

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO
HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE *Theobroma
cacao* SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,
TRUJILLO - 2019

TRABAJO DE INVESTIGACION PARA OPTAR EL
GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER EN
ESTOMATOLOGÍA

AUTORA:

HERNANDEZ ROSALES STEPHANY CAROLYNE

ORCID ID: 0000-0002-9634-5825

ASESOR:

REYES VARGAS AUGUSTO ENRIQUE

ORCID: 0000-0001-5360-4981

TRUJILLO – PERÚ

2021

1. Título

**EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO
HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE *Theobroma
cacao* SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,
TRUJILLO - 2019**

2. Equipo de trabajo

AUTOR:

HERNANDEZ ROSALES, Stephany Carolyne

ORCID ID: 0000-0002-9634-5825

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, filial Trujillo, estudiante de pregrado.

ASESOR

REYES VARGAS, Augusto Enrique

ORCID: 0000-0001-5360-4981

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias Contables, Financiera y Administrativas, Escuela Profesional de Contabilidad, Trujillo, Perú

JURADO

SAN MIGUEL ARCE, Adolfo Rafael

ORCID ID: 0000-0002-3451-4195

CANCHIS MANRIQUE, Walter Enrique

ORCID ID: 0000-0002-0140-8548

ZELADA SILVA, Wilson Nicolás

ORCID ID: 0000-0002-6002-7796

3. Firma del jurado y asesor

SAN MIGUEL ARCE, Adolfo Rafael

PRESIDENTE

CANCHIS MANRIQUE, Walter Enrique

MIEMBRO

ZELADA SILVA, Wilson Nicolás

MIEMBRO

REYES VARGAS, Augusto Enrique

ASESOR

4. Agradecimiento

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por haber puesto en mí camino a personas que han sido guía, soporte y compañía durante todo el periodo de estudios.

Agradecimiento adecuado al personal de laboratorio Farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, por brindarme las facilidades y la colaboración, para poder desarrollar la investigación dentro de sus instalaciones. De igual manera al área de microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo, por la ayuda brindada durante el desarrollo de la investigación.

Dedicatoria

A Dios quien me ha dado la fe, fortaleza, y salud, permitiéndome luchar para seguir adelante.

A mi padre Orlando Hernandez Mendoza y a mi madre Rosa Rosales Aguilar, que, con su amor, su apoyo incondicional, esfuerzo y sacrificio me han impulsado día a día y gracias a ustedes he llegado a ser lo que soy, son los pilares fundamentales de mi vida, es un privilegio ser su hija.

A mi hermano Patrick Hernandez Rosales y amigas que día a día compartieron sus conocimientos, momentos de alegrías y tristezas y a todos quienes estuvieron a mi lado para apoyarme y ayudarme a llegar a culminar una meta más.

5. Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como **Objetivo:** comparar el efecto inhibitorio in vitro entre cuatro concentraciones de extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, **Metodología:** La población estuvo conformada por cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, los cuales fueron incubados en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya. El diseño metodológico fue experimental, prospectivo, transversal y analítico de tipo cuantitativo y nivel explicativo. **Ficha de recolección de datos:** Para este estudio se recolectó frutos del *Theobroma cacao* en el Centro poblado de Jerillo, distrito de Jepelacio; las cuales fueron transportadas al laboratorio de Farmacología para realizar el extracto hidroetanólico al 10%, 25%, 50%, 75%. Luego fueron enfrentadas a las cepas de *Enterococcus faecalis* en el laboratorio de Microbiología. **Resultados:** El efecto antimicrobiano se evaluó mediante el método de Kirby Bauer. El extracto al 10% obtuvo una media 7.32 mm, al 25% obtuvo una medida 12.05 mm, al 50% obtuvo una medida 15.75 mm y al 75% obtuvo una medida 19.37 mm. Se aplicó la prueba ANOVA, encontrando ($P= 0.000$) que existe diferencia estadística significativa entre los cuatro tipos de concentraciones. En **Conclusión:** el extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 75% presentó mayor efecto antibacteriano frente a *Enterococcus faecalis* que las otras tres concentraciones.

Palabras clave: Antibacteriano, Cacao, Farmacología, *Enterococcus*, Microbiología.

Abstract

The present research work **Objective:** to compare the in vitro inhibitory effect between four concentrations of hydroethanolic extract of *Theobroma cacao* seed against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. The population consisted of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 strains, which were incubated in BHI broth and in Tripticasa Soya Agar. **Methodology:** the study was experimental, cross-sectional, analytical and prospective of a quantitative type and explanatory level. **Data collection sheet:** fruits of *Theobroma cacao* were collected in the town center of Jerillo, district of Jepelacio; which were transported to the Pharmacology laboratory to make the hydroalcoholic extract at 10%, 25%, 50%, 75%. Then they were confronted with the *Enterococcus faecalis* strains in the Microbiology laboratory. **Results:** The antimicrobial effect was evaluated using the Kirby Bauer method. The 10% extract obtained a mean 7.32 mm, at 25% it obtained a measurement of 12.05 mm, at 50% it obtained a measurement of 15.75 mm and at 75% it obtained a measurement of 19.37 mm. The ANOVA test was applied, finding ($P = 0.000$) that there is a statistically significant difference between the four types of concentrations. In **Conclusion:** the hydroethanolic extract of the 75% *Theobroma cacao* seed presented a greater antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* than the other three concentrations.

Keywords: Antibacterial, Cocoa, Pharmacology, Enterococcus, Microbiology.

6. CONTENIDO

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Agradecimiento y Dedicatoria.....	v
5. Resumen y abstract.....	vii
6. Contenido.....	ix
7. Índice de gráficos, tablas y cuadros.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Revisión de la literatura.....	9
2.2.1. Microbiología del fracaso endodóntico.....	9
2.2.2. Fracaso del tratamiento endodóntico.....	10
2.2.3. Enterococcus faecalis.....	12
2.2.4. Theobroma cacao.....	13
III. Hipótesis.....	17
IV. Metodología.....	18
4.1. Diseño de la investigación.....	18
4.2. Población y muestra.....	19
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	21
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	22
4.5. Plan de análisis.....	26
4.6. Matriz de consistencia.....	27
4.7. Principios éticos.....	28

V. Resultados.....	29
5.1. Resultados.....	29
5.2. Análisis de Resultados.....	32
VI. Conclusiones.....	34
Aspectos complementarios.....	35
Referencias Bibliográficas.....	36
Anexos.....	41

7. Índice de tablas

Tabla 1: Efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.....29

Tabla 2: Comparación del tamaño de los halos de inhibición en (mm) según grupo de tratamiento.....30

Índice de gráficos

Gráfico 1: Efecto inhibitorio de cuatro concentraciones del extracto hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	31
---	----

I. Introducción

Enterococcus faecalis, es el factor primordial involucrado con el fracaso en el procedimiento endodóntico es la insistencia de la infección microbiana en los conductos radiculares (1). Los microorganismos involucrados pueden haber sobrevivido a los efectos de la colocación del procedimiento biomecánicos que se da durante la realización de dicho tratamiento (2) o pueden haber irrumpido los conductos, como consecuencia de las filtraciones que se da en la corona de los dientes con procedimientos de conducto obturados. También se ha especificado aislamientos de infecciones pulpo-periapicales y de bolsas periodontales. Investigaciones han manifestado que el microbiota de, los dientes con fracasos en el tratamiento endodóntico difieren generalmente en los conductos de dientes no tratados (3). El microorganismo que se localiza en los dientes con fracaso en el procedimiento endodóntico es predominantemente anaerobia, facultativa y Gram positiva, llamado *Enterococcus faecalis* es el factor que se aísla con más frecuencia (4).

