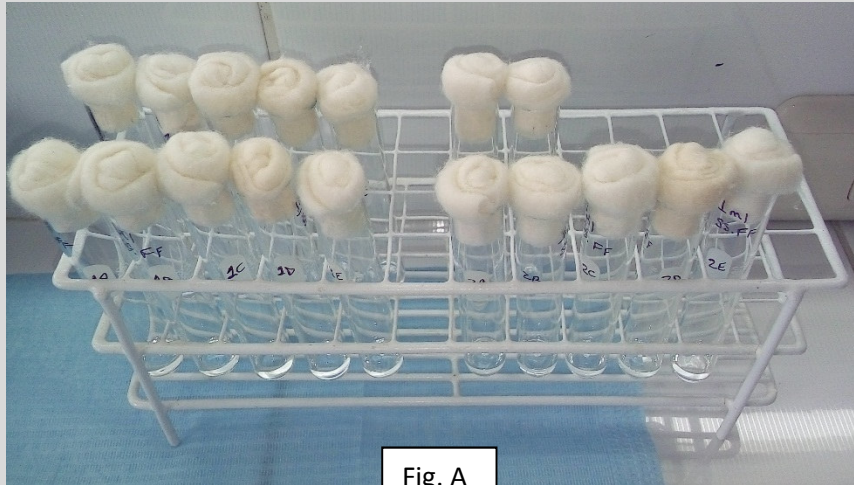


Fig. A

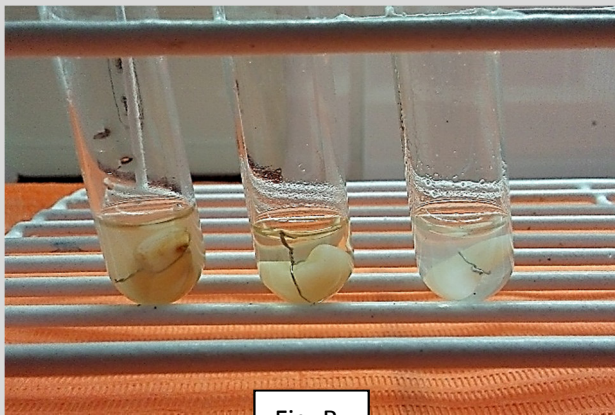


Fig. B

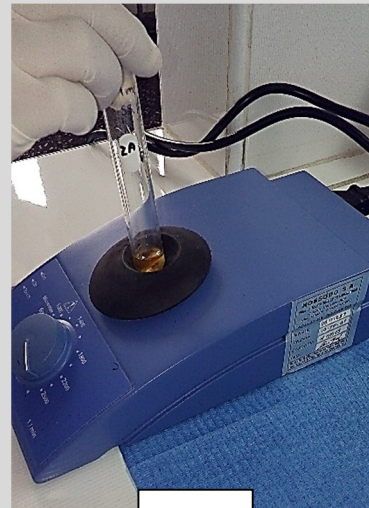


Fig. C



Fig. D

FIGURA 10. (A) Tubos de ensayo con suero fisiológico estéril, donde se colocaron los cuerpos de prueba para agitarlos. (B) Cuerpos de prueba en 1ml de suero fisiológico estéril. (C) Desprendimiento de microorganismos con agitación en Vórtex por 3min. (D) Dilución 1/10 en tubos con 0.9ml de suero fisiológico.

