



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Odontopediatría

“EFECTO INHIBITORIO DE LA CASCARA DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L*)
EN CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la
Especialidad en Odontopediatría

Presenta:

L.O Gabriela del Carmen Pérez Lecona

Dirigido por:

C.D.M.O Mónica Clarisa Ortiz Villagómez

C.D.M.O Mónica Clarisa Ortiz Villagómez
Presidente

D. en C Jesús Eduardo Castro Ruíz
Secretario

L.O.E.O Laura Adriana Servín Maxemín
Vocal

L.O.E.O Ana Liz Yáñez Gutiérrez
Suplente

D. en C.E.E Rubén Abraham Domínguez Pérez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Agosto 2020
México

Resumen

Introducción: La caries dental al ser una enfermedad multifactorial que representa por su gran incidencia y a los altos costos que implica su tratamiento un problema de salud pública global y nacional, pertenece al listado “negro” de las principales enfermedades que padece la población en la actualidad, compartiendo lugar con hipertensión, obesidad y diabetes (Nalina y Rahim, 2007). En la actualidad el uso de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades constituye un desafío en la medicina y en la odontología actual. **Objetivo:** Determinar si tiene efecto inhibitorio el extracto de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* in vitro. **Material y métodos:** Experimental in vitro. Se utilizaron 40 placas de cultivo inoculadas por *Streptococcus mutans*, cada placa se conformó por 3 tipos diferentes de extractos, pasta dental Theodent Kids, control negativo (agua inyectable), y control positivo (clorhexidina al 2%). Para poder detectar diferencias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de Turkey. **Resultados:** Los diámetros de los halos de inhibición del extracto de cáscara de cacao cruda son mayores que los diámetros de semilla cruda, semilla tostada y pasta dental TK. **Conclusiones:** Nuestras pruebas abarcaron 4 extractos los cuales estaban realizados a base de cáscara y semilla cruda y dos más, de cáscara y semilla tostada, de los cuales el único extracto que arrojó resultados significativos fue el de cáscara cruda, descartando por igual a la pasta de cacao.

Palabras clave: Efecto inhibitorio de *Theobroma cacao L.*, caries dental, *Streptococcus mutans*, cacao.

Summary

Introduction: Dental caries, being a multifactorial disease that represents a large global and national public health problem due to its high incidence and high costs, belongs to the “black” list of the main diseases that the population currently suffers, sharing place with hypertension, obesity and diabetes (Nalina and Rahim, 2007). At present, the use of natural substances in the treatment of different diseases constitutes a challenge in medicine and current dentistry. **Objective:** To determine if the cocoa shell extract (*Theobroma cacao* L.) has an inhibitory effect on the growth of *Streptococcus mutans* strains in vitro. **Material and methods:** *In vitro* experimental. 40 culture plates inoculated with *Streptococcus mutans* were used, each plate was made up of 3 different types of extracts, Theodent Kids toothpaste, negative and positive control. In order to detect statistically significant differences, the Turkey test was applied. **Results:** The diameters of the raw cocoa shell extract inhibition halos are greater than the diameters of raw seed, roasted seed and TK toothpaste. **Conclusions:** Our tests included 4 extracts, which were made from a shell and raw seed and two more, from shell and roasted seed, of which the only extract that yielded significant results was that of raw shell, discarding cocoa paste equally.

Keywords: Inhibitory effect of *Theobroma cacao* L., dental caries, *Streptococcus mutans*, cacao.

Dedicatorias

A mi Chapis,

Mi principal pilar y más grande amor. Ejemplo de amor incondicional. Siempre apoyando y motivándome en todo momento. Valoro cada sacrificio por darme el mejor regalo de vida, mi educación. Sin ti esto no sería posible. Te amo.

A mi padre,

El tener palancas en el cielo seguro fue el motivo de cumplir uno de mis más grandes sueños. Estuviste estés y estarás en cada gozo y fracaso. Me haces falta pero te sentí presente en cada etapa de esta maravillosa travesía.

A mamá Carmelita,

Nunca olvidaré tu carita de ilusión al imaginarme odontóloga, que dicha fue crecer a tu lado. Sé que compartes esta alegría y celebras con orgullo el que llegamos a la meta.

A Norely y Natalia,

Me ilusiona que algún día el amor que le tengo a mi profesión las motive y sea ejemplo para que luchen por sus sueños.

A Jorge,

Por ser el mejor compañero de vida. La alegría y el amor que me transmitiste para superar cada reto son indescriptibles, complementaste de la mejor manera una etapa maravillosa e inolvidable. Gracias por creer en mí y en el proyecto, siempre. Te amo.

A Dios, mi mejor amigo.

Valieron la pena cada uno de los momentos agobiantes y estresantes. Cada prueba tenía un motivo y una lección por aprender. Hoy más que nunca sé cuánto me amas y me cuidas. Estoy segura de que el resto del camino lo recorreremos juntos, como siempre, pero con mayor humildad y amor. Gracias por ser mi refugio y mi fortaleza.

Agradecimientos

A *Israel* por sus muestras de cariño y apoyo incondicional. A cada uno de los miembros de mi familia que siempre han creído en mí.

Gracias a las mejores compañeras y amigas, las *Chavis*, por su cariño y por impulsarme a seguir a delante sin importar los tropiezos.

Mi más grande agradecimiento a mis *maestros* que además de compartir sus conocimientos siempre se dieron el tiempo de compartirme su cariño.

Dra. Moni. Gracias por creer en nuestro proyecto. Gracias por su colaboración, orientación y cariño.

Dr. Eduardo Castro, estaré eternamente agradecida con usted por ser mi guía en este proyecto. Sin usted no hubiera podido culminar tan importante proceso. Gracias por su tiempo y por tantas enseñanzas.

Dr. Rubén, no hay palabras para describir lo que usted significa en este proyecto. Gracias por SIEMPRE estar, porque gracias a usted he valorado el trabajo que hay detrás de un proyecto de investigación, valoré el tiempo, comprendía el significado de paciencia y de resiliencia. Aprendí a disfrutar como jamás imaginé, el proceso para poder gritar “eureka”. Gracias por ser tan buen ser humano, porque a pesar de todo siempre creyó en mí y en cada uno de sus alumnos. Dichosa por haberlo conocido y poder trabajar con usted.

Índice

Contenido	Página
Resumen	ii
Summary	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Índice	vi
Índice de cuadros	vii
Abreviaturas y siglas	viii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Fundamentación teórica	8
IV. Hipótesis	12
V. Objetivos	13
V.1 General	13
V.2 Específicos	13
VI. Material y métodos	14
VI.1 Tipo de investigación	14
VI.2 Población o unidad de análisis	14
VI.3 Muestra y tipo de muestra	15
VI. Técnicas e instrumentos	16
VI. Procedimientos	17
VII. Resultados	25
VIII. Discusión	27
IX. Conclusiones	31
X. Propuestas	32
XI. Bibliografía	33
XII. Anexos	36

Índice de Figuras

Figura		Página	
1	Proceso de preparación de extractos	19	
2	Proceso de esterilización por filtración en campana de bioseguridad.	19	
3	Primera prueba de extracto de cáscara de cacao tostado	20	
4	Ejemplos de caja Petri con cepa de <i>Streptococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Mycrococcus</i> y extracto de cáscara de cacao tostado y cacao en pasta.	21	
5	Tercera prueba con el resto de los extractos en placas con cepas de <i>Streptococcus mutans</i> , previas a ser incubadas por 24 horas.	23	
6	Pasta dental Theodent kids, formulada a base de extracto de cacao.	23	
7	Programa ImageJ	23	
8	Efecto inhibitorio medido en mm por medio de halos de inhibición	24	

Abreviaturas y siglas

TK: Theodent kids pasta dental

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

Las estadísticas por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) nos indican que el porcentaje de escolares que presentan procesos cariosos va de 60% a 90% en México. Por su cuenta en estudios realizados por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud se reveló que aproximadamente 10 millones de niños entre los dos y cinco años padecen caries, lo que representa un grave problema de salud bucal desde edades tempranas.