Históricamente y en la actualidad, se han visualizado tendencias hacia la investigación sobre el manejo de sustancias de procedencia natural en diferentes áreas de la odontología, (5,6) encaminada a la reducción de la glucosiltransferasa, la adhesión celular y el aumento celular, y la planificación mediante las cuales los agentes antimicrobianos evitan la formación de placa y logren evitar la caries y enfermedades periodontales. (7) Dicho planteamiento, ha sido reafirmado disponiendo que el extracto de cacao disminuye la producción de ácidos y síntesis de glucanos, por lo tanto, puede inferirse que este producto posee cualidades bacteriostáticas sobre el crecimiento de bacterias, como *Enterococcus faecalis*. (8)

Estudios han demostrado el efecto antimicrobiano del extracto hidroetanólico de *Theobroma cacao*, sin embargo, es escasa la literatura científica que presente su efecto inhibitorio sobre *Enterococcus faecalis*. Por ello, el presente estudio tuvo el propósito de comparar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* (cacao) sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Este presente trabajo es de tipo cuantitativo, prospectivo, longitudinal, y analítico, es de nivel explicativo y de diseño experimental.

Después de lo descrito se formuló el enunciado del problema ¿Existe efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019? Y el objetivo general, Comparar el efecto inhibitorio de cuatro concentraciones del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Y los objetivos específicos fueron, Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 10% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. , seguido de Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 25% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. , seguido de Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 50% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. y por último Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 75% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Esta investigación servirá para futuras investigaciones con *Theobroma cacao* en odontología y También en otras especialidades.

En la parte de metodología el presente estudio tuvo diseño experimental, transversal, prospectivo. La muestra estuvo conformada por 10 placas Petri con cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Estuvo conformada por el conjunto de placas Petri con siembra adecuada de *Enterococcus faecalis* con diferentes concentraciones del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao*, al 10%, 25%, 50% y 75%. La valoración del efecto se ejecutó mediante el método Kirby Bauer. Luego de transcurrir el tiempo de incubación se tomó la medida de los diámetros de los halos de inhibición (mm) por lo cual se utilizó la regla milimetrada digital Mitutoyo Vernier con ISO de calidad 17025. Se concluye que las cepas de *Enterococcus faecalis* si presentan efecto antibacteriano en las concentraciones Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* (cacao), al 10%, 25%,50% y 75%.

La actual investigación está conformada de tres partes, el primero inicia con la introducción (problemática, enunciado del problema, objetivos, justificación), seguido por la revisión de la literatura (antecedentes, bases teóricas); la segunda parte es la metodología donde detalla el tipo, nivel y diseño de la investigación, población y muestra, operacionalización de variables, técnica e instrumento de recolección de datos, plan de análisis, matriz de consistencia y principios éticos. Por último, los resultados, el análisis de resultados, las conclusiones y las recomendaciones.

II. Revisión de la literatura

2.1. Antecedentes

Internacionales

Albán K. (Ecuador,2017). “Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de café *Coffea arabica* y cacao *Theobroma cacao*.” La presente investigación tuvo como **objetivo:** dar a conocer el potencial antimicrobiano de pulpa de café procedente de la parroquia Vilcabamba y cacao en polvo proporcionado por la empresa TULICORP. Se obtuvieron extractos mediante maceración con EtOH (alcohol etílico) absoluto, EtOH: H₂O (50/50) y H₂O a diferentes temperaturas (20°C,40°C y 60°C) y se evaluó su actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Candida albicans*. **Tipo de estudio:** mediante técnicas de sensibilidad in vitro. **Población y muestra:** como difusión en agar y microdilución en caldo. **Material y método:** Como controles positivos para el primer método se usó: discos de gentamicina, amikacina, voriconazol y nistatina y para el segundo método se empleó gentamicina, terbinafina e Itraconazol. **Resultados:** Los extractos de cacao EtOH a 20°C y mezcla EtOH: H₂O a 20°C, 40°C y 60°C **conclusión:** presentaron halos de inhibición entre 6 y 7 mm frente a *Micrococcus luteus* indicando resistencia a una dosis de 80 mg/mL y mediante el método de microdilución en caldo, presentó un CMI a 4000 µg/mL considerando los extractos inhibidores débiles. (9)

Suczhañay M, Álvarez P. (Ecuador, 2016), “Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (*Theobroma cacao*) sobre cepa de *Streptococcus Mutans*: Estudio in vitro.” **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*. (10)

Barragán T, Romero R. (Ecuador, 2017), “Efecto antibacteriano de la Procaína al 2% más cafeína y del Propóleo al 40% sobre cepas de *Enterococcus faecalis*: Estudio in vitro.” **Objetivo:** evaluar la acción antibacteriana de la Procaína al 2% más Cafeína y del Propóleo 40% sobre cepas de *Enterococcus faecalis* como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto. **Materiales y métodos:** La muestra fue de 28 cajas Petri con medio de cultivo Agar sangre de cordero. Fueron sembradas cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, en cada caja, fueron colocados sensidiscos en blancos embebidos con las siguientes sustancias: G1: Hipoclorito de sodio al 5% (control positivo), G2: Propóleo 40%, G3: Procaína al 2% más cafeína al 0,25% (Impletol) y G4: Solución Salina (control negativo). Las muestras fueron sembradas en ambiente anaerobio e incubadas a 35°C, el diámetro de la zona de inhibición bacteriana fue medido después de las 48 horas. Los datos fueron analizados estadísticamente a través del test de Tukey con un nivel de significancia de 5%. **Resultados:** El valor de la media de los halos de inhibición por cada grupo fueron: (G1) 21,54; (G2) 10,18mm y 0,0mm para G3 y G4. Hubo diferencias estadísticamente significantes entre las sustancias utilizadas con el hipoclorito de sodio ($p<0,05$). **Conclusión:** El Propóleo es una sustancia apta para utilizarla como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto, mientras que la procaína más cafeína no mostró ningún efecto antibacteriano sobre *E. faecalis*. (11)

Cuéllar O, Quím T, Guerrero G. (Colombia,2012), “Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L.” **Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana de diferentes fracciones de la cáscara de cacao

(*Theobroma cacao* L.). **Materiales y métodos:** Se evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar de diferentes fracciones de la cáscara de cacao, empleando cepas autóctonas y de referencia ATCC. Posteriormente, se hizo un análisis de estas fracciones por cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. **Resultados:** 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*. **Conclusiones:** Este trabajo es el primer reporte a saber en Colombia sobre actividad antibacteriana in vitro de la cáscara de cacao, el cual resulta ser un avance importante para esta agroindustria. Esta investigación abre paso a otros estudios relacionados para establecer el espectro de inhibición frente a otros microorganismos. (12)

Ayu D, Munadziroh E, Mohammad R. (Indonesia 2010), “Concentración de extracto de semilla de cacao como material natural para prevenir el crecimiento de *Streptococcus mutans*”. **Objetivo:** desarrollar un material procedente de un producto natural que es el cacao y conocer su concentración efectiva para reducir el número de *Streptococcus mutans*. Se utilizó el método de dilución en concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56% y 0.78%. **Resultado:** se obtuvo que no hubo diferencia significativa de la concentración de 100%, 50%, 25% donde no hay una colonia en crecimiento y la concentración de 12.5%. la colonia promedio es 0.33 mm. **Conclusión:** las concentraciones que inhibieron el crecimiento de *Streptococcus mutans* fueron a partir de 12.5% y 25%, 50% y 100% donde no hay colonias de crecimiento. (13)

Nacionales

Poma E. (Perú, 2018), “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. Tacna 2018”. 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. (14)

