

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Odontología

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA  
DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN  
MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON  
CARIES DE PACIENTES QUE ACUDEN AL CENTRO DE  
SALUD CIUDAD NUEVA. TACNA 2018

TESIS

Presentada por:

Bach. Eder Cristian Poma Choque

Para optar el Título Profesional de:

**CIRUJANO DENTISTA**

TACNA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Odontología

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES EN MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS  
DE PIEZAS DENTALES CON CARIES DE PACIENTES  
QUE ACUDEN AL CENTRO DE SALUD  
CIUDAD NUEVA. TACNA 2018

TESIS

Presentado por:

**BACH. EDER CRISTIAN POMA CHOQUE**

Para optar el Título Profesional de:


**CIRUJANO DENTISTA**

Aprobado por \_\_\_\_\_, ante el siguiente jurado:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alejandro Aldana Cáceres  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
C.D. Milton Saúl Flor Rodríguez  
Miembro

  
\_\_\_\_\_  
C.D. Roysi Factor Velez Toala  
Miembro

  
\_\_\_\_\_  
C.D. Edgardo Javier Berrios Quina  
Asesor

## *DEDICATORIA*

*A Dios, quien me ha dado la fuerza necesaria para no rendirme en el camino que elegí y me ayudado en los momentos más difíciles de la universidad.*

*A mis padres Silverio y Elsa quienes con sus consejos y apoyo incondicional me han enseñado a nunca rendirme en los desafíos que la vida me da día a día.*

*A mis hermanas Katherine y Crinn quienes me han apoyado, aconsejado y soportado a lo largo de mi carrera universitaria.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al microbiólogo Edwin A. Obando, por su apoyo académico, compromiso y sus acertadas interpretaciones en cada uno de los procedimientos microbiológicos que se realizaron durante esta investigación.*

*A la Mgr. Yemilé Del Carmen Berríos Espejo (Esc. Farmacia y Bioquímica, UNJBG), por compartir sus conocimientos en la asesoría de la preparación del extracto etanólico de cáscara de cacao, al inicio de la investigación.*

## CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Fundamentos y formulación del problema .....	3
1.1.1. Descripción del problema .....	3
1.1.2. Formulación de problema .....	6
1.2. Objetivos .....	6
1.2.1. Objetivo general .....	6
1.2.2. Objetivos específicos .....	6
1.3. Justificación .....	8
1.4. Operacionalización de variables .....	10

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación.....	11
2.1.1. Antecedentes internacionales .....	11
2.1.2. Antecedentes nacionales .....	22
2.2. Bases teórico científicas .....	25
2.2.1. Caries dental .....	25
2.2.1.1. Microbiología de la caries dental .....	25
2.2.1.2. Principales microorganismos de la caries dental....	26
2.2.1.3. Microorganismos en caries de esmalte .....	30
2.2.1.4. Microorganismos en caries de raíz.....	33
2.2.1.5. Microorganismos en caries de la dentina .....	34
2.2.1.6. ICDAS.....	37
2.2.2. <i>Theobroma cacao</i> L.....	42
2.2.2.1. Taxonomía y nomenclatura .....	42
2.2.2.2. Reseña histórica.....	43
2.2.2.3. Cultivo del cacao .....	44
2.2.2.4. Variedades de cacao.....	45

2.2.2.5. Distribución de grupos genéticos en el Perú.....	49
2.2.2.6. Derivados de la semilla de cacao .....	49
2.2.2.7. Cáscara de cacao.....	50
2.2.2.8. Polifenoles.....	53

### **CAPÍTULO III**

#### **METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN**

3.1. El tipo de diseño de la investigación .....	57
3.2. Ámbito de estudio .....	57
3.3. Población .....	58
3.4. Técnica e instrumento de recolección de datos .....	59
3.5. Procedimiento de recolección de datos .....	60
3.6. Plan de procesamiento y análisis de datos .....	66

### **CAPÍTULO IV**

#### **DE LOS RESULTADOS**

4.1. Resultados:.....	67
4.2. Discusión .....	82

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>99</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°01:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 5 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	68
TABLA N°02:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 10 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	70
TABLA N°03:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 15 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	72
TABLA N°04:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 20 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	74
TABLA N°05:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 25 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	76
TABLA N°06:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 30 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	78
TABLA N°07:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a las siguientes concentraciones: 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml.	80

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°01:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 5 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	69
GRÁFICO N°02:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 10 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	71
GRÁFICO N°03:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 15 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	73
GRÁFICO N°04:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 20 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	75
GRÁFICO N°05:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 25 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	77
GRÁFICO N°06:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 30 mg/ml sobre muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.	79
GRÁFICO N°07:	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao a las siguientes concentraciones al 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml.	81

## RESUMEN

El trabajo tuvo como **Objetivo:** Determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al Centro de Salud Ciudad Nueva de Tacna en el año 2018. **Metodología:** El diseño de la investigación es descriptivo, de corte transversal. En donde se tomaron 12 muestras microbiológicas de piezas dentales con caries, en donde se aplicó el extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones; con un patrón de crecimiento microbiano de 0,5 de la escala de Mac Farland, mediante el método de Kirby Bauer y según la escala de Duraffourd Lapraz se determinó el efecto antimicrobiano. **Resultados:** Se observó halos de inhibición en las siguientes concentraciones: 5mg/ml = 9,4mm; 10mg/ml = 11,4mm; 15mg/ml = 16,6mm; 20mg/ml = 19,6mm; 25mg/ml = 20,2mm; 30mg/ml = 22,7mm. **Conclusión:** Se concluye que el extracto etanólico de cáscara de cacao a diferentes concentraciones presenta efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de las bacterias presentes en la caries dental.

**PALABRAS CLAVE:** Efecto antimicrobiano, cáscara de cacao, caries dental, Kirby Bauer, escala de Duraffourd.

## ABSTRACT

The **Objective** of the work was to: Determine the antimicrobial effect of the ethanolic extract of cocoa husk (*Theobroma cacao* L.) at different concentrations in microbiological samples of tooth pieces with caries of patients who come to the Ciudad Nueva Health Center in Tacna in 2018

**Methodology:** The design of the research is descriptive, cross-sectional. In which 12 microbiological samples of dental pieces with caries were taken, where the ethanolic extract of cocoa husk (*Theobroma cacao* L.) was applied at different concentrations; with a microbial growth pattern of 0.5 on the Mac Farland scale, the Kirby Bauer method and the Duraffourd Lapraz scale determined the antimicrobial effect. **Results:** Inhibition halos were observed in the following concentrations: 5mg / ml = 9,4mm; 10mg / ml = 11,4mm; 15mg / ml = 16,6mm; 20mg / ml = 19,6mm; 25mg / ml = 20,2mm; 30mg / ml = 22,7mm. **Conclusion:** It is concluded that the ethanolic extract of cocoa peel at different concentrations has an antimicrobial effect on the growth of bacteria present in dental caries.

**KEYWORDS:** Antimicrobial effect, Cocoa peel, Dental caries, Kirby Bauer, Duraffourd scale.

## INTRODUCCIÓN

La caries dental sigue siendo la enfermedad bucal más prevalente en nuestro país, se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos dentarios. La causa principal que influye en la prevalencia de la caries dental es la presencia de microorganismos cariogénicos en la saliva y en la placa dental. Donde también existes otros factores que actúan frenando o aumentando la aparición de la caries, entre los que podemos señalar: flujo, composición y capacidad buffer de la saliva, higiene buco-dental y la dieta rica en carbohidratos. Dentro de las estrategias para disminuir y controlar la afección, se recurre a derivados de productos naturales, usados como medicina casera, que tienen efectos medicinales gracias a sus compuestos bioactivos que actúan como antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos.

En los últimos años la medicina natural ha ganado un lugar relevante en la terapéutica de múltiples enfermedades. 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; a su vez se han determinado beneficios en la salud bucal. El posible efecto antimicrobiano de la cascara de cacao en la caries dental está recibiendo

cada vez más atención, el cual podría radicar en la rica cantidad de polifenoles.

Según las consideraciones anteriores, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao en muestras microbiológicas obtenidas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al Centro de Salud Ciudad Nueva de Tacna. Mediante el método de Kirby Bauer en 12 muestras. En donde se midió el diámetro del halo de inhibición para verificar el efecto antimicrobiano según la escala de Duraffourd.

En el capítulo I plantea la descripción del problema, los objetivos, así como la justificación para realizar la tesis. En el capítulo II observaremos los antecedentes que respaldan la ejecución de nuestro estudio. En el capítulo III se observa lo relacionado con la metodología aplicada y los procedimientos para la recolección de muestras. Finalmente en el capítulo IV se presentan los resultados y discusión seguidos por las conclusiones, recomendaciones finales y las referencias bibliográficas de la investigación.

## **CAPÍTULO I**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1. FUNDAMENTOS Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

##### **1.1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

La caries dental constituye la enfermedad bucal más común del hombre actual, la OMS considera que del 60% al 90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo. La manifestación de la caries dental está mediada por mecanismos complejos que son iniciados por diversos factores, entre los que se incluyen genéticos, conductuales, ambientales y microbianos. En el caso de los factores microbianos, la presencia de bacterias es fundamental para el inicio, desarrollo y progresión de la lesión cariogénica, sin bacterias no hay lesión. De hecho se trata de una enfermedad infecciosa polimicrobiana donde cada especie bacteriana individual puede contribuir colectivamente a la cariogenicidad por ello es importante entender el rol que juegan especies bacterianas específicas en la progresión de la caries dental.<sup>44</sup>

Como parte de los retos de la odontología en la actualidad, está la búsqueda de sustancias capaces de inhibir o disminuir la población microbiana cariogénica presente en el inicio de esta enfermedad. 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.

Actualmente el uso de antimicrobianos y antisépticos, se ha utilizado conjuntamente con las técnicas de cepillado, a fin de evitar o retrasar la formación de lesiones cariosas, sin embargo el elevado precio y reacciones secundarias las cuales son que tiñen los dientes, la lengua, alteran el gusto y causan reacciones de hipersensibilidad, es lo que persuade a las personas a no utilizarlos por mucho tiempo.<sup>17</sup> Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar otros antisépticos y antimicrobianos no costosos y de fácil uso.

Siendo la cáscara de cacao un residuo de una planta natural que posee grandes propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antimutagénicas como lo demuestran: Flores col.<sup>11</sup> En su estudio "*Efectividad del Theobroma cacao L.*

*sobre el desarrollo del biofilm dental”* demostraron que la solución de la cáscara de cacao inhibe significativamente la formación de biofilm.<sup>11</sup>

Suczhañay Mora.<sup>12</sup> En su estudio in vitro *“Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (Theobroma cacao L.)*. Demostró que los extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao presentan igual efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*.<sup>12</sup>

Los estudios de la cáscara de cacao como fuente de medicina natural que evidencian actividad antimicrobiana sobre los microorganismos presentes en la caries dental,<sup>2,6,14,15,16,18,20</sup> y el aumento de la prevalencia de la caries dental en pacientes jóvenes evidenciados en los reportes epidemiológicos a nivel nacional en el Perú del MINSA,<sup>19</sup> genera mi interés de comprobar los beneficios del extracto etanólico de la cáscara de cacao ante los microorganismos presentes en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries.

