



Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (Theobroma cacao) sobre cepa de Streptococcus Mutans: Estudio in vitro

Antimicrobial effect of cocoa peels aqueous extracts and cocoa seeds (Theobroma Cacao) In a streptococcus mutans strain: In vitro study

Efeito antimicrobiano dos extratos aquosos de casca e sementes de cacau (Theobroma Cacao) sobre Streptococcus Mutans: estudo in vitro

Miryan Alexandra Sucuzhañay Mora¹, Patricia de Lourdes Álvarez Velasco²

RECIBIDO octubre/ 2015 **CORREGIDO** noviembre/ 2016 **APROBADO** diciembre/ 2016

- 1 Odontóloga, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito; miryan18@hotmail.com
- 2 Odontopediatra, Profesora de la Clínica Odontopediatria Pregrado, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito; plalvarez@uce.edu.ec

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (*Theobroma cacao*) sobre el *Streptococcus mutans*. **Materiales y métodos:** En el presente estudio experimental la muestra estuvo constituida por 20 placas petri inoculadas con *Streptococcus mutans* ATCC 25175 los cuales fueron reactivados por 24 horas a 35 +/- 2°C en agar sangre. Para la obtención de los extractos acuosos se realizó el método de reflujo, utilizando agua destilada como solvente, los extractos se concentraron al 12.5% y al 20%. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba U de Mann Whitney con un nivel de significancia del 5%. **Resultados:** No existieron diferencias significativas entre la media del halo de inhibición del extracto acuoso de cáscara y de semilla al 12.5% (p=0,27) y al 20% (p= 0.94), por lo que estos dos extractos presentan igual efecto antimicrobiano. **Conclusiones:** Los extractos acuosos de cáscara y semilla de cacao presentaron efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus Mutans*.

Palabras clave: Efecto antimicrobiano; *Streptococcus mutans*; extractos de cacao.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the antimicrobial effect of cocoa peels aqueous extracts and cocoa seeds (*Theobroma Cacao*) in a *Streptococcus Mutans* strain. **Methods and Equipment:** In this experimental study, the sample consisted on 20 petri dishes inoculated with *Streptococcus mutans* ATCC 25175 that were reactivated in Agar blood for 24 hours and cultured at 35°C +/- 2°C. A reflux method, using distilled water as a solvent, was used in order to obtain the aqueous extracts. These extracts were fixed in a 12.5% and 20% concentration ratio. The Mann Whitney U test obtained a significance level of 5%. **Results:** There were no meaningful differences between the peels aqueous extracts and the seed inhibition halo at a 12.5% concentration (p=0,27) and at a 20% concentration (p= 0.94); these two extracts have the same antimicrobial effect. **Conclusions:** The cocoa peels aqueous extracts and cocoa seeds showed antimicrobial effect over *Streptococcus Mutans*.

Keywords: Antimicrobial effect; *Streptococcus mutans*; cocoa extracts.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos aquosos de cascas e sementes de cacau (*Theobroma Cacao*) sobre linhagem de *Streptococcus Mutans*. **Materiais e Métodos:** Neste estudo experimental a amostragem estava constituída por 20 placas de Petri inoculadas com *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 os quais foram reativados durante 24 horas a 35 ± 2 °C em ágar sangue. Para a obtenção dos extratos aquosos o método de refluxo foi levado a cabo, utilizando água destilada como solvente, as concentrações dos extratos foram de 12,5% e 20%. Os dados foram analisados através do teste U de Mann Whitney com significância de 5%. **Resultados:** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias do halo de inibição dos extrato aquoso de casca e semente ao 12,5% (p=0,27) e ao 20% (p=0,94), de modo que os dois extratos apresentaram igual efeito antimicrobiano. **Conclusões:** Os extratos aquosos de casca e semente de cacau mostraram efeito antimicrobiano sobre *Streptococcus Mutans*.

Palavras chave: Efeito antimicrobiano; *Streptococcus mutans*; extratos de cacau.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es uno de los problemas de Salud Pública, ya que ha afectado la calidad de vida del hombre, se caracteriza por ser una enfermedad multifactorial, dado por el desequilibrio entre el proceso de desmineralización y remineralización, conllevando a la cavitación del esmalte; es multifactorial porque interactúan varios factores como el hospedero, el sustrato haciéndose énfasis al consumo de sacarosa, los microorganismos entre ellos se encuentra principalmente el *Streptococcus mutans*, todos estos deben actuar sobre un tiempo para ocasionar la lesión cariosa^{1,2,3}.