La caries dental al ser un problema de salud pública que no discrimina género, edad, ni nivel socioeconómico, reta a profesionales de la salud, investigadores y gobierno a generar opciones para mejorar la calidad de vida oral de la niñez mexicana. Entendiendo que dichas opciones de tratamiento preventivo deben de estar, en su mayoría, al alcance de la sociedad.

Actualmente se está retomando el uso de sustancias de origen natural para el beneficio de la población en diversas áreas de la salud, incluyendo odontología. Se ha demostrado científicamente, que diversos compuestos derivados de plantas, también llamados fitoquímicos, poseen actividades biológicas importantes con potenciales aplicaciones en áreas biomédicas.

El cacao también conocido como *Theobroma Cacao*, tiene usos medicinales que abarcan tratamientos preventivos para cardiopatías, alivio de quemaduras, molestias digestivas y diabetes. En el área de odontología por la presencia de polinefenoles, específicamente las epicatequinas, en la cáscara de la semilla cruda disminuye la producción de ácidos y síntesis de glucanos por parte del *Streptococcus mutans* principal agente causal de la caries dental.

La Secretaría de Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) indica que México produce aproximadamente 28 toneladas de cacao anualmente, eso lo coloca como el octavo productor de este alimento en el mundo.

Sí bien, el objetivo es brindar opciones a la población la propuesta es, aprovechar los recursos naturales que nuestro país nos ofrece y de manera consciente explotarlos para beneficio de la sociedad, específicamente aquella que es más vulnerable.

En estudios realizados en la Universidad de Osaka, Japón en el Departamento de odontología pediátrica en el año 2004 se obtuvieron resultados significativos acerca de la acción del extracto de cáscara de cacao donde el uso de enjuagues con diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Theobroma Cacao* redujo significativamente la adherencia del *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita recubierta de saliva y el número de *Streptococcus mutans* en placa in vitro. Dichos hallazgos sugieren que *Theobroma Cacao* contiene fitoquímicos que contribuyen a controlar la formación de placa dental y posterior desarrollo de caries dental en seres humanos.

II. ANTECEDENTES

Desde el siglo XIX hasta el siglo XX, el cacao evolucionó de una bebida a sus variedades placenteras actuales como fondant, gianduja, chocolate blanco y lechoso, ganando mucho impulso en la industria obteniendo gran impacto como objeto romántico y forma de arte. Los compuestos químicos más importantes del chocolate son los flavonoides (antioxidantes), polifenoles, la manteca de cacao, la cafeína, la teobromina y la feniletilamina, mientras que la presencia de sustancias psicoactivas explica sus efectos placenteros. La cafeína, la teofilina y la teobromina constituyen las metilxantinas, importantes en la transmisión de señales intracelulares (Ellam y Williamson, 2013).

También, se observa que el chocolate tiene efectos antiinflamatorios, neuroprotectores y cardioprotectores. Mejora la biodisponibilidad del óxido nítrico, cuya acción regula la presión, la función plaquetaria y la fluidez de la sangre (Lippi, 2013).

En Ecuador los *Kichuas* de Sucumbíos y Orellana emplean *Theobroma Cacao* para tratar tumoraciones de la piel. Los pobladores elaboran una resina de la cáscara del cacao y lo aplican como cicatrizante para las heridas, mientras que las semillas son usadas para tratar la anemia, reumatismo, hemorragias, quemaduras y la fiebre; en cuanto a odontología, cabe mencionar que una alimentación rica en cacao ayuda en el tratamiento de la enfermedad periodontal puesto que reduce el estrés oxidativo. Todas estas propiedades se dan debido a la presencia de polifenoles como catequinas (Balslev et al., 2008; Sánchez y Rubio, 2010).

Los polifenoles contenidos en la cáscara de cacao también están presentes en otras plantas como las uvas, té verde y granos de café, y son los responsables del color de la semilla. A la familia de los polifenoles pertenecen diversos tipos de moléculas como: las epicatequinas, catequinas, antocianidinas, proantocianidinas, ácidos fenólicos, taninos, otros flavonoides o algunos compuestos menores. Porcentualmente, las epicatequinas son el principal componente fenólico de las semillas de cacao, con el 35 % (Arlorio, 2005; Gotti, 2006).

La historia del uso medicinal del chocolate se remonta a la tradición mesoamericana en donde el cacao, como bebida, era una sustancia muy valiosa y, por lo tanto, estaba reservada para sacerdotes, altos funcionarios del gobierno, oficiales militares y grandes guerreros, y se suponía que no era adecuado para mujeres y niños (Wickramasuriya y Dunwell, 2018).

Una fuente primaria sobre el uso étnico médico del cacao en México es el manuscrito *Badanius* (1552), su autor M. de la Cruz, fue un maestro mexicano en el Colegio de Santa Cruz, fundado por los españoles alrededor de 1536 en la Ciudad de México: el manuscrito presenta conceptos y tratamientos de la enfermedad mexicana, subrayando una clara prevalencia del uso de los derivados del cacao como nutrientes o remedios para la angina, el estreñimiento, los problemas dentales relacionados con el sarro, disentería, dispepsia, indigestión, fatiga, gota y las hemorroides (Afanador, 2011).

A lo largo de la historia como hemos mencionado, el cacao se ha utilizado para tratar una amplia variedad de dolencias, y en los últimos años, múltiples estudios han encontrado que el cacao puede tener efectos positivos para la salud, proporcionando evidencia de un uso establecido durante siglos; este reconocimiento, sin embargo, no tuvo un curso directo, habiendo estado involucrado en controversias religiosas, médicas y culturales. La cristiandad europea, de hecho, temía los efectos estimulantes de las nuevas bebidas, como el chocolate, el café y el té. Por lo tanto, estas bebidas habrían sido desterradas, si médicos y científicos no hubieran explicado que eran buenas para el cuerpo. El debate científico, que alcanzó su apogeo en Florencia en el siglo XVIII, consideró la efectividad terapéutica de los diversos componentes del cacao: primero era necesario conocer sus propiedades, para preparar el mejor brebaje de cacao para cada paciente. Sin embargo, cuando la nutrición, como disciplina, se separó de la medicina, el chocolate adquirió el papel de vehículo para facilitar la administración de medicamentos amargos, y se asoció a diferentes problemas de salud (Ellam y Williamson, 2013).

Comenzó un nuevo capítulo en la historia del chocolate para uso terapéutico, destinado a mantener principalmente su papel de excipiente, para

enmascarar el sabor amargo de los medicamentos: bajo el nombre de *chocolate saludable*, una amplia gama de mezclas de medicamentos usaba la nomenclatura del chocolate o del cacao para ayudar a promover sus ventas, y se producían líneas completas de productos médicos con sabor a chocolate. El siglo XIX experimentó, por lo tanto, un gran aumento en la fabricación de grandes cantidades de chocolate, pero, al mismo tiempo, mientras se pedía a los fabricantes que garantizaran la calidad de sus productos, la ansiedad creció sobre los químicos y rellenos no saludables que, cuando se mezclaron durante la producción, prevaleció sobre los beneficios médicos naturales del chocolate (Wilson, 1999).

Se desarrollaron recetas alternativas, sustituyendo el cacao con otros ingredientes de menor calidad y costo, sin embargo, ofrecían el mismo aspecto. Un ejemplo fue el trabajo del doctor Saverio Manetti que, en 1765, imprimió un libro donde sugería estrategias muy económicas para hacer frente a una recesión debido a la mala cosecha: las personas que no podían comprar cacao podían usar harina tostada, leche, azúcar y yemas de huevo, para obtener una bebida, que al menos parecía chocolate (Wickramasuriya y Dunwell, 2018).

La adición de leche a los abetos de chocolate se produjo a finales del siglo XVII, pero la preparación basada en leche condensada en polvo por evaporación comenzó en 1867, cambiando por completo el sabor del chocolate. Dado el aumento de los productos de chocolate con leche, también fue la pureza del azúcar y la leche lo que se investigó, ya que el chocolate excesivamente procesado contiene azúcares añadidos y ácidos grasos saturados, que compensan los beneficios para la salud del cacao. Por un lado, el chocolate con leche se había convertido en una especie de alimento altamente nutritivo, pero, por otro lado, el azúcar y la leche habían allanado el camino a una percepción negativa del chocolate en sí mismo. Durante el siglo XX, el chocolate fue satanizado como un alimento rico en grasas y calorías, soportando la carga, a lo largo del tiempo, de una valencia negativa, generando controversia en la literatura médica y no médica, en la que se asoció a la obesidad, problemas dentales y régimen de vida poco saludable (Ooshima et al., 2000).