### **1.1.2. FORMULACIÓN DE PROBLEMA**

¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al centro de salud Ciudad Nueva. Tacna 2018?

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al centro de salud Ciudad Nueva. Tacna 2018.

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el efecto antimicrobiano, según la escala de Duraffourd del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 5 mg/ml.

- Determinar el efecto antimicrobiano, según la escala de Duraffourd del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 10 mg/ml.
- Determinar el efecto antimicrobiano, según la escala de Duraffourd del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 15 mg/ml.
- Determinar el efecto antimicrobiano, según la escala de Duraffourd del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 20 mg/ml.
- Determinar el efecto antimicrobiano, según la escala de Duraffourd del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 25 mg/ml.
- Determinar el efecto antimicrobiano, según la escala de Duraffourd del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 30 mg/ml.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

La investigación es **original** debido a que existen escasos estudios relacionados a este tema, la mayoría de investigaciones encontradas toman en consideración otros factores relacionados al inicio de la caries dental; sin embargo, existe un vacío en el conocimiento científico respecto al efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al Centro de Salud Ciudad Nueva. Tacna 2018.

Al ser éste uno de los países con mayor producción de cacao en América Latina, teniendo una importante diversidad genética de este fruto, nace mi interés de evaluar su posible aporte al ámbito odontológico con esta investigación, contribuyendo como una alternativa más en la prevención de la caries dental.

Este trabajo es **factible** de realizarse, porque se cuenta con los recursos humanos y materiales adecuados, asumiendo el investigador el costo total de esta.

Nuestro trabajo tiene **relevancia científica** ya que los resultados obtenidos contribuirán, consolidarán o desvirtuarán los resultados de las anteriores investigaciones sobre el efecto antimicrobiano que contiene el extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L).

Nuestro trabajo, tendrá **relevancia académica**; porque los resultados de esta investigación servirán como base de datos a hacer utilizados por los estudiantes que se encuentran en formación y por la población en general.

Igualmente tendrá **relevancia social**, porque permitirá implementar mejores medidas de prevención y promoción de la salud bucal y minimizar los efectos de la caries dental, y así como beneficiar a la población peruana y mejorar su condición de vida.

## 1.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	SUB INDICADORES	CATEGORIZACIÓN	ESCALA
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES	Conjunto de compuestos que tienen la capacidad de eliminar o reducir la proliferación de microbios. Los microbios atacados por un antimicrobiano pueden ser bacterias, virus, hongos o parásitos.	Efecto antimicrobiano del extracto etanólico cáscara de cacao al 5 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición (Según la escala de Duraffourd)	Resistente (-) = < 8 mm	Razón
				Sensible (+) = 8mm a 14mm	
				Muy sensible (++) = 14 mm a 20 mm	
				Sumamente sensible (+++) = > 20 mm	
		Efecto antimicrobiano del extracto etanólico cáscara de cacao al 10 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición (Según la escala de Duraffourd)	Resistente (-) = < 8 mm	Razón
				Sensible (+) = 8mm a 14mm	
				Muy sensible (++) = 14 mm a 20 mm	
				Sumamente sensible (+++) = > 20 mm	
		Efecto antimicrobiano del extracto etanólico cáscara de cacao al 15 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición (Según la escala de Duraffourd)	Resistente (-) = < 8 mm	Razón
				Sensible (+) = 8mm a 14mm	
				Muy sensible (++) = 14 mm a 20 mm	
				Sumamente sensible (+++) = > 20 mm	
		Efecto antimicrobiano del extracto etanólico cáscara de cacao al 20 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición (Según la escala de Duraffourd)	Resistente (-) = < 8 mm	Razón
				Sensible (+) = 8mm a 14mm	
				Muy sensible (++) = 14 mm a 20 mm	
				Sumamente sensible (+++) = > 20 mm	
		Efecto antimicrobiano del extracto etanólico cáscara de cacao al 25 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición (Según la escala de Duraffourd)	Resistente (-) = < 8 mm	Razón
				Sensible (+) = 8mm a 14mm	
				Muy sensible (++) = 14 mm a 20 mm	
				Sumamente sensible (+++) = > 20 mm	
Efecto antimicrobiano del extracto etanólico cáscara de cacao al 30 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición (Según la escala de Duraffourd)	Resistente (-) = < 8 mm	Razón		
		Sensible (+) = 8mm a 14mm			
		Muy sensible (++) = 14 mm a 20 mm			
		Sumamente sensible (+++) = > 20 mm			

Fuente: Elaboración propia

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

***FLORES-TAPIA, MARÍA Y COL. Efectividad del Theobroma cacao L. sobre el desarrollo del biofilm dental. (México – 2016)***

La adhesión microbiana se conoce desde hace muchos años e incluso se sabe que también, se adhiere a la superficie de los órganos dentales donde se le llama biofilm y cómo éste se vuelve patógeno, es el agente etiológico de dos de las alteraciones orales más prevalentes: la caries dental y la enfermedad periodontal. Uno de los retos de la odontología moderna es sintetizar sustancias capaces de inhibir la aparición, persistencia y recurrencia de agentes patógenos en los tejidos dentales. Objetivo: En el presente estudio cuasi-experimental de tipo comparativo se evalúa el efecto inhibitorio de la cáscara de semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre

el desarrollo del biofilm dental. Materiales y Métodos: se comparan dos tipos de concentraciones (12,5 % y 13 %), de la solución de *Theobroma cacao* L, extraído de la cáscara de cacao, estas concentraciones son obtenidas destilando 240g de polvo y agua destilada. La muestra de participantes fue dividida en tres grupos: un grupo control y dos experimentales, al grupo I, se aplica una concentración de 12,5 de *Theobroma cacao* L, mientras que, al grupo II se administra una concentración del 13 %, y finalmente el grupo control, que tiene ausencia de la aplicación de la solución de la cáscara de cacao; al término del experimento se evalúa las superficies vestibulares y linguales de toda la dentición, de acuerdo al índice de Quigley-Hein, que consta de seis niveles de pigmentación de biofilm, representados del 0 al 5. Resultados: la solución de cáscara de *Theobroma cacao* L. al 12,5 % es la más efectiva, con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y experimental ( $t=1,75$ ,  $gl=28$ ,  $p<0,05$ ). Conclusiones: la solución de la cáscara de cacao inhibe significativamente, la formación de biofilm. Recomendación. Se requiere investigar más, con muestras mayores para validar los presentes resultados.<sup>11</sup>

**MIRYAN ALEXANDRA SUCUZHAÑAY MORA. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre cepa de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro. (Ecuador – 2015)**

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, en un estudio in vitro. La obtención de los extractos acuosos se realizó por el método de reflujo, utilizando agua destilada como solvente, los extractos se concentraron al 12,5% y al 20%, para lo cual se empleó la fórmula de dilución, la cepa de *Streptococcus mutans* fue reactivada por 24 horas a 35 +/- 2°C, tras lo cual se procedió a sembrar un inóculo de la bacteria correspondiente a la escala 0,5Mc. Farland en 21 cajas Petri de Agar sangre, posteriormente se aplicó la técnica Kirby- Bauer en la que se colocaron los discos de papel filtro embebidos con 20 ul de los extractos, las cajas Petri fueron incubadas por 24 horas a 35 +/- 2 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se procedió a la medición de los halos de inhibición a las 24 horas, observándose un efecto antimicrobiano por la presencia de halos de inhibición de hasta 10 mm. Los resultados obtenidos fueron analizados con

la prueba estadística U de Mann Whitney con la que se concluyó que no existieron diferencias significativas entre la media del halo de inhibición del extracto acuoso de cáscara y de semilla al 12,5% ( $p=0,24$ ) y al 20% ( $p= 0,94$ ), por lo que estos dos compuestos presentan igual efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*.<sup>12</sup>

**CUÉLLAR, O. Y COL. Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L. (Colombia - 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  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . 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>16</sup>

**MARIANI, M. Y COL. Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* in vitro. (Venezuela - 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 utilizó el método de Kirby Bauer para este 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>2</sup>

***SRIKANTH, R.K Y COL. Efecto del extracto de cáscara de cacao sobre la acumulación de placa y el recuento de Streptococcus mutans. (Ecuador - 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. Metodología: 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 utilizó como enjuague bucal.<sup>13</sup>

***SMULLEN J Y COL. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against Streptococcus mutans. (Inglaterra - 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>19</sup>

***PERCIVAL RS. Y COL. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. (LOS ANGELES - 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 dímeros, 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 pre-tratamiento 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>4</sup>

**KYOUNG, K. Y COL. *Extracción y fraccionamiento de inhibidores de glucosiltransferasa (GTF) a partir de la cáscara del grano de cacao. (2014)***

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 el método de Folin Ciocalteu, 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 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>48</sup>

***OOSHIMA, T. Y COL. Caries inhibitory activity of cacao vean husk extract in – vitro and animal experiments. (Japon - 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* y

*Streptococcus sobrinus* fue significativamente inhibida por el extracto de cáscara de grano de cacao. Lo cual revela que este extracto posee gran potencial anticariogénico. 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>16</sup>

#### **2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES**

***JOSUÉ BRAISSON ORIHUELA GUTIÉRREZ. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario. (Lima - 2016)***

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 expusieron 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.<sup>6</sup>

**ROSAS URBINA, MARCO ANTONIO. Efecto *in vitro* de 04 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans*. (Trujillo - 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 el método de Kirby Bauer para el 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 destilada como grupo control. Se llevaron a incubación a 37°C en anaerobiosis 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, por lo que se concluyó que los 04 derivados comerciales de cacao presentan efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*.<sup>17</sup>

## **2.2. BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS**

### **2.2.1. CARIES DENTAL**

#### **2.2.1.1. Microbiología de la caries dental**

La caries dental es desde hace muchos años, la enfermedad bucal de origen infeccioso que se observa con mayor frecuencia en nuestro país. Se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros del diente. Los factores principales que influyen en la prevalencia de caries dental son: presencia de microorganismos cariogénicos en saliva y placa dental, diente susceptible y sustrato adecuado. Existen otros factores que actúan frenando o aumentando la aparición de la caries, entre los que podemos señalar: flujo, composición y capacidad buffer de la saliva, higiene buco-dental, dieta rica en carbohidratos y presencia de fluoruros.