El *Streptococcus mutans* es un microorganismo Gram positivo, anaerobio facultativo, posee varios factores de virulencia como la síntesis de glucosiltransferasa, esta enzima metaboliza la sacarosa y elabora glucanos, básicos para el proceso de adhesión de microorganismos al esmalte dental, de modo que lo ideal será descubrir una sustancia que bloquee la función de la enzima, para inhibir tal adhesión⁴.

Cabe destacar que a lo largo de los años se han empleado sustancias naturales, destinadas a la prevención de la caries dental, en este caso destinadas al control del *Streptococcus mutans*. El empleo de las plantas se debe a que presentan en su composición propiedades antimicrobianas y son usadas como extractos, los mismos que se obtienen con diferentes procedimientos y solventes^{5,6}.

El cacao un fruto tropical, cultivado por primera vez por los Mayas, este se considera como materia prima para la elaboración de chocolates, sin embargo en el Ecuador los Kichuas de Sucumbíos y Orellana lo emplean para tratar tumores de la piel, ellos elaboran una resina de la cáscara del cacao y lo aplican como cicatrizante para las heridas, mientras que las semillas son usadas para tratar la anemia, reumatismo, hemorragias, quemaduras y la fiebre; en cuanto a la Odontología, cabe mencionar que una alimentación rica en cacao ayudaría en el tratamiento de la enfermedad periodontal puesto que reduce el estrés oxidativo, todas estas propiedades se dan debido a la presencia de polifenoles como catequinas^{7,8,9}.

En cuanto a los antecedentes cabe destacar el estudio que realizó Ooshima et al. En el 2000 en el que evaluó el efecto antimicrobiano de extractos acuosos de 4 derivados del cacao como la manteca de cacao, cacao en polvo, chocolate sin azúcar y chocolate con azúcar, sobre el *Streptococcus mutans*, empleando la técnica Kirby-Bauer, encontrando un efecto antimicrobiano de todos los extractos¹⁰.

Mariani & Fernández, 2010⁶, encontraron que el extracto acuoso de semillas de cacao a diferentes concentraciones, evaluados mediante la técnica Kirby- Bauer, sobre la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, encontraron halos de inhibición, por lo tanto se concluye que dicho extracto puede ser usado para prevención de la caries.

En un estudio comparativo in vivo, se elaboró un extracto etanólico de la cáscara de cacao y fue comparado con el enjuague bucal de clorhexidina al 0.2%, se aplicó en pacientes y al realizar controles a la semana, al mes y a los dos meses, se encontró que el extracto de cáscara de cacao presenta igual efecto al enjuague de clorhexidina, esto dado por la disminución de *Streptococcus mutans* en la placa dental de los pacientes¹¹.

Ecuador es uno de los principales productores de cacao a nivel mundial y pese a todas las propiedades medicinales que posee, no se cuenta con productos destinados al área bucal como colutorios o dentífricos, por otro lado la cáscara de cacao que resulta del tostado de la semilla constituye un contaminante ambiental, ya que es muy difícil de eliminarlo¹².

Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de la cáscara y de la semilla del cacao sobre el *Streptococcus mutans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, en donde se obtuvo los extractos acuo-

Los extractos de cacao, al igual que se realizaron los cultivos de las cepas de Streptococcus Mutans. La muestra empleada estuvo constituida por 20 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus mutans ATCC 25175 no contaminadas.

Para obtener los extractos acuosos, se recolectó 4 mazorcas de cacao de tipo Forastero, se separaron las cáscaras de los granos de cacao, los mismos que fueron despulpados, para posteriormente secarlos en un horno a una temperatura de 40°C por 7 días, luego se llevó a cabo el tostado de las semillas por 35 min a 140°C, este paso se consideró básico puesto que se lleva a cabo un evento químico conocido como epimerización, en donde las epicatequinas se transforman en catequinas, consideradas el principio activo de los extractos¹³. (Figura N°1 ABCD).



Figura N° 1. A Lavado de las mazorcas de cacao, B Despulpado de los granos de cacao, C Secado de granos de cacao, D Tostado de los granos de cacao.

Se separó la cáscara de las semillas del cacao, para llevar a cabo la molienda. Para el proceso extractivo se pesó 100g de los respectivos polvos y con 500ml de agua destilada, se colocaron en un matraz aforado para ser sometidos a reflujo por 30 min. Dichos extractos se filtraron al vacío, para obtener la concentración al 12.5% y al 20% se empleó la fórmula de dilución, en la que el volumen fue exactamente medido, con una pipeta y un balón de aforo, ya obtenidos los extractos estos se conservaron a 4°C, para su posterior uso⁶ (Figura N° 2 AB).