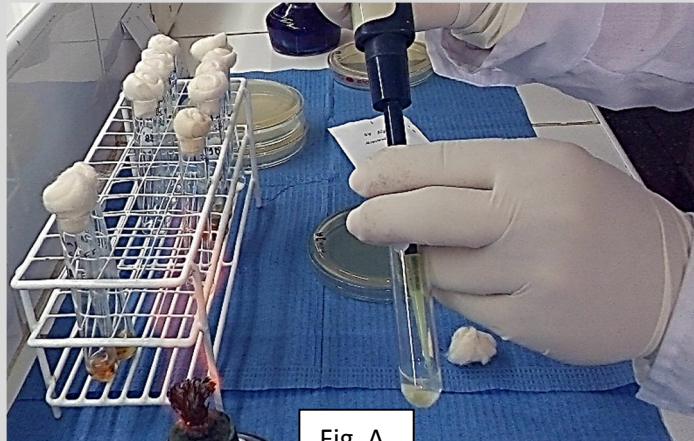


Fig. A

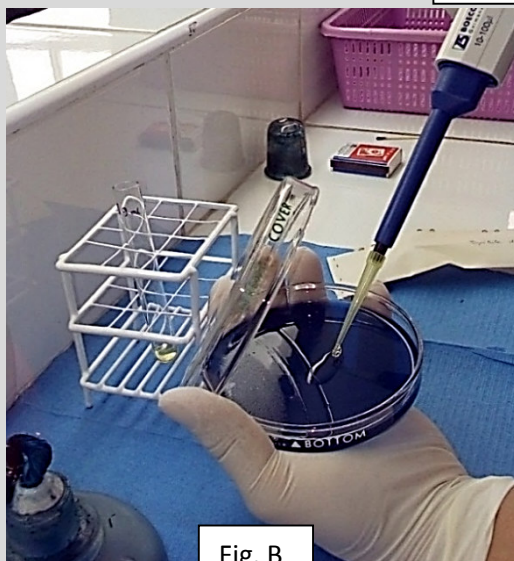


Fig. B

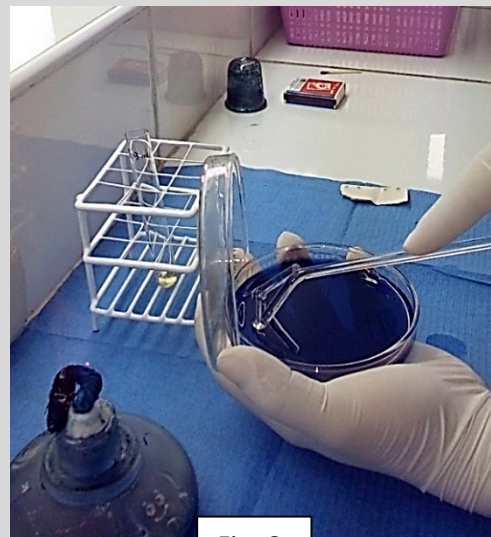


Fig. C

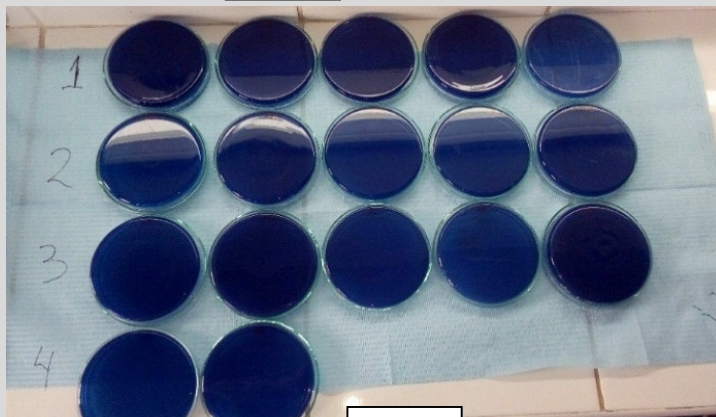


Fig. D



Fig. E

FIGURA 11. (A) Toma de muestra de la dilución 1/10 (B) Colocación de muestra 0.1ml sobre placa con agar Mitis salivaris (C) Sembrado por diseminación con espátula de Digrafsky (D) Placas de Agar Mitis salivaris distribuidas y sembradas. (E) Incubación a 37°C x 48 horas, 5% CO<sub>2</sub>