La etiopatogenia se asocia con la presencia de ciertos microorganismos. Los que con mayor frecuencia se relacionan con el inicio y desarrollo de la caries son:

*estreptococos* del grupo *mutans*, *Lactobacillus sp.* , y *Actinomyces sp.* , estos pueden ser aislados a partir de placa dental supra y subgingival y en saliva. Los microorganismos cariogénicos se caracterizan porque son capaces de trasportar hidratos de carbono en competencia con otros microorganismos, que pudiesen estar presentes en la placa, la capacidad de fermentación rápida de este sustrato conformado por azúcares y por su capacidad acidogénica y acidúrica capaces de realizar diversas funciones en condiciones de extrema acidez. El marcado descenso de pH, contribuirá con la desmineralización del diente, favoreciendo la aparición de lesiones cariosas en los tejidos duros: esmalte, dentina y cemento.<sup>43</sup>

#### **2.2.1.2. 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

Kliger (1915) y los *Streptococcus mutans* por Clarke (1924).

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 108 microorganismos.

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>23</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>1, 21</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>21</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>1, 21</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>21</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>1</sup>

#### **2.2.1.3. Microorganismos en caries de esmalte**

La caries más frecuente es la que se origina en la corona dentaria, rodeada totalmente por esmalte, por lo tanto, el inicio del proceso de la enfermedad se localiza fundamentalmente en esta tejido dental. La placa bacteriana no puede considerarse en principio como un elemento patógeno que siempre que esté presente desarrolla caries o enfermedad periodontal.

Todas las personas tienen placa y sin embargo no todas desarrollan enfermedad. La naturaleza infecciosa de la caries y concretamente el papel de los

*Streptococcus* del grupo *mutans*, se basa en el resultado de investigaciones fundamentalmente epidemiológicas. Está claro que, la caries en la corona, al menos en países industrializados aparece con los *Streptococcus mutans* y la presencia de sacarosa, existen también circunstancias específicas que pueden hacer que otras especies bacterianas adquieran papel protagónico en el inicio de la enfermedad. La localización de la lesión es un factor determinante.<sup>44</sup>

**Caries de Fosas y Fisuras:** La microbiología de esta colonización no es muy clara por la dificultad de tomar muestras en el fondo de una fisura, que constituye un sistema ecológico independiente donde las características anatómicas reducen la importancia de los mecanismos de adherencia en la colonización microbiana. Los experimentos realizados con animales han demostrado que son muchos los microorganismos involucrados en desarrollar lesiones cariosas, en el hombre fundamentalmente parece que los *Streptococcus* del grupo *mutans* y los *Lactobacillus* son los aislados en

gran número, mientras que los *S. sanguis* se reportan en niveles más bajos cuando la fisura está cariada, situación que se invierte cuando la fisura está libre de caries.<sup>20, 44</sup>

**Caries de las Superficies Proximales:** Su localización en la superficie proximal hace muy difícil la toma y el estudio para aislamiento de la microbiota implicada en la caries de ésta localización. Las especiales condiciones anatómicas, ocupadas casi totalmente por la papila interdientaria, dificultan el mecanismo de limpieza por el cepillado, esto permite creer que se propicia un ecosistema independiente que favorece la iniciación de la lesión en el esmalte. En las superficies proximales está presentes una gran variedad de microorganismos y el *S. mutans* representan menos del 10% del total de la microbiota cultivable anterior a la detección de la caries y su relación con la iniciación del proceso es menos evidente. Se ha reportado gran cantidad de *Actinomyces spp* en la placa proximal, a menudo dominando a los streptococos del grupo mutans, parece ser que estas bacterias pueden aumentar antes de la lesión cariosa,

pero también se han observado niveles moderados de mutans asociados a *Lactobacillus*, especialmente el *Lactobacillus casei*. También se han detectado en proporciones semejantes a *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* y *Actinomyces odontolyticus*.<sup>44</sup>

#### **2.2.1.4. Microorganismos en caries de raíz**

El cemento de la superficie radicular puede sufrir el proceso carioso. Aparece cuando se encuentra expuesto al medio oral. Es importante desde el punto de vista microbiológico resaltar que el componente orgánico del cemento es más parecido al de la dentina que al del esmalte, por lo que en la caries de la raíz podrían estar implicados no solo microorganismos acidófilos y acidógenos, sino también bacterias con actividad proteolítica como el *Capnocytophaga spp* y bacilos gram positivos como *Actinomyces viscosus* y en menor grado *A. naeslundii*. El *S. sanguis* también ha sido reportado como aislado en las superficies de lesiones cariosas radiculares, los *lactobacillus* no parecen estar directamente involucrados en el proceso.<sup>20, 44</sup>

#### **2.2.1.5. Microorganismos en caries de la dentina**

La dentina puede ser invadida por microorganismos, como resultado de una fractura o un traumatismo, o a través de un conducto lateral o accesorio en una bolsa periodontal, lo más frecuente es que la invasión se deba a profundización de una lesión cariosa de esmalte o cemento.

Cuando las bacterias invaden los túbulos dentinarios, las circunstancias ambientales cambian, en forma mayor cuando la lesión en esmalte es pequeña, pues el pH es menor debido a una mayor concentración de ácidos y se favorece el desarrollo de bacterias anaerobias pero también, y es un factor muy importante a tener en cuenta, el tejido dentinal tiene un mayor contenido de tejido orgánico que el esmalte, lo que favorece por factor de sustrato nutricional el crecimiento de bacterias proteolíticas. Sin embargo debe tenerse en cuenta factores que dificultan el estudio de la microbiota de la caries de dentina, tanto en el frente de avance de la lesión como en su profundidad, porque debe evitarse la

contaminación con bacterias orales o con las de la capa más superficial de la dentina destruida.

Por otro lado, la consistencia de la dentina cariada es relativamente dura y se hace necesaria una cucharilla metálica para recoger la muestra y todo esto dificulta la obtención de las bacterias anaerobias estrictas que pueden estar involucradas en el proceso.

De las muestras obtenidas en dentina cariada, los bacilos gram positivos son los predominantes en el avance de la lesión, especialmente el *Lactobacillus sp*, pero también se han reportado *Propionibacterium propionicus*, *Bifidobacterium ssp* y *Eubacteriu spp*. Los *Streptococcus* del grupo *mutans* no se aíslan regularmente. En una caries dentinal que se deja a su evolución, el contenido microbiano prolifera a través de los túbulos dentinarios hacia la pulpa continuando el proceso con el compromiso del complejo pulpo-dentinal.

La caries de la dentina produce una irritación del tejido pulpar, generándose una respuesta inflamatoria de ésta

última que va a depender de la calidad o severidad del estímulo. Ante la caries de avance lento, se producirá en primer término un proceso de esclerosis de los canalículos involucrados, esto como respuesta a una estimulación leve que induce a las prolongaciones odontoblásticas a sintetizar una dentina peritubular que termina por sellar los canalículos para establecer una barrera a la progresión de la lesión y la llegada a la pulpa de los agentes bacterianos y/o sus productos.

En resumen existen tres grandes eventos, dependientes del microorganismo, que en forma consecutiva conducen a la formación de caries: 1. Adhesión inicial de los microorganismos cariogénicos a la película adquirida; 2. Coagregación de los microorganismos para iniciar la producción de ácidos (degradación de los sustratos), que lleva a la desmineralización del diente; y 3. Progreso de la lesión cariosa.<sup>44</sup>

#### **2.2.1.6. Sistema internacional de valoración y detección de caries (ICDAS)**

En el 2004, un grupo de investigadores, epidemiólogos y odontólogos restaurativos se reunieron para encontrar diversas definiciones clínicas de caries dental. El grupo seleccionó un nuevo sistema basado en el trabajo de Ekstrand y col. e integrando las mejores características de otros sistemas.

Este nuevo sistema fue nombrado sistema internacional de valoración y detección de caries (ICDAS) y nace ante la necesidad de incluir criterios de evaluación del proceso de caries por niveles, especialmente, caries incipientes y no cavitadas.

El ICDAS detecta seis etapas del proceso carioso, desde cambios clínicos visibles de desmineralización hasta cavitaciones extensas. Se evalúa: la caries dental en oclusal, mesial, distal, palatino o lingual y vestibular; la pérdida o exodoncia por caries; y las restauraciones asociadas a caries incluyendo los sellantes.

### **Protocolo de examen**

Según ICDAS, los pasos del protocolo son los siguientes:

- Pedirle al paciente que retire cualquier aparato removible.
- Remover la placa de las superficies con un cepillo dental y una jeringa triple.
- Poner rollos de algodón en los carillos vestibulares.
- Aplique aire para remover exceso de saliva.
- Hacer examen visual de la superficie dental visto en húmedo.

Se comienza desde el cuadrante superior derecho y siguiendo las manecillas del reloj. También desde cada diente: mesial, oclusal, distal, vestibular y palatino/lingual.

- Aplique aire en la superficie por 5 segundos.
- Hacer inspección visual visto en seco, se puede usar un explorador de punta redonda pasándolo suavemente a lo largo de la superficie para confirmar pérdida de la integridad de la superficie.

### **Criterios de ICDAS para la detección de caries**

El proceso de detección de caries en las superficies dentales tiene dos códigos:

El primer código se caracteriza el tratamiento restaurador de la pieza dental como: sin restauración, sellantes, restauración amalgama o resina, corona protésica o dientes ausentes. Los códigos se describen en la siguiente tabla:

**Cuadro 1: Códigos de condición de superficies según el Sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries (ICDAS)**

<b>Código</b>	<b>Condición de superficie</b>	<b>Características</b>
0	No restaurado ni sellado.	Sellante que no cubre todas las fosas y surcos de la superficie del diente.
1	Sellado, parcial.	Sellante que no cubre todas las fosas y surcos de la superficie del diente.
2	Sellado, completo.	Sellante que cubre todas las fosas y surcos de la superficie del diente.
3	Restauración color diente.	Restauración con resina o ionómero restaurador.
4	Restauración en amalgama.	Restauración con amalgama.
5	Corona de acero inoxidable.	--
6	Corona o carilla en porcelana o metal – porcelana.	--
7	Restauración perdida o fracturada.	--
8	Restauración temporal.	--
9	Diente ausente.	Diente extraído por caries, perdido por otra razón.

El segundo código evalúa la condición de caries en una escala

Ordinal:

**Cuadro 2: Códigos de caries según el Sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries (ICDAS)**

<b>Código</b>	<b>Condición</b>	<b>Características</b>
0	Sano.	No evidencia de caries en húmedo o seco con aire por 5 segundos. Las pigmentaciones múltiples, por hábitos se consideran como 0. Los defectos de desarrollo del esmalte también sin signos de caries también se considera 0.
1	Cambio visible en esmalte- visto seco.	Primer cambio visible en el esmalte. Observando solo después de secado con aire por 5 segundos. Restringido a fosa y fisura. Pueden ser caries asociadas a restauraciones o sellantes.
2	Cambio detectable en esmalte.	Lesiones de caries observadas en húmedo o seco. Opacidad por caries (lesión de mancha blanca) o decoloración (mancha café) que es más ancha que la fisura o fosa natural. La lesión puede estar tocando el margen gingival o menos 1 mm de este.
3	Ruptura localizada del esmalte sin dentina visible.	En húmedo, lesiones opacas o decoloradas son aparentes y más amplias que las fosas y fisuras. En seco, existe pérdida por caries de la estructura dental, pero no dentina visible. Un explorador de punta deslizarle suavemente para confirmar la micro-cavitación.
4	Sombra oscura subyacente de dentina.	Sombra de dentina decolorada visible a través del esmalte intacto. Más notoria cuando la superficie está húmeda. La sombra puede ser gris, azul o café. Puede o no mostrar signos de ruptura localizada.
5	Cavidad detectable con dentina visible.	Cavitación debido a caries en esmalte opaco o decolorado exponiendo la dentina. Se extiende menos de la mitad de la superficie dental sin compromiso pulpar. Cuando está húmeda, se puede observar oscurecimiento de la dentina visible a través del esmalte y con más de 5 mm de ancho. Cuando está seca se puede observar fosa y fisura pérdida de estructura dental y desmineralización.
6	Cavidad detectable extensa con dentina visible.	Cavidad detectable con dentina visible, involucrando por lo menos la mitad de la superficie dental o la pulpa, pueden ser profundos y amplios. El reborde marginal puede no estar presente.