En los últimos años se han realizado estudios como el realizado por María J. Mariani et al. (2010) donde tuvo como principal hallazgo demostrar que el extracto

de semilla de cacao posee efecto bacteriostático sobre el crecimiento de la cepa pura de *Streptococcus mutans* cultivada *in vitro* utilizando un medio sólido. Dicha acción inhibitoria se evidenció mediante la presencia de halos de inhibición y la variación en sus diámetros bajo la influencia de distintas concentraciones de cacao.

Del mismo modo, en un estudio realizado en ratas infectadas con *Streptococcus sobrinus*, cuyo grupo control fue alimentado a base de chocolate blanco con 35% de sacarosa y el grupo tratado con extracto de polvo de cacao (EPC), se halló una reducción significativa en los índices de caries de este último grupo, debido a que el EPC inhibió la síntesis *in vitro* de glucanos insolubles en agua a través de su acción antiglicosiltransferasa sobre el *Streptococcus sobrinus* con relación a la presencia de halos de inhibición, los datos obtenidos a través de la prueba Chi cuadrada afirmaron la hipótesis planteada, que existe un importante efecto en la inhibición del crecimiento del *Streptococcus mutans* por parte del cacao. En cuanto a la presencia de halos de inhibición del crecimiento bacteriano, la concentración más adecuada fue ubicada entre 10% y 12.5%. Por encima de estas concentraciones, el efecto bacteriostático del cacao (Ito et al., 2003).

En un estudio comparativo *in vivo* realizado en la India, se elaboró un extracto etanólico de la cáscara de cacao y fue comparado con el enjuague bucal de clorhexidina al 0.2%, se aplicó en pacientes, a los que se evaluó de manera semanal, mensual y bimestral. Se encontró que el extracto de cáscara de cacao presentó un efecto muy similar al producido por el enjuague de clorhexidina, en la capacidad para disminuir la formación de colonias de *Streptococcus mutans* en la placa dental de los pacientes (Babu, 2011).

Un estudio que realizaron Ooshima et al. en el año 2000, evaluaron el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de cuatro derivados del cacao (manteca de cacao, cacao en polvo, chocolate sin azúcar y chocolate con azúcar), sobre el *Streptococcus mutans*, empleando la técnica Kirby-Bauer, se encontró un efecto antimicrobiano de todos los extractos.

Por su cuenta en un estudio realizado en el laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, se obtuvieron los extractos acuosos de

cacao, al igual que se realizaron los cultivos de las cepas de *Streptococcus mutans*. La muestra empleada estuvo constituida por 20 Cajas Petri inoculadas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 no contaminadas. Se demostró que tanto la cáscara como la semilla de cacao presentaron efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*, sin influencia de la concentración, los resultados encontrados en este estudio coinciden con otros estudios in vitro realizados por otros investigadores (Mora et al., 2016).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

En la actualidad, el uso de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades constituye un desafío en la medicina y en la odontología. El reto es el descubrimiento o síntesis de sustancias capaces de inhibir o disminuir la aparición, persistencia y recurrencia de bacterias patógenas con influencia negativa en los tejidos de la cavidad bucal (Lee et al., 2004; Palombo, 2011).

La caries dental al ser una enfermedad multifactorial que representa por su gran incidencia y a los altos costos que implica su tratamiento un problema de salud pública global y nacional, pertenece al listado “negro” de las principales enfermedades que padece la población en la actualidad, compartiendo lugar con hipertensión, obesidad y diabetes (Nalina y Rahim, 2007). A pesar del esfuerzo y trabajo que se lleva a cabo por profesionales de la salud, gobierno e instituciones públicas por erradicar y mantener una cultura preventiva con la salud bucal, los esfuerzos parecen ser en vano ya que los resultados son otros, según la OMS el porcentaje de escolares que presentan procesos cariosos va de 60% a 90% (Biswas et al., 2002).

Existe interacción de tres factores principales para la formación de caries dental: el *huésped* (higiene bucal, la saliva y los dientes), la *microflora* (infecciones bacterianas) y el *sustrato* (dieta cariogénica). Además de estos factores, deberá tenerse en cuenta uno más, el *tiempo*. Para que se forme una caries es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables; es decir, un huésped susceptible, una flora oral cariogénica y un sustrato apropiado que deberá estar presente durante un período determinado de tiempo (Núñez y Bacallao, 2010).

Actualmente se dice que la formación de caries dental no sólo es propiciada por la triada de tiempo, sustrato y huésped, sino por los múltiples factores que pueden afectar los procesos de desmineralización y re mineralización incluyendo flora bacteriana, hábitos de higiene alimentaria y oral, composición de la saliva, velocidad de flujo y capacidad de amortiguación del pH, características posicionales y morfológicas de los dientes, exposiciones al flúor y factores socioeconómicos., incluido el acceso del cuidado a la salud bucal (Escribano et al., 2005; Núñez 2010).

La genética del huésped puede influir en muchos de estos factores, lo que conduce a una variación interindividual en la susceptibilidad a la caries. De hecho, estudios previos han demostrado que la caries dental es altamente hereditaria, con un 20-65% de variación. El consenso actual es que la genética de la caries dental puede ser realmente compleja, afectada no solo por variantes genéticas, sino también por importantes interacciones entre factores genéticos y no genéticos que pueden cambiar a lo largo de la vida. Junto con ellos y factores de riesgo ambientales, el sexo también afecta la susceptibilidad a la caries, con estudios epidemiológicos que generalmente muestran que las mujeres tienen mayor riesgo y tienen un mayor número de superficies dentales afectadas que los hombres (Gutiérrez et al., 2013).

A partir de la interacción de estas entidades, se explica la caries como consecuencia de los ácidos producidos por bacterias bucales presentes en la placa, siendo una de las más comunes el *Streptococcus mutans* la cual ha sido relacionada con el inicio y progresión de la caries, debido a su capacidad para producir ácido láctico partiendo de la sacarosa y glucanos, por medio de la acción de la enzima glucosiltransferasa, pudiendo metabolizar estos compuestos con más rapidez que cualquier otro microorganismo de la cavidad oral (Nalina y Rahim, 2007; Vázquez et al., 2007).

En el siglo XVIII, se demostró que los microorganismos viven no solo en una forma de célula única, sino que también son capaces de formar grupos suspendidos en una sustancia extracelular mucilaginosa. La patogenicidad de ciertas especies microbianas como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Legionella pneumophila* o *Pseudomonas aeruginosa* está asociada inseparablemente a su capacidad de formar biopelículas en superficies sólidas, por ejemplo, tejidos, catéteres o implantes. Esta característica permite a los microorganismos formar estructuras tridimensionales en las que las células se vuelven más resistentes a los antibióticos y condiciones ambientales variables, a través de cambios que ocurren como resultado de interacciones inter-bacterianas y la presencia de una matriz de exopolisacáridos protegiendo toda la estructura (Jurczak et al., 2013).

La salud bucodental es fundamental para gozar de una buena calidad de vida por lo que sigue siendo un área de investigación importante y motivo para seguir en la búsqueda del beneficio de nuestra comunidad. Ha sido muy difícil para los

sistemas de salud lograr planes estratégicos que erradiquen la enfermedad, razón por la cual es necesaria la búsqueda de alternativas que contribuyan con la disminución de la incidencia y consecuencias que ese padecimiento acarrea (Hidalgo et al., 2008).

No es novedad que la medicina botánica ha estado presente a lo largo de nuestra vida ya que es la base de la medicina que actualmente conocemos. Retomar la cultura médica de nuestros antepasados, que fue exitosa en su momento, con la finalidad de sustentar con mayor fuerza la medicina moderna es la oportunidad perfecta de conocer y encontrar beneficios para el bienestar de la población y de las futuras generaciones ya que a pesar de la evolución que ha existido en la medicina es la evolución de la medicina alternativa la que ha tomado un fuerte impulso, cada vez es más el interés de la población y del profesional de la salud por encontrar el equilibrio en cuanto a salud compete (Caballero y Cortés, 2001).