Santos T, Szwom R, Almeida R. (Lima 2020), “Compuestos naturales para reducir la carga bacteriana de la cavidad oral: un artículo de revisión.” **Objetivo:** actualmente, existe una amplia gama de productos farmacéuticos que ofrecen grandes beneficios para el tratamiento de diversas enfermedades orales. La mayoría de estos productos son de origen sintético con propiedades antibacterianas, pero existen numerosos efectos secundarios asociados con su uso. **Resultados:** una alternativa es el uso de productos naturales de plantas e insectos en la reducción de la carga bacteriana de la cavidad oral como la manzanilla (*Chamaemelum nobile* (L.) All.), el cacao (*Theobroma cacao* L.), el aloe (*Aloe vera* L.), la moringa (*Moringa oleífera* Lam.), el orégano

(*Origanum vulgare* L.), coco (*Cocos nucifera* L.), ajo (*Allium sativum* L.), clavo (*Syzygium aromaticum* L.), cardamomo (*Elettaria cardamomum* L.), stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), miel de abeja y propóleos, abordados en esta revisión de la literatura. Esta revisión intenta abordar el uso de diferentes compuestos naturales para reducir la carga bacteriana de la cavidad oral. **Conclusion:** existen varios estudios sobre los efectos de los productos naturales por parte del hombre en la medicina, donde hay una gran cantidad de trabajos y publicaciones relacionadas con sustancias naturales con ingredientes activos para reducir la carga bacteriana de la cavidad oral. (15)

Ruiz D. (Trujillo, 2019), “Comparación del efecto antibacteriano entre el extracto y colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* atcc 25175, Trujillo – 2018”. Tuvo como **Objetivo:** comparar la diferencia del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos y el colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Metodología:** El diseño fue experimental, transversal, analítico y prospectivo de tipo cuantitativo y nivel explicativo. **Ficha de recolección de datos:** Para este estudio se recolectó frutos del *Theobroma cacao* en la ciudad de Juanjuí, San Martín; las cuales fueron transportadas al laboratorio de Farmacognosia para realizar el extracto de 12.5%, 25%, 50% y el colutorio al 12.5%. Luego fueron enfrentadas a las cepas de *Streptococcus mutans* en el laboratorio de Microbiología. Se usó el método de Kirby Bauer, luego se midió el halo de inhibición utilizando la regla milimetrada Vernier digital marca Mitutoyo. Los **resultados:** mostraron que a mayor concentración, más se incrementa el halo inhibitorio de los extractos hidroetanólicos, es decir, aumenta la efectividad antibacteriana; siendo el colutorio de 12.5% más efectivo que los extractos hidroetanólicos de 12.5%, 25%, 50% .En **Conclusion:** El colutorio de 12.5% a base de semillas de *Theobroma cacao* presenta mayor efectividad antibacteriana que los extractos hidroetanólicos a base de semillas de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (16)

2.2. Revisión de la literatura

2.2.1. Microbiología del fracaso endodóntico

Casi 700 especies bacterianas pueden ser encontradas en la cavidad oral, cualquier individuo puede albergar de 100-200 de estas especies, haciendo muy probable si no se tienen los cuidados y técnicas apropiadas la contaminación en el conducto. Una vez que el canal de la raíz está infectado, progresa apicalmente, lo que conduce a la periodontitis apical. Las infecciones endodónticas tienen una naturaleza polimicrobiana, con bacterias anaerobias que se encuentran predominando en el microbiota en infecciones primarias. Existen varios microorganismos relacionados con infecciones e implicados en la infección persistente intrarradicular. (17)

Los factores de virulencia pueden dar pistas importantes en la patogenicidad. Los productos potencialmente perjudiciales liberados o las propiedades que poseen ciertas especies pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Los posibles patógenos endodónticos tienen una producción potencial de factores de virulencia, pero no se sabe si estos factores se producen in vivo. Algunos estudios han informado del descubrimiento de factores de virulencia en los conductos radiculares infectados, incluyendo lipopolisacáridos, enzimas y metabolitos que se han asociado con signos y síntomas de enfermedad. Sin embargo, aún no se conoce qué especies, dentro del sistema de conductos, producen esos factores. (18)

Existen unos requisitos para el patógeno endodóntico, los cuales son necesarios para que un microorganismo se establezca por él mismo en el sistema de conductos y participe en la patogénesis de la enfermedad perirradicular:

1. El microorganismo debe presentarse en un número suficiente para iniciar y mantener la enfermedad perirradicular.
2. El microorganismo debe presentar factores de virulencia, los cuales deben expresarse durante la infección del conducto radicular.

3. El microorganismo debe estar localizado espacialmente en el sistema de conductos desde el cual él o sus factores de virulencia puedan llegar a los tejidos perirradiculares.
4. El ambiente del conducto debe permitir la supervivencia y crecimiento del microorganismo y proporcionarle señales que estimulen la expresión de los genes de virulencia.
5. La inhibición de los microorganismos debe estar ausente o presente en bajo número en el ambiente del conducto radicular.
6. El hospedador debe montar una estrategia defensiva en los tejidos perirradiculares, inhibiendo la propagación de la infección. Este proceso tendrá como resultado el daño tisular.

Entre las infecciones intrarradiculares primarias encontramos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos. En la primera se hallan los bacilos Gram-negativos (*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Mitsuokella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*), bacilos Gram-positivos (*Eubacterium*), cocos Gram-negativos (*Peptostreptococcus*), cocos Gram-positivos (*Veillonella*), espiroquetas (*Treponema*). Por otra parte, los anaerobios facultativos son: cocos Gram-positivos (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*), bacilos Gram-negativos (*Campylobacter*, *Eikenella*, *Capnocytophaga*), bacilos Gram-positivos (*Lactococcus*, *Actinomyces*). (18)

2.2.2. Fracaso del tratamiento endodóntico

Las principales causas del fracaso del tratamiento endodóntico, es por el motivo de la eliminación incompleta del tejido pulpar y los microorganismos presentes en el sistema de canales radiculares. (19) En la mayoría de los casos, el fracaso del tratamiento de endodoncia es resultado de la acción de los microorganismos que persisten en la porción apical del sistema de canales radiculares, incluso en los dientes bien tratados. Se ha demostrado que parte del espacio del canal radicular a menudo permanece

intacto durante la preparación quimio-mecánica, independientemente de la técnica y de los instrumentos empleados. Zonas sin instrumentar pueden contener bacterias o restos de tejido necrótico, aunque la obturación de los canales radiculares parezca ser radiográficamente adecuada. Dentro del sistema de canales, las bacterias se encuentran ubicadas en áreas como istmos, ramificaciones, deltas, irregularidades de los canales y túbulos dentinarios. (20)

Sin la instrumentación biomecánica, los irrigantes o los medicamentos no son capaces de alcanzar dichos sitios, es probable que el suministro de nutrientes para las bacterias situadas ahí permanezca inalterado después de la terapia radicular. Sin embargo, las bacterias presentes en áreas tales como los túbulos dentinarios pueden tener un sustrato reducido drásticamente. En tales regiones anatómicas, las bacterias aisladas por el relleno radicular por lo general mueren. A pesar de esto, algunas especies bacterianas pueden sobrevivir durante periodos relativamente largos. Así, si el relleno radicular falla, proporcionando un sello incompleto, la filtración de fluidos desde el tejido periapical puede proporcionar sustrato para el crecimiento bacteriano. Lo mismo puede ocurrir si se produce alguna filtración desde coronal. (20)

Según las condiciones presentes en los canales radiculares, ciertas bacterias son más capaces de sobrevivir y multiplicarse que otras. Así, aun cuando es posible encontrar anaerobios facultativos en dientes con necrosis pulpar, es más frecuente encontrar anaerobios estrictos en canales infectados de manera primaria (es decir, sin tratamiento endodóntico previo y con pulpa necrótica) y anaerobios facultativos en los casos de tratamientos de endodoncia fallidos. (21,22)