Para la codificación de dientes ausentes se registra de la siguiente manera:

**Cuadro 3: Códigos de dientes ausentes según el Sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries (ICDAS)**

<b>Código</b>	<b>Dientes ausentes</b>
9-7	Extraído por caries
9-8	Perdido por razones
9-9	No erupcionado

**Consideraciones especiales**

- Ignorar el hecho de que sea vital o no vital y registre la presencia de caries como lo haría para un diente vital.
- En el caso de dientes supernumerarios, registre el diente que ocupa el espacio legítimo.
- En el caso de dientes deciduos y permanentes en el mismo espacio, registre el diente que ocupa de manera legítima el espacio. Si el diente deciduo y el permanente ocupan el mismo espacio, registre el código del diente permanente.

- Las superficies restauradas como restauraciones de cubrimiento total deben ser codificadas como coronas.
- Si una superficie ha sido restaurada con cubrimiento parcial, las superficies involucradas deben ser registradas separadamente.<sup>45</sup>

## **2.2.2. THEOBROMA CACAO L.**

### **2.2.2.1. Taxonomía y nomenclatura**

La clasificación del cacao según Cronquist, es la siguiente (Chia J. 2009)<sup>41</sup>

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

El científico Carolus 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>25</sup>

#### **2.2.2.2. Reseña histórica**

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie originaria de los bosques tropicales de América del Sur cuyo centro de origen está localizado en la región comprendida entre las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo: tributarios del río Amazonas.<sup>27</sup>

Se ha señalado que el centro primario de diversidad del cacao se encontraría en la región nororiental del Perú (Krug & Quarter-Papafio, 1964); sin embargo, la existencia de poblaciones silvestres y nativas dispersas en la región central y sur de la Amazonía alta, apoyaría la hipótesis de que el lugar de origen incluiría la región centro y suroriental del Perú, las cuencas de los ríos Huallaga, Ucayali y Urubamba (García, 2000).<sup>28</sup>

### **2.2.2.3. Cultivo del cacao**

El árbol del cacao se cultiva en las regiones tropicales. Es comercialmente cultivada entre 15° al norte y 15° al sur de la línea ecuatorial. Sin embargo, se puede encontrar hasta las latitudes subtropicales entre 23°26' (límite del Trópico de Cáncer) al norte y 23°26' (límite del Trópico de Capricornio) al sur de la línea ecuatorial. El rango de temperatura promedio anual va de 23° a 30° C, siendo el óptimo de 25° C. Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 1 200 msnm, siendo el óptimo de 500 a 800 msnm. Asimismo, necesita humedad relativa anual promedio de entre el 70% y 80%.

El cultivo del cacao requiere estar libre de vientos fuertes persistentes a lo largo del ciclo productivo: es importante la prevención con árboles forestales como cortina rompe viento.

La luminosidad es variable dependiendo del ciclo productivo en el que se encuentre, siendo del 40% al 50% para el cultivo en crecimiento (menor de 4 años) y del 60 al 75% para plantación en producción (mayor de 4 años).<sup>46</sup>

#### 2.2.2.4. 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. Las semillas son generalmente grandes y gruesas, con cotiledones blancos o rosados.<sup>14, 41, 27</sup>

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>41</sup>



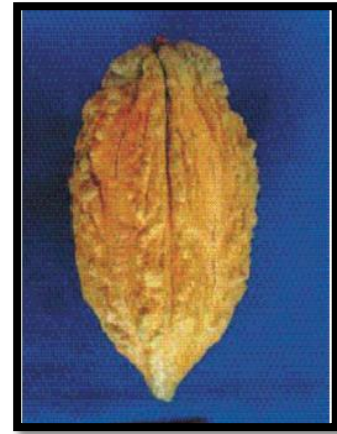
Fig. 1 Mazorca de cacao, variedad criollo<sup>46</sup>

- **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, 41</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).



(a)



(b)

Fig. 2 Mazorca de cacao, variedad forastero.<sup>46</sup>

(a) Del alto amazonas. (b) Del bajo amazonas

En los Forasteros del Alto Amazonas, pueden existir mazorcas con mayor rugosidad y constricción basal acentuada. 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 “Criollo”. Las almendras son generalmente pequeñas e intermedias; de color de

cotiledón morado y excepcionalmente, blanco como la variedad “Catongo” de Brasil.<sup>27</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. Se cultiva en México, Trinidad, Colombia, Venezuela.<sup>41</sup>

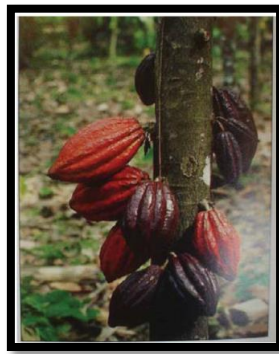


Fig. 3 Mazorca de cacao, variedad trinitario.<sup>46</sup>

#### **2.2.2.5. Distribución de grupos genéticos en el Perú**

En el caso peruano, también existen una serie de cultivares agrupados en grupos genéticos o germoplásmicos naturales y/o artificiales al que pertenecen los cultivares de cacao, están de acuerdo a la clasificación propuesta por Lachenaud, en 1997: <sup>46</sup>

- a. Criollo.
- b. Forastero del Alto Amazonas o Amazonas.
- c. Forastero del Bajo Amazonas o Guyanas.
- d. Nacional.

Un quinto grupo genético (artificial), corresponde a los cultivares Trinitarios.

#### **2.2.2.6. Derivados del 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, entre los cuales tenemos:<sup>14</sup>

- Licor de cacao
- Manteca de cacao
- Polvo de cacao
- Cáscara de cacao

#### **2.2.2.7. Cáscara de cacao**

En el proceso de industrialización del cacao se producen diversos residuos, entre los cuales se encuentra la cáscara de la mazorca, el mucílago y la cáscara del grano conocida también como cascarilla.

La cáscara es la corteza, de color oscuro, que cubre al grano de cacao y en la industria es separada de la semilla mediante la fricción de las almendras entre dos superficies o por el impacto contra una superficie. Es considerada como desecho debido a que no se le da ninguna aplicación en la industria chocolatera.



Fig. 4. Cáscara de cacao

Por cada 100 kg de producción de semillas de cacao el rendimiento que se tiene es de aproximadamente un 85%, lo cual quiere decir que el porcentaje restante es considerado como desecho. La cascarilla de cacao constituye aproximadamente el 12% de los desechos mencionados anteriormente.

#### ***A. Composición de la cáscara de cacao***

La cáscara de la semilla de cacao posee algunos componentes tales como la fibra dietética, proteína y componentes bioactivos entre los cuales se encuentran los

polifenoles que tienen funciones únicas como actividad antioxidante.<sup>41</sup>

**Cuadro 4.** Composición de la cáscara de cacao (% de materia seca).<sup>47</sup>

Parámetro	% m/m
Humedad	3.73±0.46
Cenizas	5.96±0.26
Grasa cruda	6.87±0.52
Proteína Cruda	16.93±0.59
Fibra dietética soluble	11.08±0.05
Fibra dietética insoluble	48.94±1.21
Polifenoles	4.85±0.81

### ***B. Usos de la cáscara de cacao***

Entre los usos que se le ha dado convencionalmente a la cáscara de cacao en nuestro país se encuentra su aplicación como abono, es decir como fertilizante para planta. Además, actualmente han surgido nuevas propuestas sobre otras formas de uso, tales como la formulación de dietas experimentales con diferentes niveles de cáscara de cacao para la alimentación de pequeños mamíferos o aprovechando el potencial

energético de estos residuos como material combustible para la alimentación de calderas en la producción de energía.<sup>47</sup>

#### **2.2.2.8. 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. 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>26, 47</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>

**a. 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. 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>26, 47</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.

Los efectos antimicrobianos de los polifenoles también han sido ampliamente informado que tiene su capacidad para inactivar las toxinas bacterianas, 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>47</sup>

#### **b. Mecanismo de acción**

Los polifenoles son agentes naturales antibacterianos y antioxidantes. 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 Alzheimer y Parkinson.<sup>26, 47</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.

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>47</sup>

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.1. EL TIPO DE DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Esta investigación según la finalidad o alcance es un estudio del tipo descriptivo. Según la secuencia temporal, se considera un estudio transversal, porque estudia la variable en un momento dado.

#### **3.2. ÁMBITO DE ESTUDIO**

La toma de muestras microbiológicas de piezas dentales con caries, se realizó en el Centro de Salud de Ciudad Nueva; y los procedimientos microbiológicos, se realizaron en los ambientes del laboratorio de la Escuela de Biología y Microbiología perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna (UNJBG) ubicada en la Av. Miraflores S/N.

### **3.3. POBLACIÓN**

El universo, estuvo conformado por 12 muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes, que acuden al Centro de Salud Ciudad Nueva.

#### **a) Criterios de inclusión**

- Pacientes con piezas dentales con caries dental con cavidad detectable con dentina visible (código 5 según ICDAS)
- Pacientes lucidos orientados en tiempo y espacio.
- Pacientes con aparente buen estado de salud general.
- Pacientes mayores de 18 años.
- Acepta participar voluntariamente en la investigación.
- Que asisten a la consulta odontológica del C.S. Ciudad Nueva.

#### **b) Criterios de exclusión**

- Pacientes que no tengan caries dental.
- Pacientes con piezas dentales con caries (código : 1, 2, 3, 4, 6 según ICDAS)
- Pacientes que no desearon participar en el estudio.

- Pacientes no colaboradores.
- Pacientes con enfermedades sistémicas presentes.

### **3.4. TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

La técnica de recolección de la muestra microbiológica de las piezas dentarias con caries; se realizó por observación directa, el diagnóstico de caries, mediante un examen clínico y su posterior anotación en una ficha según el método ICDAS (anexo 2).

Respecto al efecto antimicrobiano, se tomó las pautas de Duraffourd (1983) y su posterior anotación, en una ficha de recolección de datos (anexo 3).

Todos los pacientes que participaron en este estudio firmaron previamente, un consentimiento informado (anexo 1).