Históricamente y con mayor auge en la actualidad, se ha observado una tendencia hacia la investigación sobre el uso de sustancias de origen natural en diversas áreas de odontología, dirigidas a la inhibición de la glucosiltransferasa, la adhesión celular y el crecimiento celular, estrategias mediante las cuales los agentes antimicrobianos evitan la formación de placa y logran prevenir la caries y enfermedades periodontales. Tal planteamiento, ha sido reafirmado estableciendo que el extracto de cáscara de semilla de cacao disminuye la producción de ácidos y síntesis de glucanos por parte de *Streptococcus mutans* (Padilla et al., 2008), por lo tanto, puede inferirse que este producto posee cualidades bacteriostáticas sobre el crecimiento de bacterias cariogénicas.

Al hablar del efecto bacteriostático nos referimos a la capacidad que tiene la sustancia de dificultar la reproducción bacteriana, en este caso la semilla de cacao.

Una sustancia bacteriostática no produce la muerte celular de las bacterias, pero al dificultar o impedir su reproducción la cepa bacteriana envejece y desaparece (Jackson et al., 1998).

El posible efecto protector del cacao en la caries dental está recibiendo cada vez más atención, pero previas publicaciones y datos sobre los efectos anticariogénicos de los componentes del chocolate causan polémica (Maydata, 2002).

El cacao *Theobroma cacao* L, (nombre científico que recibe el árbol del cacao o cacaotero, planta de hoja perenne de la familia Malvaceae) un fruto tropical, cultivado por primera vez por los mayas, se originó hace 5000 años en la Alta Amazonía. La teoría indica que esta especie silvestre fue transportada en tiempos prehispánicos por los antiguos pobladores hacia Mesoamérica donde aparentemente inicia su uso en rituales. La palabra *cacao* tiene un origen milenario, y se remonta a los lenguajes de la familia *mixezoque* que hablaban los olmecas antiguos, quienes fueron los primeros en cultivar dicha planta en Mesoamérica (Tamayo, 2007). En maya yucateco, “*Kaj*” significa amargo y “*Kab*” significa jugo. Alternativamente, algunos lingüistas proponen la teoría de que con el paso del tiempo sufrió varias transformaciones fonéticas que dieron paso a la palabra “*cacaoatl*”, la cual evolucionó después a “*cacao*” (Morales, 2017).

Este se considera como materia prima para la elaboración de chocolates y para las industrias farmacéutica y cosmética. Es también la principal fuente de ingresos para unos 6 millones de pequeños productores en todo el mundo y los medios de subsistencia de más de 40 millones de personas dependen del cacao (Shapiro y Rosenquist, 2004).

El chocolate se procesa desde la vaina o cacos de la planta de cacao, cultivada en el cinturón tropical. La bebida temprana de chocolate, considerada una "bebida de los dioses" (*Theobroma*), se mezcló con canela y pimienta, con un sabor amargo y fuerte, y fue muy apreciada por sus efectos vigorizantes y estimulantes que por su sabor. Importada de las Américas, la versión suavizada pronto se extendió en Europa (Lippi, 2013).

IV. HIPÓTESIS

- **Hipótesis de trabajo**

El extracto de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L*) tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *Streptococcus mutans in vitro*.

- **Hipótesis nula**

El extracto de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L*) no tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *Streptococcus mutans in vitro*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Determinar si el extracto de cáscara de Cacao (*Theobroma cacao L*) tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans*.

V.2 Objetivos específicos

- Medir el halo de inhibición que causa el extracto de cáscara de cacao crudo en cultivos en monocapa de *Streptococcus mutans*.
- Medir el halo de inhibición que causa el extracto de cáscara de cacao tostado en cultivos en monocapa de *Streptococcus mutans*.
- Medir el halo de inhibición que causa el extracto de semilla de cacao crudo en cultivos en monocapa de *Streptococcus mutans*.
- Medir el halo de inhibición que causa el extracto de semilla de cacao tostado en cultivos en monocapa de *Streptococcus mutans*.
- Comparar los resultados obtenidos de las pruebas *in vitro* entre los diferentes tipos de extractos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Tipo de investigación

Experimental *in vitro*

VI.2 Muestra

40 placas de cultivo inoculadas por *Streptococcus mutans*. Para la primera prueba, se utilizaron 20 cajas; 14 para la segunda prueba; y finalmente, 6 cajas para la tercera prueba. En cada placa se realizaron 6 pruebas utilizando discos de 6 mm de diámetro. En 3 de ellos se colocaron 3 tipos diferentes de extractos, además, la pasta dental Theodent Kids, un control negativo (agua inyectable), y un control positivo (clorhexidina al 2%).

El número de muestra se ha determinado tomando en cuenta las últimas investigaciones en el tema (Orihuela, 2016).

VI.3 Criterios de selección

Placas Petri inoculadas con monocapas de *Streptococcus mutans*.

Criterios de eliminación

Placas Petri que presentaron contaminación o rupturas en el gel antes o durante el proceso.

VI.3.1 Variables estudiadas

Variable Dependiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Efecto inhibitorio. Se medirá realizando pruebas de difusión en agar y midiendo los halos de inhibición.	Halo de inhibición. Es la zona alrededor de un disco de antibiótico que inhibe y detiene el crecimiento bacteriano.	Medida del diámetro del halo de inhibición a las 24 horas.	Cuantitativa	Continua	Milímetros

Variable Independiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Extracto de cáscara de cacao crudo	Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima (cáscara de cacao crudo) a menudo usando un solvente como etanol o agua.	Colocar el extracto en loseta de vidrio para mezclar y homogenizar.	Cuantitativa	Continua	Gramos Litros
Extracto de semilla de cacao crudo	Sustancia obtenida por extracción de una parte de	Colocar el extracto en loseta de vidrio	Cuantitativa	Continua	Gramos Litros

	una materia prima (semilla de cacao crudo) a menudo usando un solvente como etanol o agua.	para mezclar y homogenizar.			
Extracto de cáscara de cacao tostado	Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima (cáscara de cacao tostado) a menudo usando un solvente como etanol o agua.	Colocar el extracto en loseta de vidrio para mezclar y homogenizar.	Cuantitativa	Continua	Gramos Litros
Pasta dental Theodent kids	Pasta dental con teobromina como ingrediente activo del compuesto llamado <i>Rennou</i> .	Colocar en una loseta de vidrio pasta dental para embeber disco.	Cuantitativa	Continua	Gramos

VI.3.2 Técnicas e instrumentos

Se incubaron las cajas Petri con cultivos de *Streptococcus mutans* en agar TYS20B, con los 6 discos. Tres discos embebidos con los 3 extractos, extracto de cáscara de cacao crudo, extracto de cáscara de cacao tostada, extracto de semilla de cacao crudo. Un disco embebido con pasta dental a base de cacao de la marca Theodent kids. Un cuarto disco con clorhexidina al 2% y el control negativo; agua inyectable.

A las 24 horas se tomaron fotografías de las cajas Petri para poder realizar la medición de los halos de inhibición con el programa ImageJ. Las mediciones fueron recopiladas en una base de datos de Excel.

VI.4 Procedimientos

Preparación de Agar TYS20B

Para obtener 10 cajas:

1. Se pesaron 10 gramos de Agar TRYS20B, 2.5 gramos de extracto de levadura, 50 gramos de sucrosa, en una báscula analítica. Se colocaron en un matraz Erlen Meyer de 500 mL.
2. Se midieron 250 mililitros de agua destilada y se agregó al matraz donde se encontraba el agar y el resto de los polvos.
3. Se agitó y se dejó reposar 15 minutos.
4. Se calentó hasta obtener su punto de ebullición con agitación constante para disolverlo completamente por un minuto.
5. Se esterilizó la solución en autoclave a 121 °C (15lbs de presión) durante 15 minutos.
6. Se dejó enfriar la solución y se añadió en un medio estéril 61 μ L de Bacitracina.
7. Se vació el medio en cajas Petri estériles (en un área estéril), hasta que solidificaron.
8. Se colocó una de las cajas en incubadora y las demás se almacenaron en refrigerador hasta el uso de éstas.