La flora microbiana presente en los canales después del fracaso del tratamiento de endodoncia se limita a un pequeño número de especies microbianas, predominantemente Gram positivas. Anaerobios facultativos, especialmente *Enterococcus spp*, son los más frecuentes en estos casos y entre ellos, *Enterococcus faecalis* es la especie más

frecuentemente aislada. Estudios han demostrado que la frecuencia de especies de *Enterococcus* en raíces obturadas que presentan periodontitis apical puede llegar incluso a un 70%. (21,23)

2.2.3. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. No presenta una reacción con la catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno, puede producir una reacción pseudocatalasa si se cultiva en agar sangre, sin embargo, ésta es muy débil. *E. faecalis* puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal. (24) *Enterococcus faecalis* puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital. La existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a prácticamente todos los antibióticos en uso. (24)

La gran mayoría de las especies de *Enterococcus* habitan normalmente en el tracto gastrointestinal, y se encuentran en una concentración de más de 10⁷ organismos por gramo de heces fecales. Son miembros del microbiota natural del tracto genital femenino y no representan daños para el organismo en condiciones normales. Sin embargo, en ocasiones se comportan como patógenos oportunistas y pueden causar diferentes enfermedades, sobre todo en aquellos pacientes que han sido hospitalizados por períodos prolongados o sometidos a terapia antimicrobiana previa, que los convierte en un importante patógeno nosocomial. (25)

Enterococcus faecalis es un patógeno oportunista asociado con infecciones orales, entre ellas periodontitis marginales, infecciones del canal radicular y lesiones perirradiculares. (26) Se ha informado una correlación entre la prevalencia de este microorganismo en los canales radiculares de infecciones endodónticas primarias y secundarias y la presencia de este microorganismo en otros sitios de la cavidad oral, como en el surco gingival, la mucosa bucal, el dorso de lengua y las amígdalas en un mismo

paciente, sugiriendo que la invasión de los canales radiculares por parte del microorganismo proviene de otros reservorios de la cavidad oral donde se encuentra en forma habitual. (26,27)

Enterococcus faecalis tiene la habilidad de trasladarse desde el canal radicular de dientes infectados al sistema de ganglios linfáticos submandibulares de ratones libres de gérmenes, lo que sugiere que este microorganismo puede desempeñar un rol en la patogénesis de las infecciones oportunistas como bacteremia, endocarditis, y meningitis bacteriana, entre otras. (28,29) También se ha informado de importantes enfermedades sistémicas provocadas por la llegada de este patógeno al torrente sanguíneo a través de la terapia endodóntica, entre ellas abscesos cerebrales y septicemias, particularmente graves en pacientes inmunocomprometidos. (29)

El hipoclorito de sodio sigue siendo un irrigante eficaz tanto a concentración de 2.5% como a concentración de 5% lo que ha sido comprobado a través de diversas investigaciones. A pesar de los efectos irritantes que causa el hipoclorito de sodio sobre los tejidos blandos y sus limitantes en el uso de tratamientos endodónticos, tiene la propiedad de contrarrestar la carga microbiana de los conductos radiculares, dentro de los que esta *Enterococcus faecalis*. (30)

2.2.4. *Theobroma cacao*

Actualmente se está buscando productos naturales que puedan tener actividad antimicrobiana, disminuyendo los efectos colaterales de los productos convencionales. El cacao es originario de las selvas del Amazonas, cacao viene de la palabra maya “Ka'kaw”. Pertenece a la familia Malvaceae, al género *Theobroma*, que significa el “alimento de los dioses”, a la especie *Theobroma cacao* L, tiene 22 especies descritas, ubicadas principalmente en Sudamérica y partes de Centroamérica. (31, 32)

Las semillas del cacao son consideradas la materia prima para las industrias debido a que (33) “se obtienen productos semielaborados como, pasta de

cacao, cacao en polvo y manteca de cacao” dicha pasta de cacao al igual que la cáscara de cacao son empleados como alimento de animales o en la jabonería.

Desde su descubrimiento se han desarrollado más de cien usos medicinales del cacao. Los tratamientos que utilizan los recursos del árbol del cacao sirven para curar o aliviar el cansancio, la delgadez extrema, la fiebre, los problemas cardiacos, la anemia o los problemas renales e intestinales. El fruto es ideal para tratar tumores de la piel, mientras que la resina obtenida de la cáscara es empleada en las heridas como cicatrizante para mordeduras de serpiente, por otro lado, las semillas se usan para detener hemorragias, curar la anemia y la fiebre. (34) En varios países la manteca de cacao es empleada para curar quemaduras, resequedad en la piel, sarampión, fiebre, reumatismo y es conocida por su propiedad antiséptica. (35)

Los granos de cacao son las semillas del árbol *Theobroma cacao*. Cada semilla consta de dos cotiledones y del pequeño embrión de la planta, todos cubiertos por la piel (cáscara). Los cotiledones almacenan el alimento para el desarrollo de la planta y dan lugar a las dos primeras hojas de la misma cuando la semilla germina. (36)

La composición física y química de los granos de cacao y de sus subproductos es muy compleja, cambiando a lo largo del crecimiento del grano, y dependiendo del proceso al cual éste es sometido. (36)

A los flavonoides del cacao se le aplica efectos antioxidantes, debido a la disminución del riesgo de difusión por enfermedades coronarias, también pueden evitar el cáncer, por la posibilidad de controlar las reacciones de oxidación de LDL o daños de ADN. (37,38)

Una alimentación rica en cacao afecta con una gran capacidad en el procedimiento de la enfermedad periodontal, ya que este elimina el estrés oxidativo de las lesiones periodontales. Y de manera particular se le implica

un papel anticariogénico ya que inhibe la glucosiltransferasa del *Streptococcus mutans*, obstaculizando el proceso de adhesión. (39)

El flavonoide se caracteriza por mostrar una estructura de 3 anillos, que incluye 2 anillos aromáticos y un heterociclo oxigenado central. Algunos autores concuerdan que el cacao muestra flavonoides como la epicatequina, también mencionan la aparición de catequina y procianidina, además señala que la epicatequina en el cacao se da en mayores porcentajes, correspondiente al 92%, igual a una proporción 11:1 más que la catequina. (40)

Las epicatequinas y catequinas muestran las bases fundamentales para el estudio de procianidinas, las mismas que se dan por la actuación de la enzima polifenoloxidasas, que une de 2 a 10 unidades de epicatequinas, de modo que las procianidinas que lucen más de 6 unidades son menos absorbidas, pues tienen impedimento en cruzar las membranas celulares. Además, a las epicatequinas del cacao se le aplica la acción “anti-glucosiltransferasa”. (41) Por otro lado, al colocar los granos de cacao a mayores temperaturas, se da a cabo un desarrollo de epimerización, que se trata en el cambio de epicatequinas en catequinas . (42)

Las catequinas son flavonoides que se califica por mostrar un mayor peso molecular, son sólidos a temperatura ambiente, se dan puntos de altas mezclas y se diluye con simplicidad en solventes polares. Son los encargados de dar el color morado a las semillas del cacao. (43) Es muy fundamental opinar que los granos de cacao no fermentados son ricos en flavonoides, como epicatequinas y catequinas, que abarca el 12 al 18% del peso seco del grano entero, tras la fermentación de estos elementos padecen reacciones de oxidación y polimerización minimizando su contenido. (44)

Las catequinas son flavonoides que se distingue por mostrar un alto peso molecular, es sólido a temperatura ambiente, muestran puntos de unión mayores y se diluyen con facilidad en solventes polares. Son los encargados de dar el color morado a las semillas del cacao. (44)

Es fundamental opinar que los granos de cacao no fermentados son ricos en flavonoides, como epicatequinas y catequinas, que comprenden del 12 al 18% del peso seco del grano entero, ya que tras la fermentación estos componentes padecen reacciones de oxidación y polimerización reduciendo su contenido. (44)

III. **Hipótesis**

Hipótesis de investigación:

Hi: Existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.