### **3.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

#### **Recolección de datos:**

Consiste en la toma de las muestras microbiológicas de las piezas dentales, previo diagnóstico de la caries dental utilizando el protocolo del Sistema Internacional de Valoración y Detección de Caries, por medio de un hisopo estéril la cual se introdujo en la cavidad cariosa frotando las paredes y el piso de la lesión.

Ya retirado el hisopo de la caries dental, se colocó en un Medio de cultivo y de transporte Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) que mantuvo a los microorganismos en su ambiente para su posterior cultivo, basándose sobre normas básicas generales:

- Las muestras debieron venir acompañadas de su respectiva hoja de pedido donde se llenó todos los datos solicitados por el laboratorio. En todos los casos es imprescindible: 1) nombre completo, 2) N° de Historia Clínica, 3) edad, 4) sexo, 4) tipo de muestra.

- Los viales, tubos o frascos donde se colocan las muestras debieron ser estériles con tapón hermético.

En líneas generales en todas las localizaciones es necesario que la toma se efectúe en el sitio exacto de la lesión con las máximas condiciones de asepsia, que eviten la contaminación con microbios exógenos, que la muestra nunca se ponga en contacto con antisépticos, el transporte y la conservación es el envío inmediato al laboratorio (no superior a 2 horas). Si no es posible, se conservó en heladera a 4°C hasta 12 horas dichas muestras estuvieron suspendida en un tubo de ensayo (18X150 mm) en una proporción de 10 ml en donde se homogenizó en un agitador (vortex) por 20 segundos para así desprender la carga microbiana en dicho medio de transporte,

Las muestras tomadas se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, en un cooler con gel de hielo a temperatura de 4° C para su proceso, una vez recepcionada las muestra en el laboratorio de microbiología se homogenizó en un agitador (vortex) por 20 segundos. Las muestras se sometieron a

condiciones anaerobias provistos de la campana de Gaspak con elementos productores de 5% de CO<sub>2</sub>.

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

La obtención del extracto etanólico de cáscara de cacao, se realizó por el método de “maceración” (convencional) el cual permite obtener todos sus principios activos.

Las muestras de cacao que fueron utilizadas son de la variedad “nacional” del Cuzco. Obteniéndose semillas de cacao debidamente fermentadas y secadas, y posteriormente tostadas; a las cuales se les retiro las cascarillas, hasta obtener 450 gr. de cáscara de cacao.

Se colocó 450 gr. de cáscara de cacao pulverizado en un recipiente debidamente rotulado. Agregándole posteriormente un litro de etanol al 94% respectivamente. Dejándose así en maceración por 10 días, con agitación diaria de 15 min en las mañanas y 15 min por las noches

Luego de transcurrido ese tiempo se procedió a filtrar el macerado con papel de filtro semirápido de 90 mm; obteniéndose 750 ml. de solución filtrada de la muestra.

Posteriormente, se eliminó el solvente, la cual se hizo con la utilización de un deshidratador de cajones IC106D a una temperatura de 40 °C, obteniéndose 100 gr. de extracto etanólico de cáscara de cacao.

Una vez obtenido el extracto etanólico de cáscara de cacao se procedió a depositarlo en tubo de ensayo la siguiente proporción: *1g de extracto etanólico de cáscara de cacao / 1ml de agua destilada* y a partir de esta se obtuvieron los siguientes concentraciones: 5 mg/ml, 10mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml.

### **Activación de la muestra microbiológica.**

En el laboratorio se procedió a incubar los tubos de ensayo con las muestras microbiológicas, con caries por un tiempo de 24 horas a 40° C en un medio de anaerobiosis para el crecimiento bacteriano rápido.

Después que transcurrido las 24 horas se procedió a observar microscópicamente las muestras incubadas. Posteriormente con un asa bacteriológica, se tomó una asada de cada muestra incubada y se procedió a resembrarlas las muestras en caldo de Mueller Hinton por un espacio de 3 a 4 horas a 37 °C, donde después se comparó con el 0,5 de escala de Mac Farland que nos indicó el grado crecimiento bacteriano adecuado.

#### **Grado de sensibilidad NCCLS (Técnica de Kirby- Bauer)**

Según la NCCLS - Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (1985) Documento estándar aprobado M-7A, Villanova, P.A., 1985. Se determina el grado sensibilidad bacteriana por difusión del disco (Kirby-Bauer), el inóculo bacteriano se depositó 100µL sobre la superficie del agar a cada placa correspondientemente, mediante la técnica de diseminación hasta que el inóculo quedó distribuido de modo homogéneo. Se dejó secar durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego usando una pinza estéril se procedió a colocar los discos de sensibilidad esterilizados de papel filtro embebido de

las diferentes concentraciones, en la superficie de las placas de Mueller Hinton con las muestras bacterianas de pacientes con caries dental respectivamente; haciendo una ligera presión para permitir un contacto homogéneo y en el siguiente orden de distribución de los discos de sensibilidad.

- placa N° 1

D1 = 5 mg/ml de extracto etanólico de cáscara de cacao

D2 = 10 mg/ml de extracto etanólico de cáscara de cacao

D3 = 15 mg/ml de extracto etanólico de cáscara de cacao

D4 = Control con agua destilada.

- placa N° 2

D5 = 20 mg/ml de extracto etanólico de cáscara de cacao

D6 = 25 mg/ml de extracto etanólico de cáscara de cacao

D7 = 30 mg/ml de extracto etanólico de cáscara de cacao

D8= control con agua destilada.

Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas después de la cual se procederá a la lectura de las placas en orden cualitativo, en referencia a la aparición

de halos de inhibición alrededor de los discos, y en orden cuantitativo en relación a las medidas de diámetros de los halos de inhibición, con la ayuda del vernier.

### **3.6. PLAN DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS 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 2).

Los resultados se presentaron en tablas y gráficos de barras de los diferentes halos de inhibición de cada concentración, apoyados por medio del programa Microsoft Excel.

## **CAPÍTULO IV**

### **DE LOS RESULTADOS**

#### **4.1. RESULTADOS:**

En el presente capítulo, se analizan y discuten los resultados obtenidos del proceso de recolección de información, mediante la estadística descriptiva, estableciéndose las frecuencias, porcentajes y relación estadística.

**TABLA N° 01**

**EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 5 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.**

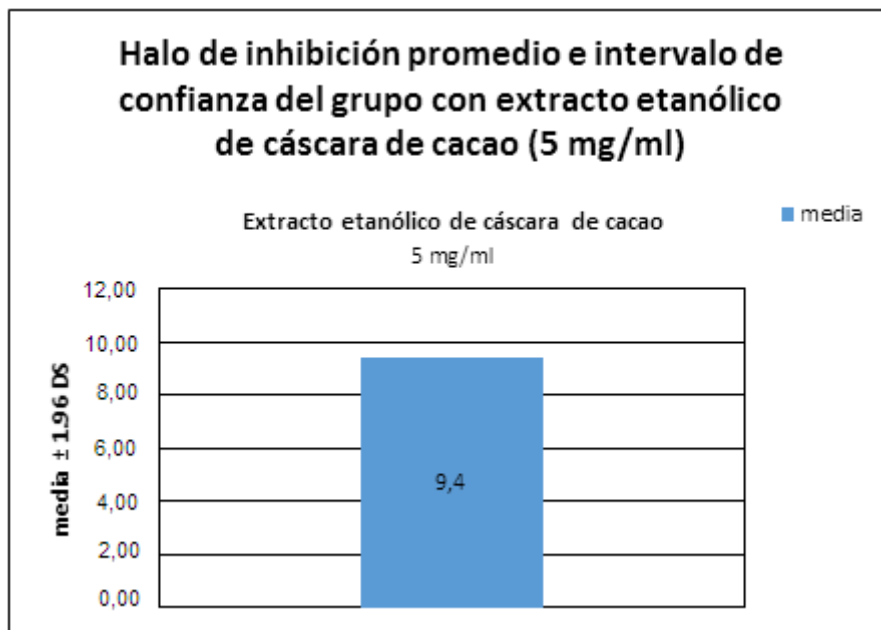
<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>Mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>9,4</b>	<b>0,51</b>	<b>9,35</b>	<b>9,22</b>	<b>9,82</b>	<b>8,6</b>	<b>10,5</b>

Fuente: matriz de datos

En el primer grupo (n=12) el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 5 mg/ml, obtuvo una media de 9,4 mm, con valores mínimo de 8,6 mm, hasta 10,5 mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición y según la escala Duraffourd se considera **sensible**.

## GRÁFICO N° 01

### EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 5 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.



Fuente: Tabla 01

**TABLA N° 02**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.**

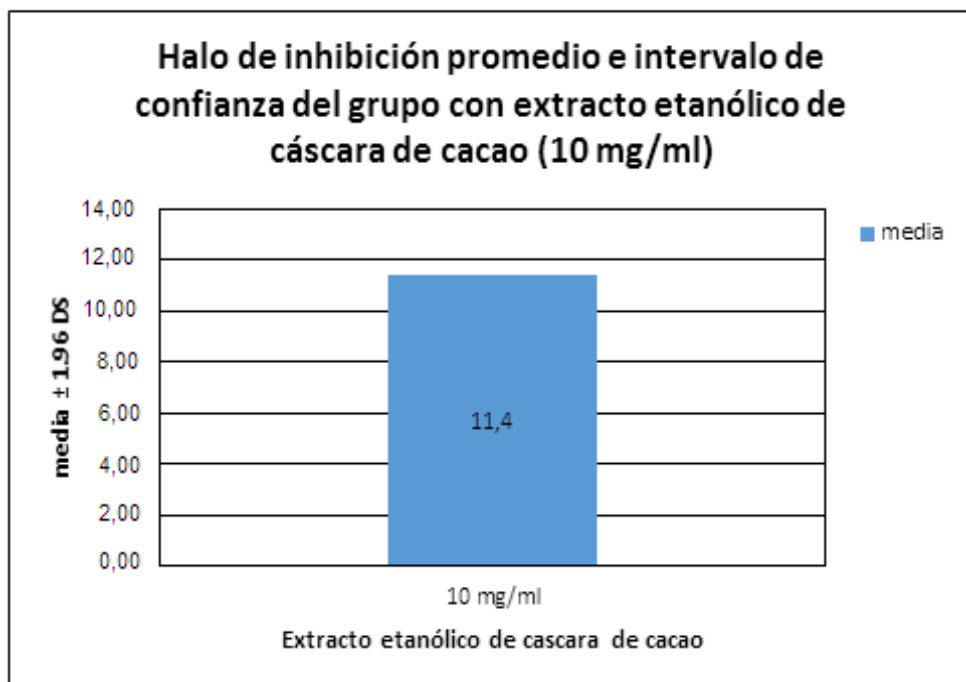
<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>Mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>11,4</b>	<b>0,91</b>	<b>11,55</b>	<b>10,75</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>13</b>

Fuente: matriz de datos

En el segundo grupo (n=12) donde se sometió a prueba el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 10 mg/ml, se obtuvo una media de 11,4 mm, con valores mínimo de 10 mm, hasta 13 mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición y según la escala Duraffourd se considera **sensible**.