Preparación de Agar BHI

Para obtener 10 cajas:

1. Se disolvieron 15.1g del polvo de infusión Cerebro Corazón y 6.45g de agar en 430 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
2. Se calentó con agitación frecuente y se llevó a ebullición hasta su disolución total.

3. Se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121 °C.
4. Se distribuyó en placas de cultivo estériles.

Preparación de extractos

Material vegetal

Para la presente tesis, tres presentaciones de frutos de *Theobroma cacao* se obtuvieron de un proveedor oaxaqueño. Cacao crudo (1kg), cacao tostado (1kg, pasta al natural* (1kg).

Pasta* realizada a base de semilla de cacao el cual es secado, tostado, descascarillado, molido y envasado.

1. Los extractos se separaron a partir de la cáscara y de las semillas tanto crudas como tostadas.
2. Se molió en molino pulverizador eléctrico de cuchillas, la materia prima tanto semilla como cáscara hasta obtener un polvo fino (Figura 1a).
3. De cáscara tostada se colocaron 90 gramos de polvo en un frasco de vidrio ámbar con 500mL de metanol y 500mL de agua desionizada.
4. De semilla tostada se colocaron 400 gramos de polvo en 4 litros de etanol absoluto en un frasco de vidrio ámbar.
5. De semilla cruda se colocaron 400 gramos de polvo en 4 litros de etanol absoluto en un frasco de vidrio ámbar.
6. De cáscara cruda se colocaron 100 gramos de polvo en 1 litro de etanol absoluto en un frasco de vidrio ámbar.
7. Cada uno de los recipientes pasó por el proceso de sonicación (Branson 5510, Danbury, CT) por 15 min para hidratar la muestra, sin permitir que el material aumentará su temperatura (Figura 1b).
8. Cada muestra se filtró en un embudo de papel filtro (poro mediano y poro fino) acoplado a un matraz Kitasato (Figura 1c y 1d, e).

9. Para finalizar los extractos se concentraron con la ayuda de un roto evaporador (BUCHI R-200, Flawil, Switzerland) hasta dejarlos libres de solvente a 60° (Figura 1c y 1d, e).
10. Se colocó el extracto dentro de un recipiente de menor tamaño para su almacenaje (4 °C) (Figura 1f).

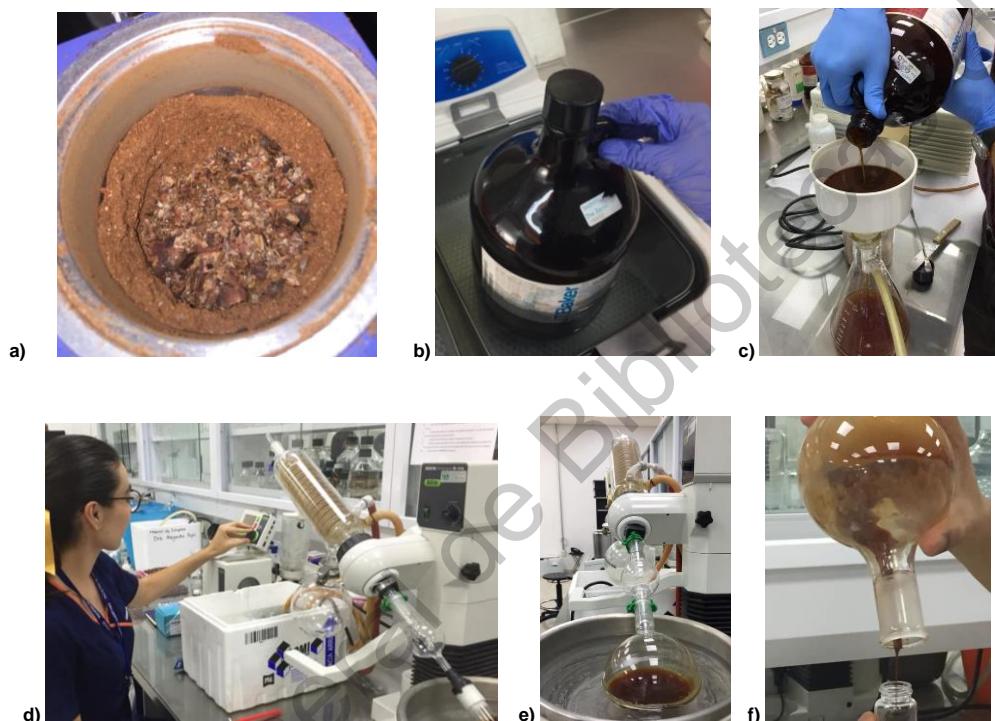


Figura 1 Proceso de preparación de extractos.

11. El primer extracto en realizarse fue el de la cáscara de cacao tostado, el cual al pasar por el proceso mencionado se dejó por 15 min bajo luz ultravioleta dentro de campana de bioseguridad y se esterilizó por medio de filtración (Figura 2). Obteniendo 3 mL de extracto líquido con coloración amarillenta.



Figura 2 Proceso de esterilización por filtración en campana de bioseguridad.

Técnica de siembra de cepas

Fase I: Reactivación y siembra de cepas.

Objetivo: Evaluar el efecto inhibitorio no sólo en la cepa estudiada si no en 6 bacterias más del extracto de semilla de cacao tostado.

1. Se colocaron 30 µl del tubo de ensayo que contenía la cepa del laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria de la facultad de medicina de la UAQ en un tubo de ensayo con infusión cerebro corazón.
2. Una vez gelificado el agar cerebro corazón y agar TYS20B en las placas Petri, con 2 mecheros de bunsen encendidos, se inició la siembra de las cepas a estudiar.
3. Se sumergió un hisopo en el tubo de cultivo líquido con *Streptococcus mutans* y se colocó el inculo en la caja con agar TYS20B, distribuyéndolo uniformemente sobre toda la superficie de la placa para lograr el crecimiento en monocapa. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las bacterias a estudiar; *Enterococcus faecalis*, *Micococcus ssp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona fluorescens*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, con la diferencia de que éstas últimas fueron colocadas en placas Petri con agar BHI.
4. En cada placa se colocaron 5 discos, (previamente estériles y con un diámetro de 6mm) los cuales contenían dilución seriada del extracto de cáscara de cacao tostado más el control positivo (clorhexidina al 2%). Las placas se dejaron en la incubadora a una temperatura de 37°C por 24 horas (Figura 3).

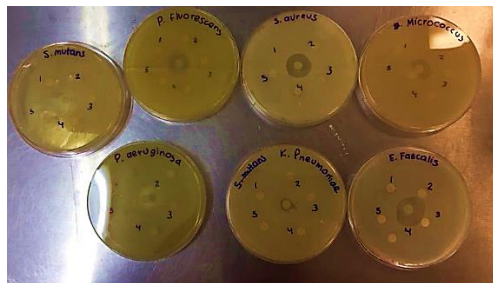


Figura 3 Primera prueba de extracto de cáscara de cacao tostado

Fase II:

1. Teniendo gelificado el agar cerebro corazón y agar TYS20B realizamos con una segunda fase pero ahora incluyendo la dilución seriada del extracto de semilla de cacao tostada, control positivo (clorhexidina al 2%), extracto filtrado y cacao en pasta, teniendo un total de 5 discos por placa (Figura 4).
2. La siembra se realizó bajo un campo estéril, por medio de dos mecheros de bunsen encendidos.
3. Se cerraron las placas y se colocaron dentro de la incubadora a 37 °C de temperatura por 24 horas. Después de este tiempo se tomaron fotografías para poder evaluar los resultados.