Hipótesis Estadística

Hipótesis nula:

H0: No existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.

Hipótesis alterna:

H1: Si existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.

IV. Metodología

4.1. Diseño de la investigación

Tipo de Investigación

- Experimental, Puesto que el investigador ha manipulado la variable independiente y su efecto sobre la variable dependiente. (45) En el estudio se manipuló las concentraciones del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao*.

- Prospectivo, el investigador registra los eventos a partir de los hechos ocurridos. (45) Este estudio midió cada resultado según los objetivos propuestos y se colocó en la ficha de recolección de datos.

- Transversal, porque la información fue tomada en un momento dado del tiempo. (45) Este estudio midió el efecto antibacteriano a las 48 horas de ser expuestos a los extractos.

- Analítico, porque el estudio se centró en una relación causa-efecto. (45) Este estudio determinó la causa que presentaron los extractos en diferentes concentraciones de la cáscara de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis*.

Nivel de investigación:

La actual investigación es de nivel explicativo

- Explica el comportamiento de una variable en función de otra(s); por ser estudios de causa-efecto requieren control y debe cumplir otros criterios de causalidad. El control estadístico es multivariado a fin de descartar asociaciones aleatorias, casuales o espurias entre la variable independiente y dependiente. (45)

Diseño de la investigación:

- El diseño del presente trabajo de investigación es experimental: experimento puro de grupos en paralelo. Se toman grupos, luego a cada grupo se le miden a cada uno por separado. (45)

4.2.Población y muestra

Población de estudio:

Estuvo conformada por el conjunto de placas Petri con siembra adecuada de *Enterococcus faecalis* con diferentes concentraciones del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao*, en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo, provincia de Trujillo, Departamento la Libertad.

Criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- Placas Petri con siembra adecuada de cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- Placas Petri con el contenido extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* y que presenten inhibición o no del crecimiento bacteriano.

Criterios de exclusión

- Se excluirá las placas Petri con signos de contaminación.

Muestra:

La muestra estuvo conformada por 10 repeticiones de cada una de las concentraciones al 10%, 25%, 50% y 75%; al ser un estudio in vitro el tamaño de la muestra se determinó mediante fórmula estadística.

Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra para el presente estudio de comparación de grupos se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * 2\sigma_{\delta}^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$; que es un coeficiente de confianza del 95%

$Z_{\beta} = 0.84$; que es un coeficiente de la distribución normal para una potencia de prueba del 80%

$\sigma_{\delta}^2 = 0.8 (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)$ valor asumido por no haber información previa completa de estudios similares (\bar{X} , S)

Luego Reemplazando los valores en la fórmula anterior se obtiene:

$$n = 10 \text{ repeticiones}$$

Es decir, se necesitó aproximadamente 10 placas o discos experimentales seleccionados aleatoriamente para cada grupo.

4.3. Definición y operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN		INDICADOR	VALOR
			TIPO	ESCALA		
Extracto Hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> .	Extracto etanólico en diversas concentraciones a emplear.	Concentración del extracto	Cuantitativa	Razón	Concentración (%)	Concentraciones al: 10%. 25%. 50%. 75%.
Efecto inhibitorio sobre <i>Enterococcus faecalis</i> .	Capacidad de eliminar e inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano.	Halos de inhibición	Cualitativa	Razón	Prueba de difusión en discos Kirby – Bauer	1.-Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm. 2.- Bajo (entre 8 a 14 mm). 3.-Medio (muy sensible ++) para un diámetro entre 14 a 20mm. 4.- Sumamente sensible (diámetro superior a 20 mm)

4.4. Técnica e instrumento de recolección de datos

Técnica

Se realizó la observación y medición de los halos de inhibición generados, se realizó con la ayuda de elementos técnicos tales como instrumentos de recolección de datos.

Instrumento

Para la medida de los halos de inhibición se utilizó la regla de Vernier digital marca Mitutoyo, Modelo 500 – 196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper 0-150 mm /0-6”, por estar calibrado con ISO de calidad 17025. (Anexo 2)

Procedimientos

Obtención del extracto Hidroetanólico de la semilla de cacao

1. Recolección e identificación taxonómica

5 kg de frutos de cacao, se recolectaron, En el centro poblado de Jerillo, distrito de Japelacio, provincia de Moyobamba, durante el mes de junio del año 2019 se recolectó 11 frutos de cacao. Se envolvió en papel Kraft y se transportó en cajas de madera, bien selladas vía terrestre.

Un ejemplar completo de la planta se llevará al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación y posterior verificación taxonómica.

Se solicitó certificado de buenas prácticas ecológicas del material vegetal Theobroma cacao. (Anexo 4).

2. Preparación de la muestra

Selección: Los frutos de cacao recolectados fueron transportados al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde se seleccionaron aquellos frutos en buenas condiciones.

Lavado y desinfección: Los frutos fueron lavados y desinfectados hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente los frutos se cortaron de manera vertical y se separará las semillas. Luego se lavaron las semillas con agua para separar el mucílago.

Secado: las semillas son colocadas sobre papel Kraft y sometidas a secado primero a temperatura ambiente por 24 horas, y luego en la estufa de circulación de aire a una temperatura de 40°C.

Tostado: Una vez secado las semillas, estas se llevarán a tostar a 140°C por 10 minutos, que permitirá el proceso de epimerización que permitirá la transformación de epicatequinas en catequinas. Luego del tostado se dejará enfriar las semillas de cacao por 10 minutos. (46)

Pulverización: Las semillas tostadas se pulverizaron con ayuda de un molino.

Tamizaje: Los polvos de las semillas, fueron tamizados utilizando el tamiz N° 0.7.

Almacenamiento: Los polvos de semilla tamizados, fueron guardados en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha.

3. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE SEMILLA DE CACAO. (47,11)

Se pesarán con exactitud 400 g de polvo de semilla de cacao, previamente tamizados. Luego se colocarán, en un balón de vidrio de 2 litros de capacidad y se añadirán 500 mL de la mezcla etanol-agua (80:20). Se mezclarán bien, y se llevarán a reflujo por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se enfriará y se filtrará el extracto hidroetanólico al vacío, con papel de filtro Whatman N° 1.

Posteriormente, el extracto hidroetanólico se concentrará en un rotavapor hasta obtener extracto blando. Luego se llevará a secar a la estufa de circulación de aire a 40 °C hasta obtener el extracto seco. A partir del extracto seco se preparará las concentraciones de 10% (100 mg/mL), 25% (250 mg/mL), 50 % (500 mg/mL) y 75% (750mg/mL) disueltos en la mezcla etanol-agua (80:20). Finalmente, los extractos Hidroetanólico se guardarán en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su posterior utilización.

4. Obtención de cepas de *Enterococcus faecalis*

Evaluación del efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Reactivación de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Para este estudio se utilizará cultivo liofilizado de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

La reactivación se realizará sembrando el cultivo liofilizado en un balón de 50 ml con 25 mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) o Infusión Cerebro Corazón, luego se incubará a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Para evaluar pureza se sembrará por estría en Agar *Enterococcus* e incubará a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se elegirá una colonia compatible con *Enterococcus* para realizar coloración gram.

La cepa se mantendrá en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), hasta su posterior utilización.

5. Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

A partir del extracto hidroalcohólico obtenido se procederá a preparar las concentraciones de 10, 25, 50 y 75%.