## GRÁFICO N° 02

### EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.



Fuente: Tabla 02

**TABLA N° 03**

**EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 15 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.**

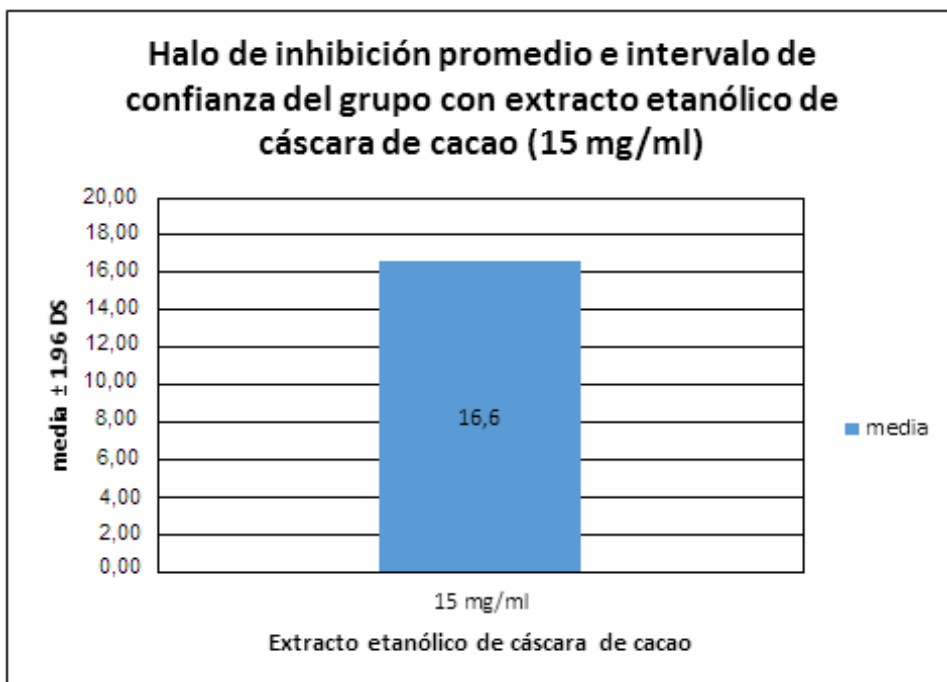
<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>16,6</b>	<b>0,69</b>	<b>16,65</b>	<b>16,3</b>	<b>16,85</b>	<b>15,8</b>	<b>18,3</b>

Fuente: matriz de datos

En el tercer grupo (n=12) donde se sometió a prueba el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 15 mg/ml, se obtuvo una media de 16,6 mm, con valores mínimo de 15,8 mm, hasta 18,3 mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición y según la escala Duraffourd se considera ***muy sensible***.

### GRÁFICO N° 03

#### EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 15 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.



Fuente: Tabla 03

**TABLA N° 04**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE  
20 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS  
DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.**

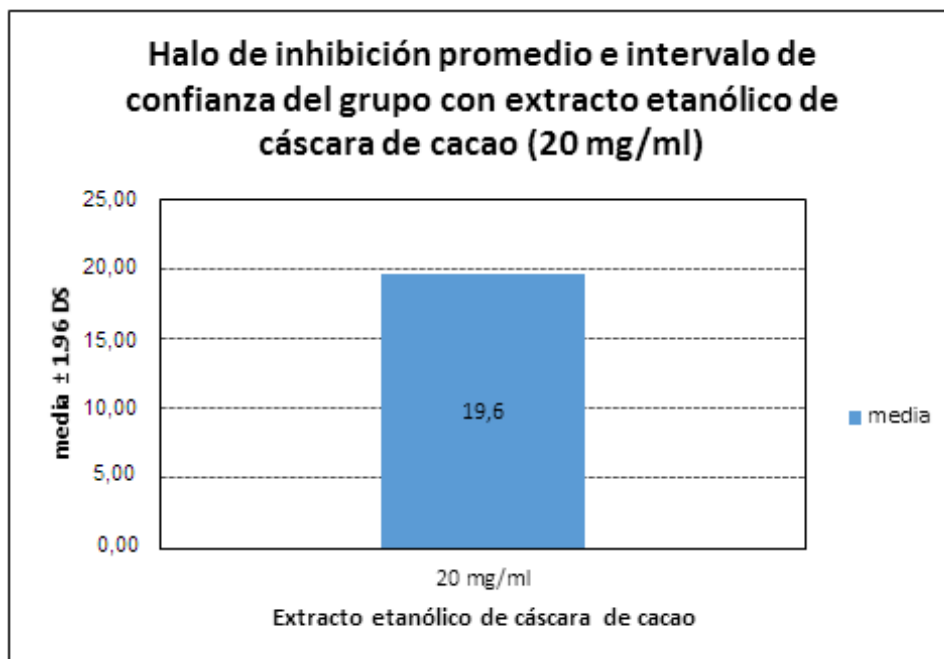
<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>Mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>19,6</b>	<b>0,61</b>	<b>19,6</b>	<b>19,2</b>	<b>20,0</b>	<b>18,8</b>	<b>20,7</b>

Fuente: matriz de datos

En el cuarto grupo (n=12) donde se sometió a prueba el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 20 mg/ml, se obtuvo una media de 19,6 mm, con valores mínimo de 18,8 mm, hasta 20.7 mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición y según la escala Duraffourd se considera ***muy sensible***.

## GRÁFICO N° 04

### EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 20 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.



Fuente: Tabla 04

**TABLA N° 05**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 25 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.**

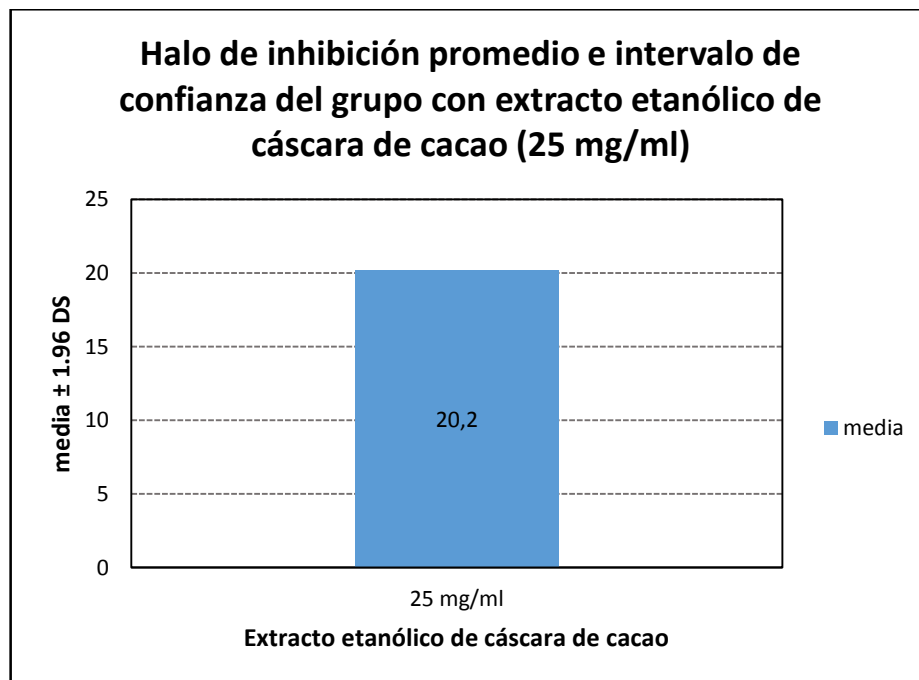
<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>Mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>20,2</b>	<b>0,87</b>	<b>20,2</b>	<b>19,5</b>	<b>20,9</b>	<b>19</b>	<b>22</b>

Fuente: matriz de datos

En el quinto grupo (n=12) donde se sometió a prueba el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 25 mg/ml, se obtuvo una media de 20,2 mm, con valores mínimo de 19 mm, hasta 22 mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición y según la escala Duraffourd se considera **sumamente sensible**.

## GRÁFICO N° 05

### EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 25 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES.



Fuente: Tabla 05

**TABLA N° 06**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 30 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES**

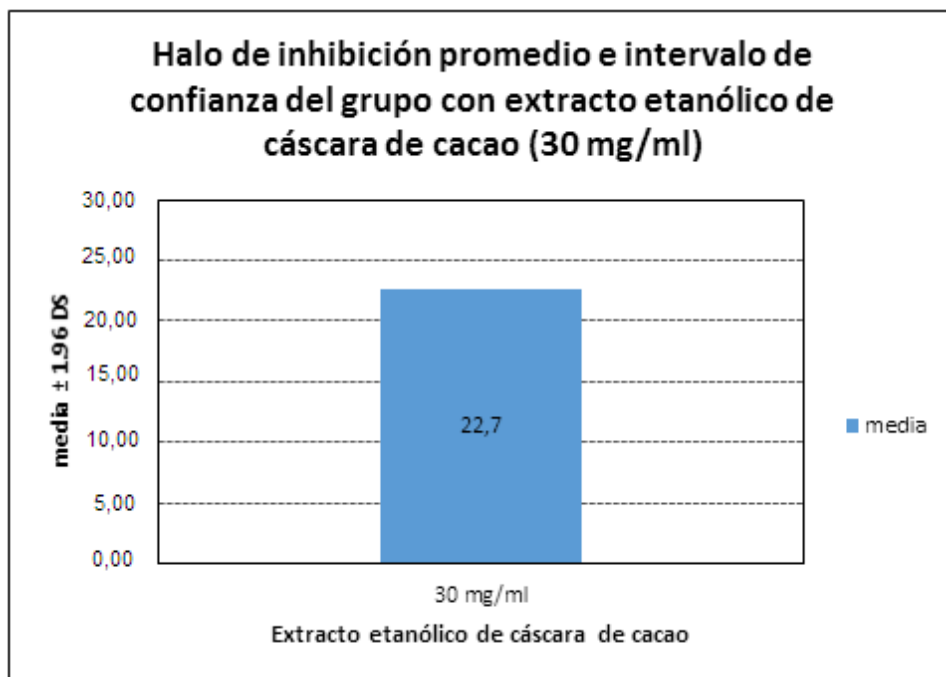
<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>Mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>22,7</b>	<b>0,95</b>	<b>22,6</b>	<b>21,9</b>	<b>23,5</b>	<b>21,5</b>	<b>24,5</b>

Fuente: matriz de datos

En el sexto grupo (n=12) donde se sometió a prueba el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 30 mg/ml, se obtuvo una media de 22,7 mm, con valores mínimo de 21,5 mm, hasta 24,5 mm como valor máximo en los diámetros de halo de inhibición y según la escala Duraffourd se considera **sumamente sensible**.