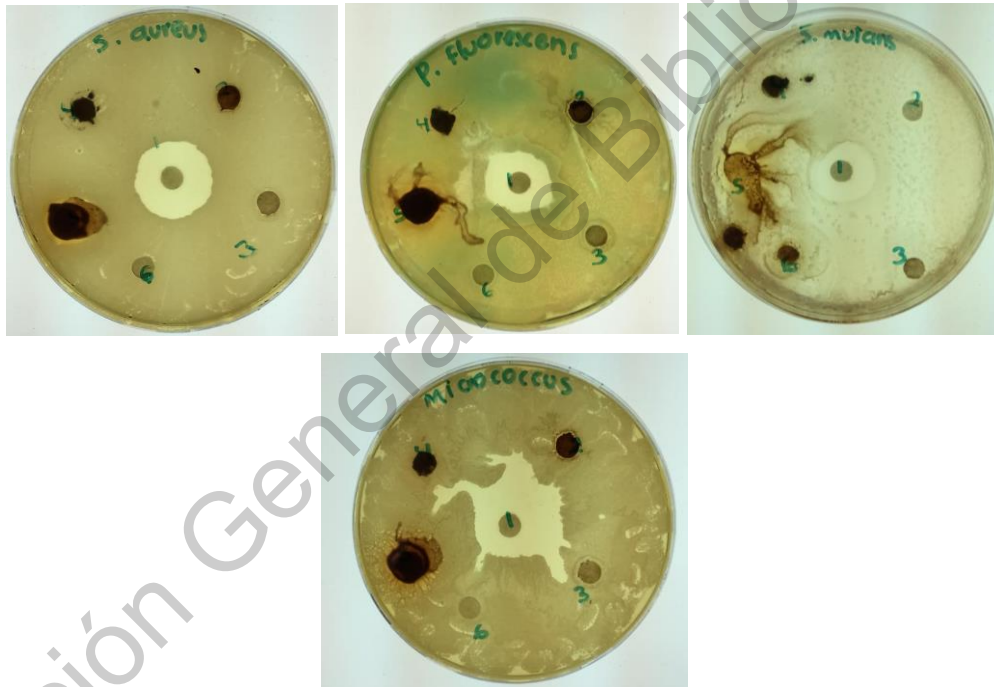


Figura 4 Ejemplos de caja Petri con cepa de *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus mutans*, *Mycrococcus* y extracto de cáscara de cacao tostado y cacao en pasta.

Fase III: Preparación de extractos de semilla de cacao tostado, semilla y cáscara de cacao crudo.

Objetivo: Complementar y descartar que tipo de extracto es el que presenta mejores resultados.

1. Se preparó agar TYS20B para 6 placas Petri, en las cuales se inoculó *Streptococcus mutans* siguiendo el protocolo que desde la fase I se ha llevado a cabo. Utilizando los dos mecheros bunsen para delimitar el área estéril.
2. Se impregnaron 3 discos con el resto de los extractos: extracto de semilla de cacao crudo, cáscara de cacao crudo y semilla de cacao tostada.
Durante la etapa de recopilación de información sobre las propiedades del cacao y específicamente de sus extractos, encontramos un producto de venta en Estados Unidos de América y Canadá. Específicamente se trató de una pasta dental a base de cacao, conocida con el nombre comercial de *Theodent Kids*. La cual está formulada por una mezcla de minerales y de un ingrediente patentado por la empresa, el Rennon, un extracto obtenido a partir de la semilla del cacao.
3. Por tratarse de un dentífrico a base de cacao se decidió incluir la evaluación de *Theodent kids* en el estudio. Por tal motivo, el cuarto disco fue impregnado de esta pasta dental (Figura 6).
4. Los dos discos restantes se colocaron como control negativo (agua inyectable) y control positivo (clorhexidina al 2%). Se cerraron las placas y se incubaron por 24 horas a 37°C (Figura 5).

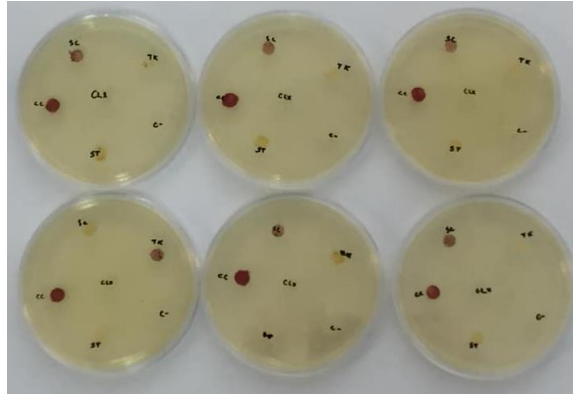


Figura 5. Tercera prueba con el resto de los extractos en placas con cepas de *Streptococcus mutans*, previas a ser incubadas por 24 horas.



Figura 6. Pasta dental Theodent kids, formulada a base de extracto de cacao.

Medición de halos de inhibición

Posterior a la incubación por 24 horas de las placas con sus respectivos discos se procedió a tomar evidencia fotográfica de los resultados. Dichas fotografías se analizaron por computadora con el programa ImageJ (Ilustración 7). Posteriormente se recolectaron los datos obtenidos en una hoja de Excel.

Como parte del protocolo las placas utilizadas se sometieron a un ciclo de esterilización en autoclave 121 °C por 15 min para su inactivación y posterior desecho.

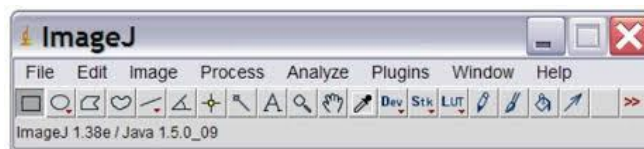


Figura 7. Programa ImageJ

VI.5.1 Análisis estadístico

Se analizaron los datos de desviación estándar y rango. Con la prueba Kolmogorov-Smirnov verificamos que las variables seguían una distribución normal, los datos se sometieron a la prueba ANOVA y Turkey. Obteniendo como diferencia estadísticamente significativa $p < 0.0001$.

Posterior a ello se realizó la prueba Post Hoc de Turkey.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

VII. RESULTADOS

En la fase I y II los resultados no fueron significativos con ninguna de las 7 bacterias utilizadas con el extracto de cáscara de cacao tostado.

En la fase III al utilizar los 3 extractos restantes; cáscara de cacao cruda, semilla de cacao cruda y semilla de cacao tostado, se obtuvieron resultados significativos. Específicamente en los diámetros de los halos de inhibición del extracto de cáscara de cacao cruda, los cuales son mayores que los diámetros de semilla cruda, semilla tostada y pasta dental TK.

En la tabla 1 se muestran las medidas en mm del halo de inhibición de los 3 extractos (cáscara cruda, semilla cruda, semilla tostada) y de la pasta dental Theodent kids (TK). Además, se muestran los valores promedio y la desviación estándar correspondiente al tamaño de los halos.

Tabla 1

Medidas en milímetros de halo de inhibición de extractos de cacao en cultivo de Streptococcus mutans.

Cáscara cruda	Semilla Cruda	Semilla tostada	Pasta dental TK	Control +	Control -	Valor de P
N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N= 6	<0.0001
15.14±2.6 (11.78-19.41)	7.5±0.49 (7.26-8.2)	8.8±2.8 (4.8-12.22)	8.02±2.07 (4.95-10.75)	136.71±4.99 (15.07-29.22)	0	

Estos resultados confirman un importante efecto de inhibición del extracto de cáscara de cacao crudo sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* (Figura 8).

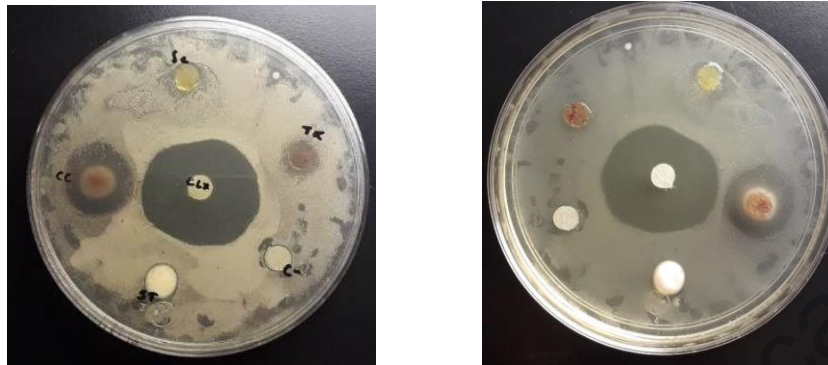


Figura 8. Efecto inhibitorio medido en mm por medio de halos de inhibición

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VIII.DISCUSIÓN

En los últimos diez años la producción de productos orgánicos en México registró un crecimiento de 33,587 productores a 169,570. La venta de productos orgánicos anual ha crecido un 20% principalmente en tiendas de autoservicios, según datos de la Asociación Impulso Orgánico Mexicano.