6. Evaluación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer.

Se realizará mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar. Para lo cual se procederá de la siguiente manera:

Estandarización del inóculo de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. La cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. mantenidos en Caldo BHI se sembrarán en Agar TSA, e incubará bajo condiciones de microaerofilia a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener colonias jóvenes.

Luego, de 24 horas cada colonia de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, se colocará en caldo BHI y se harán suspensiones con una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5x 10⁸ bact./mL).

7. Inoculación

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1x10⁸ ufc/ml), se tomará una alícuota de 100µl y se colocaran en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuirá la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa. Se dejará

secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

8. Preparación de los discos con el extracto hidroalcohólico de la semilla de *Theobroma cacao*.

Se prepararán discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales serán embebidos con 30 uL de cada una de las concentraciones de 10, 25, 50 y 75% del extracto hidroalcohólico. Luego, con una pinza estéril, los discos serán colocados sobre las placas de Müller Hinton inoculadas con la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

9. Incubación

Se incubarán las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las sustancias a evaluar, a 37°C durante 24 y 48 horas en microaerofilia se utilizarán jarra Gaspak con el método de la vela.

10. Lectura de los resultados

Después del tiempo de incubación 24 a 48 horas se examinará cada placa y se medirán los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco para lo cual se utilizará regla milimetrada, abarcando el diámetro del halo.

Se realizarán 10 repeticiones de cada concentración.

4.5.Planteamiento de análisis

Para la presente investigación se utilizaron tablas de resumen de una entrada, así como gráficos adecuados para presentar los resultados de la investigación.

Se utilizó el análisis de varianza para un diseño completamente al azar para determinar la efectividad antibacteriana de las diferentes concentraciones y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, ambas pruebas estadísticas considerando un nivel de significancia de 0.05.

Para realizar el análisis se contaron con el apoyo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel y el programa estadística v 10.

El análisis o discusión de resultados se realizó según los objetivos formulados; se realizará la discusión con los antecedentes; para finalmente formular las conclusiones y recomendaciones pertinentes.

4.6. Matriz de consistencia

TITULO: EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE *Theobroma cacao* SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, TRUJILLO – 2019.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLE	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA
¿Existe efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> atcc 29212, Trujillo – 2019?	<p>Objetivo General:</p> <p>- Comparar el efecto inhibitorio de cuatro concentraciones del extracto Hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <p>1. Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> al 10% sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>2. Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> al 25% sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>3. Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> al 50% sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>4. Evaluar el efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> al 75% sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p>	<p>Extracto Hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i></p> <p><i>Enterococcus faecalis</i></p>	<p>Hipótesis de investigación:</p> <p>Hi: Existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> atcc 29212, Trujillo – 2019.</p> <p>Hipótesis Estadística</p> <p>Hipótesis nula:</p> <p>H0: No existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> atcc 29212, Trujillo – 2019.</p> <p>Hipótesis alterna:</p> <p>H1: Si existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> sobre <i>Enterococcus faecalis</i> atcc 29212, Trujillo – 2019.</p>	<p>Tipo y nivel de Investigación.</p> <p>El tipo de la investigación es cuantitativa, experimental, prospectivo, transversal y analítico. De nivel explicativo.</p> <p>Diseño de investigación</p> <p>Experimental puro</p> <p>Población y muestra</p> <p>La población y la muestra estuvo conformada por 10 repeticiones para cada grupo para las distintas concentraciones al 10%, 25%, 50% y 75%</p> <p>Muestreo no probabilístico por conveniencia</p>

4.7. Principios éticos:

La investigación presenta datos reales, investigados y elaborados auténticamente, sin cometer copia de algún otro estudio. La información recabada mediante la aplicación del instrumento es confidencial y estrictamente solo para el estudio.

La investigación toma en cuenta todos los principios y valores éticos estipulados por la Uladech católica.

- **Beneficencia y no maleficencia:** Asegura el bienestar de las personas que contribuyen en la investigación. La conducta del investigador responde a las siguientes reglas generales: no causar daño, disminuir los posibles efectos adversos y maximizar los beneficios.
- **Justicia:** El investigador ejerce un juicio razonable, ponderable y toma las precauciones necesarias para asegurarse de que sus sesgos. Se reconoce que la equidad y la justicia otorgan a todas las personas que participan en la investigación derecho a acceder a sus resultados.
- **Integridad científica:** La integridad del investigador resulta especialmente relevante cuando, en función de las normas deontológicas de su profesión, se evalúan y declaran daños, riesgos y beneficios potenciales que puedan afectar a quienes participan en una investigación.

V. RESULTADOS:

5.1.Resultados:

Tabla 1: Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

<i>Concentraciones</i>	<i>ni</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>P</i> <i>(ANOVA)</i>
<i>Clorhexidina 0.12%</i>	<i>10</i>	<i>24.39</i>	<i>0.52</i>	<i>0.0000</i>
<i>Etanol 70°</i>	<i>10</i>	<i>7.07</i>	<i>0.16</i>	
<i>10%</i>	<i>10</i>	<i>7.32</i>	<i>0.43</i>	
<i>25%</i>	<i>10</i>	<i>12.05</i>	<i>0.32</i>	
<i>50%</i>	<i>10</i>	<i>15.74</i>	<i>0.47</i>	
<i>75%</i>	<i>10</i>	<i>19.37</i>	<i>0.76</i>	

p*: prueba ANOVA

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

Interpretación: En la tabla observamos el promedio de los halos de inhibición a las diferentes concentraciones de 10%, 25%, 50%, 75%, C⁺, C⁻, frente a *Enterococcus faecalis*. Se determinó una medida de 7.07mm para la concentración de 10%, una medida de 12.05mm a la concentración de 25%, una medida de 15.74mm a la concentración 50%, una medida de 19.37mm a la concentración de 75%, así mismo una medida de 24.39mm al C⁺, una medida de 7.07mm al C⁻. Se utilizó la prueba ANOVA y se obtuvo P= 0.0000, lo cual indica que sí existe diferencia estadística significativa entre las cuatro concentraciones y los controles.

Tabla 2: Comparación del tamaño de los halos de inhibición en (mm) según grupo de tratamiento

<i>Concentraciones</i>	<i>ni</i>	<i>Grupos para alfa = 0.05</i>				
		<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>
<i>Etanol 70°</i>	<i>10</i>	<i>7.07</i>				
<i>10%</i>	<i>10</i>	<i>7.32</i>				
<i>25%</i>	<i>10</i>		<i>12.05</i>			
<i>50%</i>	<i>10</i>			<i>15.74</i>		
<i>75%</i>	<i>10</i>				<i>19.37</i>	
<i>Clorhexidina 0.12%</i>	<i>10</i>					<i>24.39</i>

Interpretación: Según la prueba de Duncan se observan las diferencias de las concentraciones, excepto que el grupo control negativo con la concentración del cacao al 10% no hay diferencia entre ellos.

También muestra el Efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis*, a las concentraciones del 10%, 25%, 50% y 75%, apreciándose que, al aumentar las concentraciones del extracto, mayor es el efecto antibacteriano.