## GRÁFICO N° 06

### EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A UNA CONCENTRACIÓN DE 30 MG/ML SOBRE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES



Fuente: Tabla 06

**TABLA N° 07**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A LAS SIGUIENTES CONCENTRACIONES AL 5 MG/ML, 10 MG/ML, 15 MG/ML, 20 MG/ML, 25 MG/ML, 30 MG/ML.**

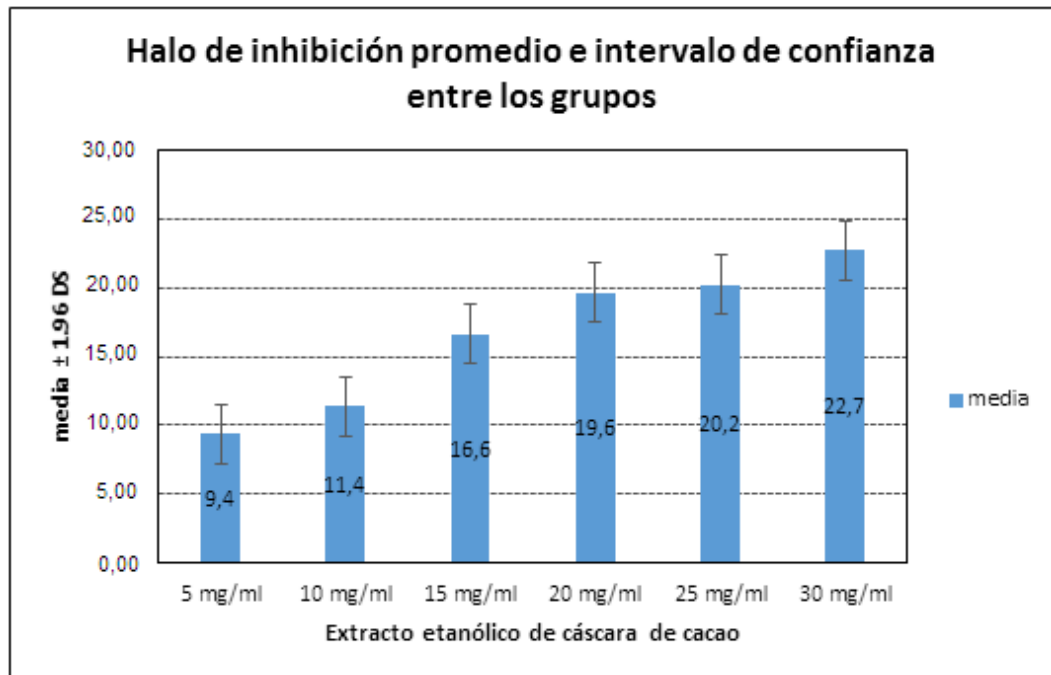
<b>Grupo</b>	<b>N°</b>	<b>Media</b>	<b>D.S.</b>	<b>Mediana</b>	<b>P25</b>	<b>P75</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>EECC 5 mg/ml</b>	12	9,4	0,51	9,35	9,22	9,82	8,6	10,5
<b>EECC 10 mg/ml</b>	12	11,4	0,91	11,55	10,75	12	10	13
<b>EECC 15 mg/ml</b>	12	16,6	0,69	16,65	16,3	16,85	15,8	18,3
<b>EECC 20 mg/ml</b>	12	19,6	0,61	19,6	19,2	20,0	18,8	20,7
<b>EECC 25 mg/ml</b>	12	20,2	0,87	20,2	19,5	20,9	19	22
<b>EECC 30 mg/ml</b>	12	22,7	0,95	22,6	21,9	23,5	21,5	24,5

Fuente: matriz de datos

A la evaluación de la actividad inhibitoria de las diferentes concentraciones de los extractos etanólico de cáscara de cacao, en base a los diámetros de halo de inhibición; se observa una menor media (9,4 mm) de halo de inhibición del extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 5 mg/ml, frente a un mayor promedio (22,7 mm) correspondiente a los halos de inhibición producidos por el extracto etanólico de cáscara de cacao a una concentración de 30 mg/ml.

## GRÁFICO N° 07

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO A LAS SIGUIENTES CONCENTRACIONES AL 5 MG/ML, 10 MG/ML, 15 MG/ML, 20 MG/ML, 25 MG/ML, 30 MG/ML.



Fuente: Tabla 07

## 4.2. DISCUSIÓN

Flores tapia, maría y col. En su investigación: “Efectividad del *Theobroma cacao* L. sobre el desarrollo del biofilm dental”, compararon dos tipos de concentraciones (12,5 % y 13 %), de la solución de *Theobroma cacao* L.<sup>11</sup> obteniendo como resultado que la solución al 12,5 % es la más efectiva, con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y experimental ( $t=1,75$ ,  $gl=28$ ,  $p<0,05$ ). En conclusión la solución de la cáscara de cacao inhibe significativamente, la formación de biofilm. Nuestro trabajo es diferente porque se utilizó el extracto etanólico de cáscara de cacao a diferentes concentraciones y fueron aplicadas en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries, sin embargo el resultado si es concordante con nuestro trabajo al evidenciar el efecto antimicrobiano de la cáscara de cacao

Mirian Alexandra Sucuzhañay Mora. En su investigación: “Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) Sobre cepa de *Streptococcus mutans*”.<sup>12</sup> Dando como resultados que no existieron diferencias significativas entre la media del halo de inhibición del extracto

acuoso de cáscara y de semilla al 12,5% ( $p=0,24$ ) y al 20% ( $p=0,94$ ), por lo que estos dos compuestos presentan igual efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*. En nuestro trabajo de investigación se realizó la extracción etanólica por el método de maceración porque extrae mejor los principios activos de la cáscara de cacao, y en los resultados se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de nuestro extracto etanólico de cáscara de cacao.

Cuéllar, O. y col. "Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao L.*".<sup>18</sup> 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. Se concluye que la fracción clorofórmica resultó promisoría inhibiendo el crecimiento de *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Streptococcus agalactiae*. En comparación con nuestro trabajo el resultado es concordante a nuestros resultados que también inhiben las bacterias presentes en la caries dental

Mariani, m. y col. "Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao L.*) Sobre el crecimiento de *streptococcus mutans* in vitro".<sup>2</sup> 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. 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*. En nuestro trabajo se utilizó diferentes concentraciones de extracto etanólico de cáscara de cacao por presentar mayor efecto antimicrobiano según los antecedentes, en cuanto a los resultados concuerdan con los nuestros en donde hay una inhibición significativa de las bacterias presentes en las piezas dentales con caries.

Josué Brisasen Orihuela Gutiérrez. "Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao L.* sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *streptococcus mutans* a esmalte dentario".<sup>6</sup> Se evaluó el efecto sobre el crecimiento con el método de difusión en pocillos con los extractos de semilla, de cáscara y controles.

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, en comparación con nuestro trabajo también se utilizó el extracto etanólico de cáscara de cacao pero a diferentes concentraciones para lograr obtener la concentración optima y los resultados fueron concordantes hallándose actividad antimicrobiana.

Rosas Urbina, Marco Antonio. “Efecto in vitro de 04 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans*”.<sup>17</sup> El propósito de este trabajo fue el análisis del efecto in vitro de 04 derivados comerciales del cacao sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, Al posterior análisis se concluyó que los 04 derivados comerciales de cacao presentan efecto inhibitorio in vitro sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Este trabajo de investigación reafirma que el cacao presenta propiedades antimicrobianas frente a microorganismos presentes en la caries dental.

## CONCLUSIONES

### PRIMERA.

A la evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries, se halló que si hay un efecto antimicrobiano en todas las concentraciones.

### SEGUNDA.

Se determinó que si hay un efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 5 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 9,4mm y según la escala de Duraffourd se considera *sensible*.

### TERCERA.

Se determinó que si hay un efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 10 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 11.4mm y según la escala de Duraffourd se considera *sensible*.

#### **CUARTA.**

Se determinó que si hay un efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 15 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 16,6 mm y según la escala de Duraffourd se considera *muy sensible*.

#### **QUINTA.**

Se determinó que si hay un efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 20 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 19,6 mm y según la escala de Duraffourd se considera *muy sensible*.

#### **SEXTA.**

Se determinó que si hay un efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 25 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 20,2 mm y según la escala de Duraffourd se considera *sumamente sensible*.

## **SEPTIMA.**

Se determinó que si hay un efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 30 mg/ml con un halo de inhibición promedio de 22,7 mm y según la escala de Duraffourd se considera *sumamente sensible*.

## RECOMENDACIONES

- Ampliar la investigación hacia formulaciones de enjuagues, pastas y colutorios dentales a partir del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a una concentración de 30 mg/ml.
- Realizar estudios en personas con caries dental aplicando colutorios y/o enjuagues hechos a base del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a fin de verificar si existe actividad antimicrobiana frente a microorganismos cariogénicos.
- Realizar estudios del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) frente a muestras microbiológicas identificadas de pacientes con enfermedades periodontales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrancos MJ, Rodriguez AG. Cariología. En: Barrancos MJ. Operatoria dental: Integración clínica. 4ta Edición. Buenos Aires. Médica Panamericana, 2006. pág. 297-339.
2. 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. pág.15-22.
3. 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 superficie de vidro. Cienc Odontol Bras. 2003; pág. 58 -62.
4. 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 Disease. 2006; pag. 343 -348
5. Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their antiglycosyltransferase and antibacterial activities. J Dent Res.

2001; 80(11):2000-2004. Disponible en:  
<http://jdr.sagepub.com/content/80/11/2000>

6. Gutiérrez JBO. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de theobroma caca I. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de streptococcus mutansa esmalte dentario. tesis. lima: san marcos, lima; 2016.
7. 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; pag.19-73.
8. Moromi H, Martinez E. Efecto del té verde en la formación de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Rev Científica Odontología Sanmarquina. 2006; pag. 9-20
9. Romero M, Hernandez Y, Gil M. Actividad inhibitoria de la *Matricaria recutita* “manzanilla alemana” sobre el *Streptococcus mutans*. Rev Lat de Ortodoncia y Odontopediatria. 2009; 9 pág. 1-13 Disponible en: <http://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp>
10. 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: UNMSM; 2010. Disponible en:

[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2149/Cosco\\_rd.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2149/Cosco_rd.pdf?sequence=1)

11. Flores Tapia M. Efectividad del *Theobroma Cacao* L. sobre el desarrollo del biofilm dental. revista científica odontológica. 2016 enero; pág.1-8 Disponible en: <https://revistaodontologica.colegiodentistas.org/index.php/revista/article/view/303>
12. Sucuzhañay Mora M. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cascara y semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre cepa de streptococcus mutans. estudio in vitro. 2015. TESIS. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5815883.pdf>
13. 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.
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. Disponible en: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/1621/1/TESIS%20Jorge%20Andres%20Gil%20FINAL.pdf>
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/memorias2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/56_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 Estomatología. UNT. 2009. Disponible en: <http://www.dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/417>
18. Cuéllar G O., Guerrero AG. Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao *Theobroma cacao L.* Rev. MVZ Córdoba 2012; pag.3176-3183. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v17n3/v17n3a12.pdf>
19. 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.

20. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a ed. en español. Madrid. Ed. Iberoamericana- Mc.Graw-Hill. 2002.
21. Moromi NH y col. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. FO –UNMSM. 2008.
22. Urzúa AI, Moncada GA. Salud y estética dental, mediante la terapia no restauradora y mínimamente invasiva de la caries. En: Henostroza H G. Estética en odontología restauradora. 1era edición. Madrid. Ripano S. A. 2006. p. 166 - 182.
23. Henostroza H G. Caries dental: principios y procedimientos para su diagnóstico. 1° ed. Lima. UPCH. Ripano. 2007.
24. 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. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-39082011000300010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082011000300010)
25. 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

26. 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.
27. Proyecto UE –PERÚ/ PENX, MINCETUR, APPCACAO. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. (Informe final) Lima. 2008.
28. Aponte Martínez, A. Desarrollo del cacao en Perú. Dirección general de competitividad agraria –Ministerio de agricultura. Managua 2013.
29. Perú. Ministerio de Agricultura. Gobierno Regional del Cusco. Municipalidad Distrital de Echarate. Sistematización del concurso del superárbol de cacao chuncho del cusco. 2009.
30. 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-deprensa/notas-de-prensa-2012/6836-minag-declara-patrimonio-natural-de-lanacion- al-cacao-peruano>. Acceso el 23 enero 2015.
31. Ministerio de Agricultura. Plan estratégico. Cadena agroproductiva de cacao. Abril, 2007

32. Benito J, Arevalo E, Garcia L. Situación actual y perspectivas de investigación en cacao (*Theobroma cacao* L) en el Perú. INIA. 2009.
33. 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; pág. 1470 -1475.
34. 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.
35. Pedro ND, García BL. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2010; pág. 156-166
36. 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.

37. 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
38. 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.
39. Bowen. WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* –Derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms *Caries Research* 2011; pag.69-86
40. 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.
41. 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.
42. Samaniego Fernandez L.; Sosa del castillo M. *Lactobacillus* spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria, 2007, p. 1-21

43. Microbiología De La Caries Dental. Acta odontol. Venezuela. 2003. Pág. 293-294. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-63652003000300018&Ing=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652003000300018&Ing=es).
44. Pontigo A, Medina C, Márquez M, Atilán C. Caries Dental. 1<sup>ra</sup> edición. Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2012. p. 38-42
45. Nureña María. Aplicación del sistema internacional de detección y valoración de caries (ICDAS-II) e índice ceo-s en niños de 3 a 5 años del hospital nacional docente madre niño san Bartolomé. (tesis para obtener el título profesional de cirujano dentista) Lima. Facultad de odontología. USMP. 2011.
46. MINAGRI-DGPA-DEEIA. Estudio del Cacao en el Perú y el Mundo - Ministro de Agricultura y Riego. (Informe final) Lima. 2016. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/analisis-economico/analisis-2016?download=10169:estudio-del-cacao-en-el-peru-y-en-el-mundo>.
47. Hernández Jéssica. Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cáscara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles. (tesis para optar el título de ingeniera química). Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. ESPOL. 2015

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO,....., de..... años de edad y con DNI n°....., manifiesto que he sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer el examen clínico oral que me realicen para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado **“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES DE PACIENTES QUE ACUDEN AL CENTRO DE SALUD CIUDAD NUEVA. TACNA 2018”**

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos. El presente ficha es libre y voluntario

Tomando ello en consideración, OTORGO MI CONSENTIMIENTO a que este examen tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

FECHA: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

## ANEXO N° 2

### FICHA DE OBSERVACION CLINICA.

**TITULO: EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96 % DE CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PACIENTES CON CARIES DENTAL QUE ACUDEN AL CENTRO DE SALUD CIUDAD NUEVA, TACNA 2018**

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

H.CL. \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_

### 1. METODO DE ICDAS

Código= 0	Sano
Código= 1	Cambio visible en esmalte-visto seco
Código= 2	Cambio detectable en esmalte
Código= 3	Ruptura localizada del esmalte
Código= 4	Sombra oscura subyacente de dentina
Código= 5	Cavidad detectable con dentina visible
Código= 6	Cavidad detectable extensa con dentina visible

### Odontograma

	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	
M																	M
O																	O
D																	D
V																	V
P																	P
M																	M
O																	O
D																	D
V																	V
L																	L
	4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	

**Pieza dentaria seleccionada:** \_\_\_\_\_

## ANEXO N° 3

### INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### FICHA DE REGISTRO DE DIÁMETRO DE INHIBICIÓN

Muestra: .....

Placa: .....

Medio de cultivo: .....

Fecha de lectura: .....

Hora de lectura: .....

CONCENTRACIONES	Diámetros del halo de inhibición en mm
Concentración 5 mg/ml	
Concentración 10 mg/ml	
Concentración 15 mg/ml	
Control negativo	
Concentración 20 mg/ml	
Concentración 25 mg/ml	
Concentración 30 mg/ml	
Control negativo	

## ANEXO N° 4

### MATRIZ DE DATOS

EXTRACTO ETANOLICO DE CASCARA DE CACAO							
N° de muestra	MEDIDAS DE HALOS DE INHIBICION						
	EECC 5 mg/ml	EECC 10 mg/ml	EECC 15 mg/ml	EECC 20mg/ml	EECC 25mg/ml	EECC 30 mg/ml	Control negativo
1	10,5 mm	10,6 mm	16,8 mm	19 mm	20,3 mm	23,4 mm	-
2	9,9 mm	11,5 mm	16,4 mm	19,1 mm	20,4 mm	24,5 mm	-
3	9 mm	10,8 mm	15,8 mm	19,5 mm	19,5 mm	23,4 mm	-
4	9,3 mm	11,7 mm	17 mm	19,2 mm	20,2 mm	22,1 mm	-
5	9,8 mm	12 mm	17,3 mm	19,7 mm	19 mm	22,7 mm	-
6	9,3 mm	11 mm	16 mm	18,8 mm	19,4 mm	21,9 mm	-
7	8,6 mm	11,6 mm	16,5 mm	20 mm	21 mm	21,9 mm	-
8	10 mm	12,7mm	15,9 mm	19,5 mm	20,9 mm	21,5 mm	-
9	9,3 mm	13 mm	16,8 mm	20,1 mm	19,8 mm	22,5 mm	-
10	9,4 mm	12 mm	18,3 mm	20,7 mm	22 mm	21,9 mm	-
11	9,5 mm	10,4 mm	16,8 mm	20 mm	19,5 mm	23,8 mm	-
12	9 mm	10 mm	16,4 mm	20,6 mm	21 mm	23,6 mm	-

## ANEXO N° 5

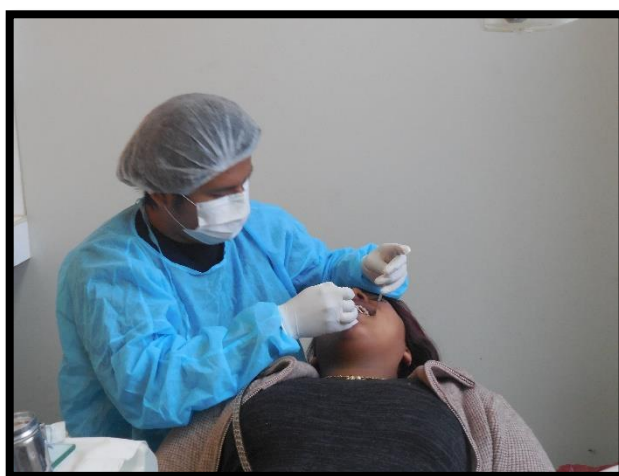
### PRESENCIA DE LAS BACTERIAS A LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

	<b>Streptococcus</b>	<b>diplococcus</b>	<b>Bacillus spp</b>
<b>MUESTRA 01</b>	+	-	-
<b>MUESTRA 02</b>	+	+	-
<b>MUESTRA 03</b>	-	+	-
<b>MUESTRA 04</b>	+	+	+
<b>MUESTRA 05</b>	+	+	-
<b>MUESTRA 06</b>	+	+	+
<b>MUESTRA 07</b>	-	+	-
<b>MUESTRA 08</b>	+	+	-
<b>MUESTRA 09</b>	+	+	+
<b>MUESTRA 10</b>	+	+	-
<b>MUESTRA 11</b>	+	-	-
<b>MUESTRA 12</b>	+	+	+

Interpretación: (+)= se observó y (-) = no se observó

## ANEXO 6

### FOTOGRAFÍAS DE INSTRUMENTOS UTILIZADOS Y PROCEDIMIENTO DE LA TOMA DE MUESTRAS.



**Fot. N°1:** Toma de muestra.



**Fot. N°2:** Muestras tomadas y depositadas en caldo BHI.



**Fot. N° 3:** Muestras de cáscara de cacao retiradas de las semillas.



**Fot. N° 4:** Cáscara de cacao pulverizado



**Fot. N° 5:** Extracto etanólico de cáscara, luego de la evaporación en estufa



**Fot. N° 6:** Aplicación de extracto etanólico de cáscara de cacao a diferentes concentraciones en los discos de sensibilidad.





**Fot. N°7:** Placas listo para la incubación de a 24 horas.



**Fot. N°8:** Formación de halos de inhibición.

## ANEXO 7

### CONSTANCIA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA


 **Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann" – Tacna**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Escuela Académico Profesional de: Biología-Microbiología y Física Aplicada 

**CONSTANCIA**

Mediante el presente se hace constar que el señor bachiller de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Odontología, Eder Cristian Poma Choque, identificado con documento de identidad N° 47891283 y con código de matrícula N° 2010-35710, ha realizado su tesis en nuestras instalaciones del laboratorio de microbiología titulada **"EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS DE PIEZAS DENTALES CON CARIES DE PACIENTES QUE ACUDEN AL CENTRO DE SALUD CIUDAD NUEVA. TACNA 2018"**, durante los meses de marzo hasta comienzos del mes de junio del presente año.

Se extiende la presente constancia para fines relacionados a su presente tesis.

Atentamente.

  
**Edwin Denis Obando Velarde**  
Especialista del Laboratorio  
de Microbiología

---

Ciudad Universitaria Av. Miraflores s/n  
Apartado 316 Teléfono:052-583000 Anexo: 2102 - Fax: 2101

## ANEXO 8

### CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DEL *THEOBROMA CACAO* L.

Tacna, 04 de octubre del 2017

Señor:

MSc. MAGNO ROBLES TELLO

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

Presente.-

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud. para manifestarle con relación a la solicitud del Sr. Eder Cristian Poma Choque, estudiante del sexto año de la Escuela Profesional de Odontología, sobre la identificación de una muestra vegetal que empleará en su Proyecto de Tesis, informo que se ha procedido a identificar la muestra entregada y debo señalar que se trata de *Theobroma cacao* L. "Cacao".

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente,

  
Dra. Rosario Zegarra vda de Chávez

Profesora Principal FCAG