Existe una tendencia creciente por el consumo de productos saludables principalmente los que presentan características como estar libres de azúcar, de conservadores y de saborizantes (Quality Assurance and Food Safety, 2018).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico (Sepulveda, 2003). Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana o con actividad antioxidante (Croteau et al., 2000).

Los polifenoles son producidos en el metabolismo secundario de las plantas y juegan un papel importante en los procesos de maduración, mecanismos de defensa del organismo y otorga los efectos organolépticos característicos de los productos alimenticios derivados de las plantas (Verma, 2013).

Son varias las plantas que han sido investigadas en detalle para analizar su efectividad para el control de la placa dentobacteriana. Sin embargo, aunque muchos compuestos de productos naturales tienen esa capacidad, sólo un número restringido de éstos están disponibles para aplicación clínica, debido a su efectividad, color, sabor, estabilidad y viabilidad económica (Masaura S, 1996).

Theobroma cacao L es el nombre científico que recibe el árbol de cacao, planta de hoja perenne de la familia *Malvaceae*. *Theobroma* significa en griego “alimento de los dioses”; cacao deriva del nahua “cacáhua”. Es particularmente rico en polifenoles que representan entre el 12 y 18% del peso seco de los granos, y se encuentran fuertemente asociados con la actividad antioxidante (Latif, 2013).

Los flavonoides del cacao y el chocolate son compuestos que son esenciales para la salud humana, como lo demuestra su influencia en una serie de conclusiones relacionadas con sus funciones bioquímicas y fisiológicas en el cuerpo, identificándose con los potentes efectos antioxidantes en condiciones *in vitro* e *in vivo* después de su consumo. Estas propiedades antioxidantes se han relacionado con un aumento en las concentraciones de epicatequina en el plasma, la relajación vascular endotelio- dependiente promovido por los flavonoides del cacao, en parte debido a la mayor biodisponibilidad de óxido nítrico y la prostaciclina y las propiedades anti ateroscleróticas del óxido nítrico en combinación con un cambio favorable hacia la vasodilatación y de conferir además un efecto vasculo - protector. Se puede detectar una disminución en la presión arterial después del efecto de corto plazo en el consumo de cacao en la presencia de una leve hipertensión sistólica.

Otros efectos conocidos de los flavonoides del cacao incluyen un efecto supresor sobre la reactividad plaquetaria y la hemostasia primaria relacionados con las plaquetas, la modulación de la función inmune y la inflamación como posibles efectos cardioprotectores. Por último, algunos efectos afrodisíacos, cambios de estado de ánimo y de sensibilidad se han reportado debido a los compuestos de feniletilamina y de la Nacylethanolamina, presentes en el cacao y chocolate.

Enfermedades del sistema nervioso, como el Alzheimer y el Parkinson, se originan por el desencadenamiento de estrés oxidativo incontrolado en las células neuronales y gliales. Ocurre lo mismo con la Diabetes Mellitus tipo 2 y las cataratas.

Por ello, el consumo de antioxidantes de origen natural como el cacao, constituye hoy día una sana recomendación para las personas de todas las edades, particularmente las adultas y ancianas.

En la época prehispánica los Mayas utilizaban el cacao para tratar “enfermedades de las encías”. La acidez producida por las bacterias presentes en la placa dentobacteriana es contrarrestada por la presencia de teobromina, además de que ayuda a disminuir la sensibilidad dental.

El principal hallazgo de este estudio demuestra que el extracto de cáscara de cacao crudo inhibe el crecimiento de cepa de *Streptococcus mutans* cultivado *in vitro* en medio sólido.

Dichos resultados coinciden con investigaciones previas, sin embargo, dichas coincidencias están relacionadas con las propiedades del cacao (Mariani et al. ,2010). Es decir, confirman que el efecto inhibitorio, pero no es precisamente por las propiedades presentes en la semilla, si no de la cáscara cruda. Dicha acción inhibitoria se evidenció por la presencia de halos de inhibición y la variación en sus diámetros todo ello con la influencia de distintos tipos de extractos de cacao (diferente materia prima).

De la misma manera que se han encontrado hallazgos en un estudio realizado en ratas infectadas con *Streptococcus sobrinus*, cuyo grupo control fue alimentado a base de chocolate blanco con 35% de sacarosa y el grupo tratado con extracto de polvo de cacao (EPC), se halló una reducción significativa en los índices de caries de este último grupo, debido a que el EPC inhibió la síntesis *in vitro* de glucanos insolubles en agua a través de su acción antiglicosiltransferasa sobre el *Streptococcus sobrinus* (Ooshima,2000).

Se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de cacao, tanto de la cáscara como de la semilla, sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, en un estudio realizado *in vitro*. Dicho efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cáscara y semilla de cacao fue comprobado tras la medición de los halos de inhibición de hasta 10 mm, se apreció que el extracto acuoso de semilla al 12.5% presentó mayor efecto antimicrobiano con un halo promedio de 8.50 mm, seguido del extracto acuoso de cáscara al 20% con un halo promedio de 8.30 mm, el extracto acuoso de semilla al 20% con un halo promedio de 8.20 mm y el mínimo halo promedio de 8.15 mm correspondiente al extracto acuoso de cáscara al 12.5% (Sucuzhañay, 2015). En comparación con nuestros resultados los 10 microlitros que colocamos en cada uno de los discos fue una medida constante para poder evaluar en mm cada extracto teniendo como rango 11.48-19.41mm en el extracto de cáscara de cacao crudo.

Se realizó una evaluación comparativa de la eficacia del enjuague bucal a base de clorhexidina con enjuague bucal de extracto de cáscara de cacao en niños. Los resultados indican que hubo una reducción significativa en los recuentos de *Streptococcus mutans* en saliva en todos los intervalos de seguimiento para ambos

grupos de enjuagues. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la reducción de los recuentos de *Streptococcus mutans* (Venkatesh et al., 2011).

Hubo una reducción en los recuentos del 22.4% que fue similar al estudio realizado por Srikanth et al., (2008) donde hubo una reducción del 20.9% en los recuentos de *Streptococcus mutans* en la saliva cuando se usa el enjuague bucal en niños.

Finalmente, como resultado del estudio realizado con extracto de la semilla de cacao se observó que redujo significativamente la adherencia de los *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita recubierta de saliva, la formación de la placa dental artificial por *Streptococcus mutans* y el número de *Streptococcus mutans* en placa *in vitro*. El extracto inhibió significativamente los depósitos de placa en las superficies de los dientes en 19 de 28 sujetos cuando se utilizó enjuague bucal (Matsumoto, et al., 2004).

A pesar de tener ciertas limitaciones para realizar el presente estudio, se observó que el extracto etánolico de cáscara de cacao crudo presentó mejores características bioactivas en la actividad antiglucosiltransferasa, se relacionó dicha actividad con la presencia de polifenoles. Sin embargo, se sugiere continuar con estudios para comprobar si dichos compuestos son los responsables de la actividad inhibitoria del *Streptococcus mutans*.

IX CONCLUSIONES

Existe relación de nuestros resultados con las investigaciones citadas, sin embargo, los resultados de los mencionados estudios no especifican en su mayoría las características de la materia prima con la cual realizaron los extractos. Nuestras pruebas abarcaron 4 extractos etanólicos los cuales estaban realizados a base de cáscara y semilla cruda y dos más, de cáscara y semilla tostada, de los cuales el único extracto que arrojó resultados significativos fue el de cáscara cruda, descartando por igual a la pasta de cacao.

X. PROPUESTAS

El uso del extracto de cacao de semilla cruda es una alternativa al alcance de la población que busque la disminución de uno de los problemas de mayor impacto en la sociedad a nivel de salud pública como es la caries dental, es clave para el beneficio de esta. Al ser la cáscara de cacao cruda el principal medio de inhibición del *Streptococcus mutans* se podrán desarrollar proyectos para realizar productos como colutorios, golosinas, chicles y/o pastas dentales como principal ingrediente el material de desecho, la cáscara cruda.