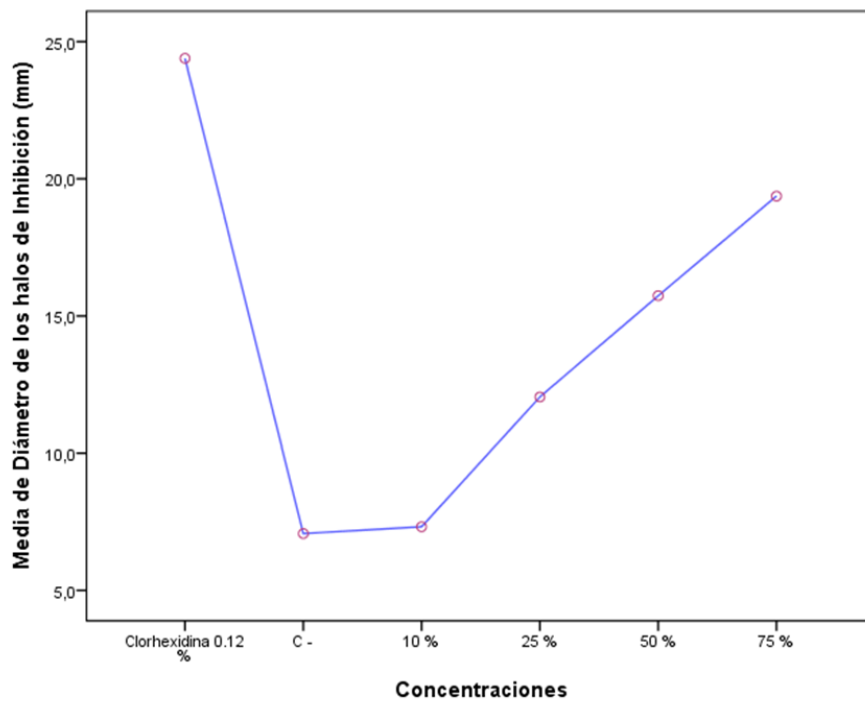


Gráfico 1: Efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* en concentraciones de 10%, 25%, 50% y 75% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Interpretación: Observamos que hay diferencia entre las concentraciones donde a medida que aumenta la concentración, aumenta el diámetro de halo de inhibición.

5.2. Análisis de los resultados

Una vez obtenidos los resultados, se contrastó los antecedentes de acuerdo a los objetivos planteados:

- En la presente investigación experimental, in vitro, se comparó la efectividad inhibitoria de los extractos hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* (cacao), a concentraciones del 10%, 25%, 50%, 75%, frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. A medida que aumenta la concentración se obtiene mayores halos de inhibición. Así mismo la acción antibacteriana del extracto hidroetanólico al 75% fue significativamente mayor que al 10%, Datos semejantes encontró Sucuzhañay M, Álvarez P.¹¹ el cual concluyo que los extractos acuosos de cáscara y semilla de cacao presentaron efecto antimicrobiano. 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.
- Según Barragán T, Romero R.¹² El uso de agentes fitoterápicos en las áreas de la salud tienen cada vez más realce debido a su capacidad antibacteriana y gran biocompatibilidad. Al evaluar la acción antibacteriana de la Procaína al 2% más Cafeína y del Propóleo 40% sobre cepas de *Enterococcus faecalis* como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto. El valor de la media de los halos de inhibición por cada grupo fue: (G1) 21,54mm; (G2) 10,18mm y 0,0mm para G3 y G4. Hubo diferencias estadísticamente significantes entre las sustancias utilizadas con el hipoclorito de sodio ($p<0,05$). El Propóleo es una sustancia apta para utilizarla como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto, mientras que la procaína más cafeína no mostró ningún efecto antibacteriano sobre *E. faecalis*.
- Estudios realizados por, Cuéllar O, Quím T, Guerrero G.¹³, la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar de diferentes fracciones de la cáscara de cacao, empleando cepas autóctonas y de referencia ATCC. Presentó actividad antibacteriana frente a diferentes bacterias como *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. Este trabajo es el primer reporte a saber en Colombia sobre actividad antibacteriana in vitro de la cáscara de cacao, el cual resulta ser un avance importante para esta agroindustria. Esta investigación abre paso a otros estudios relacionados para establecer el espectro de inhibición frente a otros microorganismos.

- Según Poma E.¹⁴, presento resultados similares, realizaron extractos de etanol de la cascara de cacao (*Theobroma cacao*), en diferentes concentraciones, en muestras microbiológicas, en donde se aplicó el extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao*), 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. Donde se obtuvo 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. Se concluye que el extracto etanólico de cáscara de cacao a diferentes concentraciones presenta efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de las bacterias.
- Estudios realizados por Santos T, Szwom R, Almeida R.¹⁵, se dice que los compuestos naturales para reducir la carga bacteriana de la cavidad oral ofrecen grandes beneficios para el tratamiento de diversas enfermedades orales. Por ello el estudio de Ruiz D.¹⁶ realizo la comparación del efecto antibacteriano entre el extracto y colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* una de las bacterias que se encuentran alojadas en la cavidad oral, en sus resultados mostraron que a mayor concentración, más se incrementa el halo inhibitorio de los extractos hidroetanólicos, es decir, aumenta la efectividad antibacteriana; siendo el colutorio de 12.5% más efectivo que los extractos hidroetanólicos de 12.5%, 25%, 50% .En Conclusion: El colutorio de 12.5% a base de semillas de *Theobroma cacao* presenta mayor efectividad antibacteriana que los extractos hidroetanólicos a base de semillas de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

VI. CONCLUSIONES:

La investigación se desarrolló dentro del marco de los objetivos propuestos conformemente, la investigación concluye:

1. Con este trabajo de investigación llegamos a las siguientes conclusiones, se demostró que la concentración del extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 10%, 25%, 50% y 75%, si presentó efecto antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
2. El extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 75%, presentó mayor efecto antibacteriano que las otras 3 concentraciones frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, pero no supero al efecto del control positivo (clorhexidina al 0.12%).
3. El extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* al 10%, presentó efecto antibacteriano bajo, que las otras 3 concentraciones frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
4. Este informe queda como sustento o base para nuevos estudios recomendando seguir con investigaciones acerca de este producto natural que es el cacao, con otro tipo de bacterias y hongos.

Aspectos complementarios

1. Realizar estudios, in vivo, para la elaboración o formulación de enjuagatorios bucales, dentífricos que contengan extracto hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* (cacao).
2. Impulsar a realizar estudios de más plantas medicinales para impulsar conocimiento de su acción sobre bacterias que causan la caries dental o causan fallas en los tratamientos pulpares.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Liébana J. Microbiología Oral. 2 ed. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U.; 2002.
2. Siqueira J. Etiología del fracaso del tratamiento del conducto radicular: por qué los dientes tratados bien fallan. *Int Endod J* 2001; 34: 1-10.
3. Sjögren U, Fidgor D, Persson S, Sundqvist g. Influencia de la infección en el momento del llenado de la raíz en el resultado del tratamiento endodóntico de los dientes con periodontitis apical. *Int Endod J* 1997; 30: 297 - 306.
4. Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen hm, Haapasalo M. Aislamiento de *Enterococcus faecalis* en canales previamente llenos de raíz en una población lituana. *J Endod* 2000; 26: 593 - 5.
5. Rodríguez C, Oporto G. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. *Rev. Odont. Mex* vol.19 no.3 Ciudad de México jul./sep. 2015.
6. Ccahuana R, Ferreira S, Koga C, Cardoso A. Actividad antimicrobiana de *Uncaria tomentosa* contra patógenos humanos orales. *Braz Oral Res.* 2007; 21 (1): 46 – 50.
7. Ghabanchi J, Bazargani A, Daghigh M, Balady S, Dad S. Evaluación in vitro de anti-retroptococo potencial de la miel. *IRCMJ.* 2010; 12 (1): 61 – 4
8. Mariani M, Jaimes G, Fernandez R. Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* in vitro [Internet]. *Odous científica.* 2017 [cited 11 October 2017].
9. Albàn Motoche, Karla Gabriela. Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de café *coffea aràbica* y cacao *Theobroma cacao* L. Loja-Ecuador. 2017.
10. Sucuzhañay M, Álvarez P. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (*Theobroma cacao*) sobre cepa de *Streptococcus Mutans*: Estudio in vitro. *Odontología* Vol. 19, Nº 2, Ecuador, Julio - diciembre 2016.