Figura N° 2. A Filtrado al vacío de los extractos en concentración al 12.5% y al 20%, B Reflujo de los extractos acuosos,

Para el método Kirby-Bauer (Difusión en disco), se empleó la cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175, que tras su activación se procedió a comparar de manera visual que el tubo de ensayo con el Streptococcus mutans tenga igual turbidez a la escala 0.5 Mc Farland, para proceder a sembrar un inóculo del microorganismo sobre la superficie del Agar Sangre¹⁴. (Figura N° 3)

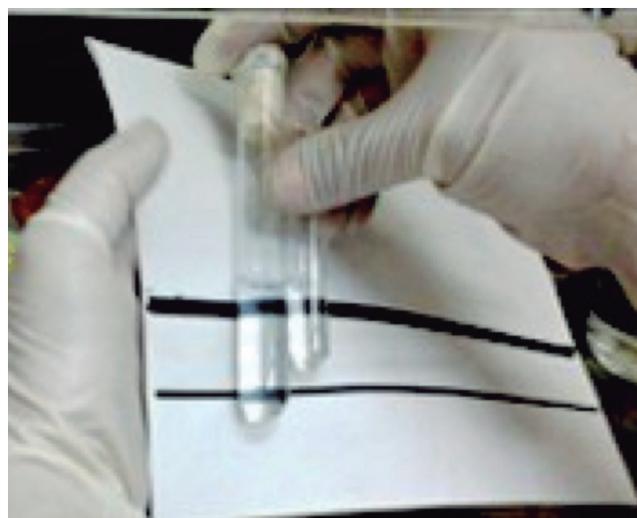


Figura N° 3. Escala 0.5 Mc Farland

Se embebió los discos de papel filtro con 20ul de los extractos tanto de cáscara como de semilla en las dos concentraciones, luego con una pinza estéril se colocaron los discos de papel sobre la superficie del agar sangre, se colocaron 4 discos de papel en cada caja Petri con un total de 20 repeticiones de cada, se dejó reposar por 10 min para que los extractos se difundan, y se colocaron las

20 cajas Petri en la Jarra de Anaerobiosis para incubarlas a 35+/- 2°C, a una concentración del 5% de CO₂ por 24 horas. Se evaluó el efecto antimicrobiano por la medición de halos de inhibición según Mariani & Fernández que consideran como inhibición leve a 6mm, moderada a 8mm y alta a más de 8mm⁶ (*Figura N° 4 y 5*).



Figura N° 4. Método Kirby-Bauer



Figura N° 5. Medición de los halos de inhibición

Análisis estadístico: El análisis se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS versión 20. Para conocer si la muestra tenía distribución normal se utilizaron de pruebas de Kolmogorov Smirnovg y de Shapiro - Wilk, como no hay normalidad se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney con un Intervalo de Confianza a 95%.

RESULTADOS

Se encontraron halos de inhibición, de 8 a 10 mm. (*Tabla N°1*).

EXTRACTO ACUOSO DE CACAO	CONCENTRACIÓN	N	Media	± DE
CÁSCARA	12.5%	20	8,15	± 0,49
	20%	20	8,3	± 0,73
SEMILLA	12.5%	20	8,5	± 0,83
	20%	20	8,2	± 0,52

DE: Desviación Estándar

Tabla N° 1. Media y desviación estándar de los halos de inhibición por grupo de estudio.

EXTRACTO ACUOSO DE CACAO	P
CÀSCARA 12.5%	0.277
SEMILLA 12.5%	

Cuadro N° 1. Prueba U de Mann Whitney de las concentraciones del cacao al 12.5% (càscara, semilla).

El Cuadro N° 1 muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa en el extracto acuoso de cacao tanto de càscara y semilla al 12.5%

EXTRACTO ACUOSO DE CACAO	P
CÀSCARA 20%	0.947
SEMILLA 20%	

Cuadro 2. Prueba U de Mann Whitney de las concentraciones del cacao al 20% (càscara, semilla).

Al evaluar la concentración del 20% no se encontró diferencia estadísticamente significativa. (**Cuadro N° 2**).

DISCUSIÓN

El estudio de las plantas con fines terapéuticos en Odontología se ha incrementado en la actualidad, en su mayoría destinados a controlar o eliminar el principal agente causal de la caries dental como es el *Streptococcus mutans*⁴.