3° etapa: Lectura de colonias



Fig. A



Fig. B



Fig. C

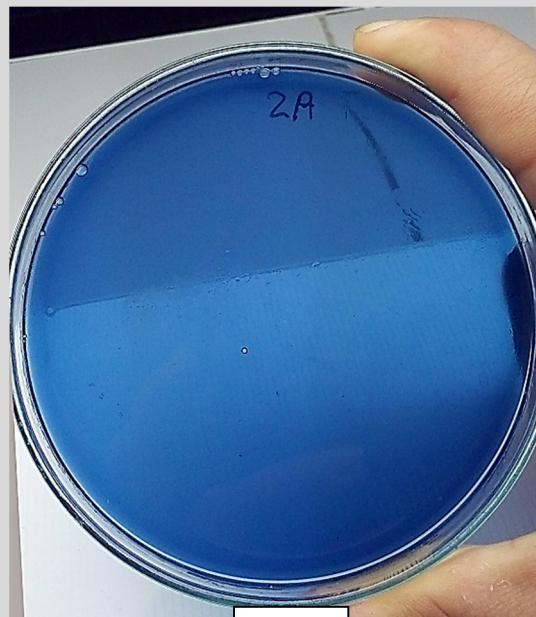


Fig. D

FIGURA 12. (A y B) Recuento de UFC en placas de agar Mitis salivaris del grupo sometido a extracto de **semilla de cacao** (C y D) Recuento de UFC en placas de agar Mitis Salivaris del grupo sometido a extracto de **cáscara de cacao**.





Fig. A

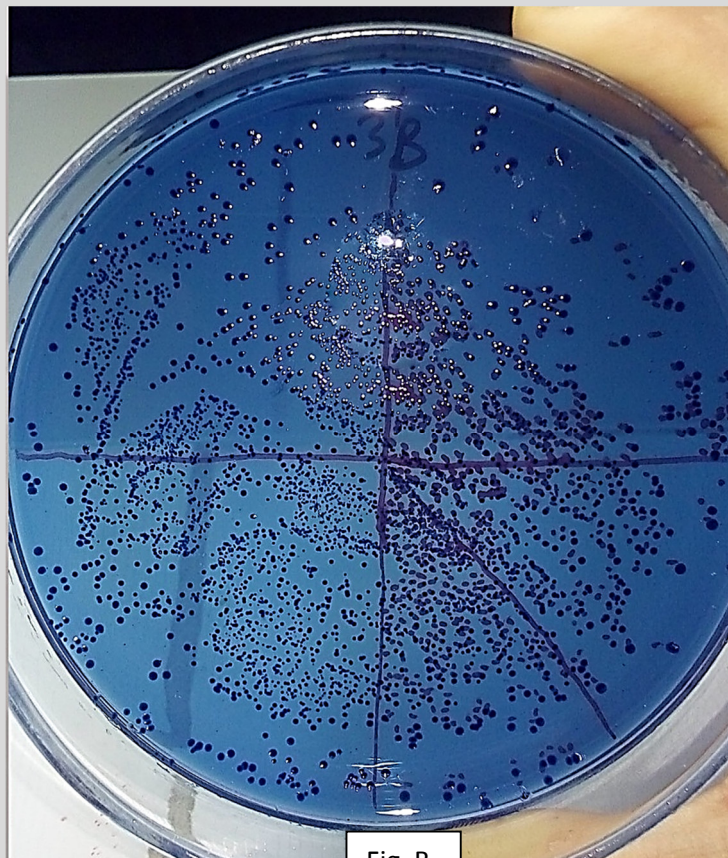


Fig. B

FIGURA 13. (A y B) Recuento de UFC en placas de agar Mitis salivaris del grupo control positivo, que no fue expuesto a ninguno de los extractos.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

**CONSTANCIA N° 282-USM-2016**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (semilla y cáscara) recibida de **Josué Braisson ORIHUELA GUTIERREZ**, estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Theobroma cacao*** L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: DILLENIIDAE**