Si bien en nuestro estudio se analizó la pasta dental *Theodent kids* sin encontrar resultados significativos, los resultados positivos de la cáscara cruda abren una línea de investigación importante para poder desarrollar medidas preventivas con un recurso que en su mayoría es desechado al procesarlo.

Hacer uso del cacao no sólo se beneficiará el área de salud, sino que además el medio ambiente y la economía se verán fuertemente beneficiados. El cultivo de cacao nos ofrece ventajas como promover la reforestación productiva y una alternativa económica porque generaría ingresos permanentes y se podría vender con mayor valor, como producto especial, en el mercado internacional. Además, se protegen las plantas contra radiación solar, se obtienen ingresos económicos extras desde el periodo de crecimiento de las plantaciones, al utilizar cultivos como plátano como sombra temporal. Se mantiene un microclima casi constante, favorable a la plantación. Permite reciclar los desechos de madera y entre otros más evita transformar los bosques a cultivos. Es un ganar- ganar donde se obtendrá beneficios socioeconómicos.

Además de lo propuesto se sugiere continuar con estudios para evaluar cual de los componentes de la cáscara de cacao crudo es el que produce el efecto inhibitorio.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Afanador. 2011. Nombrar y representar: escritura y naturaleza en el código de la Cruz-Badiano, 1552. *Fronteras de la Historia* 16 (1): 13–41. Agrícola Nacional. 2017.
- Balslev., Henrik., Navarrete H., De Torre L., and Macía M. 2008. Introducción, 1–3.
- Biswas., Kausik., Chattopadhyay I., Banerjee R., and Bandyopadhyay U. 2002.
- Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (Azadirachta Indica). *Current Science-Bangalore-* 82 (11): 1336–45.
- Caballero., Cortés L. 2001. Percepción, Uso y Manejo Tradicional de Los Recursos Vegetales En México. *Plantas, Cultura y Sociedad. Estudio Sobre La Relación Entre Seres Humanos y Plantas En Los Albores Del Siglo XXI.* Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y Secretaría Del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México, DF, México, 79–100.
- Ccahuana-Vasquez., Renzo A., Soléo Ferreira dos Santos S., Yumi Koga-Ito C., and Cardoso A. 2007. Antimicrobial Activity of Uncaria Tomentosa against Oral Human Pathogens. *Brazilian Oral Research* 21 (1): 46–50.
- Núñez D, Bacallao L. 2010. Bioquímica de La Caries Dental. *Revista Habana Ciencia Médica* 9.
- Ellam, S., & Williamson, G. 2013. Cocoa and human health. *Annual Review of Nutrition*, 33, 105-128.
- Escribano., Matesanz M.P., and Bascones A. 2005. Pasado, Presente y Futuro de La Microbiología de La Periodontitis. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral* 17 (2): 79–87.
- Prieto S., García D., Santacoloma S., and Mejía J.P. 2013. Caries Dental: ¿Influyen la genética y la epigenética en su etiología? Revisión de La Literatura. *Universitas Odontológica* 32 (69).

- Hidalgo I., Riverón J., and Quiñones J.A. 2008. La Caries Dental: Algunos de Los Factores Relacionados Con Su Formación En Niños. Revista Cubana de Estomatología 45 (1): 0.
- Hurst W.J., Tarka S.M., Powis T.G., Valdez F., and Hester T.R. 2002. Archaeology: Cacao Usage by the Earliest Maya Civilization. Nature 418 (6895): 289–90.
- Ito., Kyoko., Nakamura Y., Tokunaga T., Iijima D., and Fukushima K. 2003. Anti- Cariogenic Properties of a Water-Soluble Extract from Cacao. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 67 (12): 2567–73.
- Jackson., Cordiés L., Machado L., and Hamilton M. L. 1998. Principios Generales de La Terapéutica Antimicrobiana. Acta Médica 8 (1): 13–27.
- Jurczak., Bystrowska A.B., and Skalniak A. 2013. The Virulence of Streptococcus mutans and the Ability to Form Biofilms.
- Lee., Sean S., Zhang W. U., and Li Y. 2004. The Antimicrobial Potential of 14 Natural Herbal Dentifrices: Results of an in Vitro Diffusion Method Study. The Journal of the American Dental Association 135 (8): 1133–41.
- Lippi., Donatella. 2013. Chocolate in History: Food, Medicine, Medi-Food, 1573–84. Maydata., Buenaventura A. 2002. Chocolate, Polifenoles y Protección a La Salud.
- Gutiérrez A. 2002. Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salud.
- Morales J.M. 2017. Propuesta de Diseño de Proceso Industrial Para La Elaboración de Té de Cascarilla de Cacao En La Provincia de Santa Elena. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Nalina., and Rahim Z. H.A. 2007. The Crude Aqueous Extract of Piper Betle L. and Its Antibacterial Effect towards Streptococcus Mutans. Am J Biotechnol Biochem 3 (1): 10–15.
- Núñez., García D.P., and Bacallao L., 2010. Bioquímica de La Caries Dental.
- Sucuzhaña M., Mora P., and Velasco. 2016. Efecto Antimicrobiano de Extractos Acuósos de Cáscara y Semillas de Cacao (Theobroma Cacao) Sobre Cepa de Streptococcus Mutans : Estudio in Vitro Antimicrobial Effect of

Cocoa Peels Aqueous Extracts and Cocoa Seeds (Theobroma Cacao) In A Streptococcus 19: 35–41.

- Ooshima T., Osaka Y., Sasaki H., Osawa K., Yasuda H., Matsumura M., et al. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in- vitro and animal experiments. Arch Oral Biol. 2000; 45(8): 639-45. n.d.
- Padilla F. C., Rincón A.M., and Bou-Rached L. 2008. Contenido de Polifenoles y Actividad Antioxidante de Varias Semillas y Nueces. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 58 (3): 303–8.
- Palombo., Enzo A. 2011. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011.
- Sánchez I., and Rubio A. 2010. Atención farmacéutica en la enfermedad periodontal (y II).” Offarm 29 (y II): 62–67.
- Shapiro H.Y., and Rosenquist E.M. 2004. Public/Private Partnerships in Agroforestry: The Example of Working Together to Improve Cocoa Sustainability. Agroforestry Systems 61 (1–3): 453–62.
- Valenzuela A. 2007. El Chocolate, Un Placer Saludable. Revista Chilena de Nutrición 34 (3): 180–90.
- Wickramasuriya., Anushka M, and Dunwell. 2018. Cacao Biotechnology : Current Status and Future Prospects, 4–17.
- Wilson P., Hurst J. 2012. A Quest Over the Centuries.
- Zapata S., Tamayo A. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013; 18(3): 391-464. n.

XII. ANEXOS

XII.1 Hoja de recolección

Placa	E. Cáscara cruda	E. semilla cruda	E. Cáscara tostada	E. cáscara tostada	Pasta dental	Control +	Control -
1							
2							
3							
4							
5							
6							
Promedio							
Desviación Estándar							

XII.2 Instrumentos

1. Cajas Petri (Senna®, 60 x 15, producto previamente estéril)
2. Agar TYS20B
3. Levadura
4. Sucrosa
5. Bacitracina
6. Clorhexidina al 0.12%
7. Cacao crudo y tostado
8. Pasta de cacao
9. Pasta dental Theodent kids Estados Unidos de América.
10. Agua inyectable
11. Matraz Erlenmeyer
12. Hisopos estériles
13. Agua destilada
14. Etanol
15. Espátula
16. Loseta de vidrio
17. Guantes
18. Cubrebocas
19. Lentes de protección
20. Pipeta
21. Papel filtro
22. Plumón indeleble
23. Báscula analítica
24. Incubadora
25. Auto clave

26. Cepas inoculadas de *Streptococcus mutans*
27. Asa bacteriológica
28. Mechero
29. Mortero y pistilo de vidrio
30. Cuchara dosificadora
31. Campos estériles
32. Bata de algodón
33. Gasas
34. Sonicador (Branson 5510, Danbury, CT)
35. Metanol
36. Matraz Kitasato
37. Embudo
38. Hielera
39. Mangueras
40. Roto evaporador (BUCHI R-200, Flawil, Switzerland)
41. Matraz de bola
42. Hielo

Dirección General de Bibliotecas UAQ