Por los resultados obtenidos se demostró que tanto la càscara como la semilla de cacao presentaron efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*, sin influencia de la concentración, los resultados encontrados en este estudio coinciden con otros estudios in vitro realizados por otros investigadores^{6,10,11}.

En un estudio realizado en Perú, utilizaron 4 derivados del cacao como manteca de cacao, chocolate sin azúcar, chocolate azucarado y cacao en polvo, en forma de extractos acuosos, los mismos que presentaron efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*, encontrando un halo de inhibición de 15 mm con la manteca de cacao y

un halo de 8 mm con el cacao en polvo, 8 mm con el chocolate azucarado, y 9 mm para el chocolate sin azúcar¹⁰, estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación, con relación al efecto antimicrobiano de extractos acuosos de càscara y semillas de cacao.

Otro estudio realizado en Venezuela, evidenció que el extracto acuoso de semillas de cacao, presentó efecto antimicrobiano sobre cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, tras someter a dicha cepa al extracto en concentraciones comprendidas entre 0.01 y 17,5%, encontraron halos de inhibición en todas las concentraciones, pero mencionaron que las mejores fueron entre 10 y 12,5%, con las cuales encontraron halos de inhibición⁶. Estos resultados concuerdan con este estudio, en el que se emplearon concentraciones de 12.5 y 20% del extracto acuoso de càscara y semillas de cacao, hallándose un efecto antimicrobiano de los mismos.

En un estudio comparativo entre el enjuague bucal de clorhexidina al 0.2% versus un enjuague bucal de extracto de cáscara cacao al 0.1%, no presentaron ninguna diferencia significativa, en cuanto a la acción antimicrobiana¹¹, lo cual no fue evaluado en la presente investigación lo cual es una limitación del estudio al no evaluar y comparar la clorhexidina como control positivo, de manera que se recomienda realizarlo en próximos estudios.

CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao presentan efecto antimicrobiano sobre las cepa de *Streptococcus mutans*, no se observó diferencias significativas al comparar los extractos a concentraciones de 12.5% y al 20% por lo que se puede sugerir el uso de estas soluciones en la prevención de la caries.

BIBLIOGRAFÍA

- García B, Saldaña A, Basterrechea M. Glucanos extracelulares bacterianos: estructura, biosíntesis y función. *Revista Cubana de Estomatología*. 2008; 45(3,4).
- Shinada K, Tagashira M, Watanabe. Polifenoles Bráctea reducido Recrecimiento Placa Dental de tres días. *Journal of Dental Reserarch*. 2007; 86: 848-851)
- Chamorro-Jiménez A, Ospina-Cataño A, Arango-Rincón J, Martínez-Delgado C. Acción de la Inmunoglobulina A secretora en el proceso de adherencia de *Streptococcus mutans* al diente humano. *Rev CES Odont*. 2013; 26(2): 76-106.
- Cuéllar O. Obtención del extracto polar etanol:agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. *Revista MVZ Córdoba*. 2010; 17(3).
- Domingo D, López B. Plantas con actividad antimicrobiana. *Esp. Quimioterap*. 2003; 16(4): 385-393.
- Mariani M, G J, Fernández R. Efecto bacteriostático del extracto de semilla de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el *Streptococcus mutans* in vitro. *Odous Científica*. 2010; 11(1): 15-22.
- De la Torre L, Navarrete H, Muriel M, Macía M, B. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador Quito*; 2008.
- Sánchez I, Rubio A. Atención Farmacéutica en la Enfermedad Periodontal (I y II). *Plantas Medicinales*. *Offarm*. 2010; 29(4): 62-67.
- Valenzeula A. El Chocolate un placer saludable. *Revista Chilena de Nutrición*. 2007; 34(3).
- Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura M, et al. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in- vitro and animal experiments. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(8): 639-45.
- Venkatesh N, Vivek D, Ambika G. Comparative evaluation of chlorhexidine mouthrinse versus cacao bean husk extract mouthrinse as antimicrobial agents in children. *European Archives of Pediatric Dentistry*. 2011; 12: 245-249.
- Ecuador P. Análisis del sector cacao y elaborados : Ecuador: Dirección de inteligencia Comercial e Inversiones. Instituto de Promoción de Exportación e Inversiones; 2013.
- Zapata S, Tamayo A, B R. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2013; 18(3): 391-464.
- Sadeghi M, Assar S. An in vitro antimicrobial activity of ten Iranian Made toothpaste. *Dental Research Journal*. 2009; 6(2).