**ORDEN: MALVALES**

**FAMILIA: STERCULIACEAE**

**GENERO: Theobroma**

**ESPECIE: *Theobroma cacao* L.**

Nombre vulgar: "cacao chuncho"

Determinado por: Mg. Asunción Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 01 de diciembre de 2016



**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA**  
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

DDB



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

Tel.: 619-7000 - Anexo 3402  
Fax: - 3409

**"Acreditada Internacionalmente"**

Lima, 19 de octubre 2015

Señor Magister  
CESARIO CONDORHUAMÁN CCORIMANYA  
Decano de la Facultad de Química e Ingeniería Química  
Presente.-

De mi mayor consideración:

Me es grato dirigirme a su Despacho para saludarlo cordialmente a nombre de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

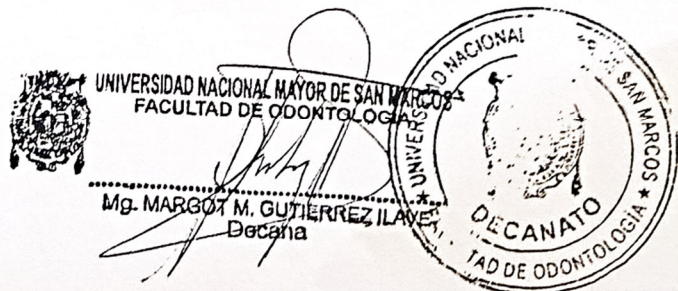
Permítame, presentarle al Bachiller Josué Braisson Orihuela Gutiérrez, con Código de Matricula N° 07050044, quien viene ejecutando su proyecto de tesis titulada "ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Theobroma cacao* L., SOBRE EL CRECIMIENTO Y ADHERENCIA *in vitro* DE *Streptococcus mutans* A ESMALTE DENTARIO" Para ello es necesario el uso de un equipo rotavapor para la extracción.

Por tal motivo; solicito a su despacho brindar las facilidades al bachiller para hacer uso del equipo antes mencionado, el cual estará bajo la colaboración de la docente de vuestra facultad la Mg. Gloria Tomas Chota.

Agradeciendo, a usted la atención que brinde a la presente y hago propicia la oportunidad para expresarle mi más alta consideración y estima.

Atentamente,

U.N.M.S.M.	
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA	ODONTOLÓGICA
RECIBIDO	
Fecha: 19/10/15	Hora: 14:30
[Firma]	



- Se adjunta el proyecto



# UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

“Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación”

## CAR-FE-DAMCIBUM-142- 2015

Lima, 27 de abril de 2015

Señor

**Josue Braisson Orihuela Gutierrez**  
Bachiller, Facultad de Odontología  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Presente.-

Estimada Sr. Orihuela:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo y en atención a su carta de fecha 14 de abril del presente, comunico a usted que está autorizado para realizar su protocolo de investigación titulado: “*Actividad inhibitoria del extracto etanólico de Theobroma cacao L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de Streptococcus mutans a esmalte dentario*”, para ello se le facilitará el ingreso al Servicio de Patología Oral, a fin de realizar 20 cortes de terceros molares humanos, siendo el costo del corte por pieza dental de S/. 75.00.

Para poder iniciar su trabajo, agradeceré coordinar con la Dra. Sonia Sacsquispe Contreras, Jefa de la Sección de Medicina Bucomaxilofacial, el Sr. Sáenz Hernández Molina, Técnico del Laboratorio de Patología Oral y para los trámites administrativos con la Sra. Amanda Arroyo, Asistente Administrativo del Departamento.

Atentamente,

Mg. Fredy Gutiérrez Ventura

Jefe  
Departamento Académico de Medicina y  
Cirugía Bucomaxilofacial

c.c. - Dra. Sonia Sacsquispe, Jefa - Sección Medicina B.  
FGV/aa