11. Barragan T. Accion Antibacteriana de la procaína al 2% más cafeína al 0.25% y del propóleo sobre cepas de enterococcus faecalis, como coadyuvante en la irrigacion en el tratamiento de conducto. quito-enero, 2015.
12. Cuéllar Oscar G, Tecnol Quím, Gloria Guerrero A, * Ph.D. /Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química. Grupo de Oleoquímica. Pereira, Colombia. *Correspondencia: gguerrero@utp.edu.co /” Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, Theobroma cacao L. “/ febrero de 2012.
13. Ayu D. Munadziroh E. Mohammad R. Concentración de extracto de semilla de cacao como material natural para prevenir el crecimiento de Streptococcus mutans. [Internet] 2015[citado 2017 Nov 13]. Disponible en: <http://jurnal.pdgi.or.id/index.php/jpdgi/article/view/53>.
14. Poma E. 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. Tacna 2018.Facultad de ciencias de la Salud. Perú 2018.
15. Santos T, Szwom R, Almeida R. Compuestos naturales para reducir la carga bacteriana de la cavidad oral: un artículo de revisión. Biotempo. Lima 2020, 17(1), jan-jul.: 173-183.
16. Ruiz D. Comparación del efecto antibacteriano entre el extracto y colutorio a base de semilla de Theobroma cacao frente a cepas de streptococcus mutans atcc 25175, Trujillo – 2018. Facultad de ciencias de la salud escuela profesional de odontología. Trujillo – Perú 2019.
17. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. J Conserv Dent. 2010;13(4):233-239. doi:10.4103/0972-0707.73386.
18. Pérez A, Díaz V, Algar J, Valencia O, Estévez R, Cisneros R. Actualización en microbiologíaendodóntica. Actualización en microbiología endodóntica. Cient. Dent. 2013; 10; 1: 27-39. Disponible en: <https://silo.tips/download/actualizacion-en-microbiologia-endodontica>
19. Abella F., Mercadé M., Duran-Sindreu F., Roig M. Managing severe curvature of radixentomolaris: three-dimensional analysis with cone beam computed tomography Int Endod J, 44 (9) (2011), pp. 876-885.

20. Siqueira J. Etiología del fracaso del tratamiento del conducto radicular: por qué los dientes bien tratados pueden fallar (revisión de la literatura) *Int Endod J*, 34 (2001), pp. 1-10
21. Gomes B, Pinheiro E, Sousa E, Jacinto R, Zaia A, Ferraz C, y col. *Enterococcus faecalis* en los conductos radiculares dentales detectados por cultivo y por análisis de reacción en cadena de la polimerasa *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102 (2) (2006), pp. 247-253 Epub 2006 jun 8.
22. Ozbek S., Ozbek A., Erdorgan A. Análisis de *Enterococcus faecalis* en muestras de pacientes turcos con infecciones endodónticas primarias y tratamiento endodóntico fallido mediante PCR en tiempo real Método SYBR verde *J Appl Oral Sci*, 17 (5) (2009), pp. 370-374.
23. E.T. Pinheiro, B.P. Gomes, C.C. Ferraz, E.L. Sousa, F.B. Teixeira, F.J. Souza-Filho Microorganismos de canales de dientes llenos de raíces con lesiones periapicales *Int Endod J*, 36 (2003), pp. 1-11.
24. LinkFang. *Enterococcus faecalis*. 23.02.2021 02:34:47 CET. Disponible en: https://es.linkfang.org/wiki/Enterococcus_faecalis .
25. Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R. *Enterococcus*, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. vol.51 no.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2013.
26. Armijo J. Presencia de *Enterococcus faecalis* en dientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. Universidad de Chile facultad de odontología. Santiago – Chile 2011.
27. Torabinejad y Walton, *Endodoncia, principios y práctica*, 4º Edición, Elsevier España, 2010.
28. *Enterococcus faecalis* [Internet]. *Es.wikipedia.org*. 2017 [cited 21 June 2017]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis.
29. Ribeiro Sobrinho AP, Barros MHM, Nicoli JR. Canal de raíz experimental infecciones en ratones convencionales y libres de gérmenes. *J Endod*. 24 (6): 405 - 408. (1998).
30. Sánchez Ruiz F, Taketoshi Furuya Meguro A, Arroniz Padilla S, Gómez Moreno A. Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y Microcyn 60. *Vol. 13, Núm. 1; marzo 2009*.

31. Ogata N, Boletín bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. El Cacao. CONABIO. 72, 1-5. (2007).
32. Cuéllar, O. Obtención del extracto polar etanol:agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. (2010).
33. Sánchez, A. Cacao. México: Trillas. (2011).
34. De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel M, P., Macía, M. J., & Balsler, H. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Quito. (2008).
35. Corporacion de Promocion de Exportaciones, C. Perfil del Cacao y sus Elaborados. (2009).
36. Food-Info.net : ¿Cuál es la composición (física y química) de los granos, de la manteca, de la masa y del polvo de cacao? [Internet]. Food-info.net. 2017 [cited 24 November 2017]. Available from: <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp48.htm>.
37. Maydata, B. A. Chocolate, Polifenoles y Proteccion a la salud. Obtenido de www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP_21_2_3_1_S2133VGV50.pdf. (2002).
38. Paredes S. & Fernandez A. Polifenoles de aplicación en farmacia: Metabolismo y acción biológica. Offarm, 24, 85-94. (2005).
39. Sánchez, I., & Rubio, A. Atención Farmacéutica en la Enfermedad Periodontal (y II) Plantas Medicinales. Offarm, 29(4), 62-67. (2010).
40. Rawel, H. y Kulling, S. Contribución nutricional de fenólicos de café, cacao y té a la salud humana. Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2, 399-406. (2007).
41. Kyoung-Heon, K., Ki, L., Dong, K., Hyung, P., K, I., y Hyong, L. Extracción y fraccionamiento de inhibidores de la glucosiltransferasa de la cáscara del frijol de cacao. Process Biochemistry, 39 (12), 2043-6. (2004).
42. Kofink M, P. M. (2007). Catequina en coca y chocolate: ocurrencia y análisis de un anátomo de flavan-3-ol atípico. Moléculas. 12, 1274-88.
43. Cala, M., & Vásquez, Á. (2008). Estudio Comparativo por electroforesis capilar y cromatografía de alta eficiencia de catequinas extraídas de plantas de la familia Labiaceae, y determinación de su actividad antioxidante.

Universidad Industrial de Santander: Tesis de grado para optar el título de Química.

44. Torres, M. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico, etanólico y acuoso del arrayán, calaguala, canayuyo, y tipo. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. (2012).
45. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6ª ed. México: Interamericana; 2014.
46. Zapata S, Tamayo A, Alberto B. Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín, Volumen 68, Número 1, p. 7497-7507, 2015. ISSN electrónico 2248-7026. ISSN impreso 0304-2847.
47. Braisson J. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de Theobroma cacao L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de Streptococcus mutans a esmalte dentario. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2016.

ANEXO



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

ANEXO 01

CARTA DE AUTORIZACIÓN



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE
FILIAL TRUJILLO

CARRERA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

Trujillo, 29 de Abril del 2019

DRA. MANUELA LUJÁN VELÁSQUEZ
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Presente

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo muy cordialmente en mi condición de Coordinador de carrera de la Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote Filial Trujillo. Siendo el motivo de la presente manifestarle que, en el marco del cumplimiento curricular de la carrera profesional de odontología, en el curso de TALLER DE INVESTIGACIÓN III, nuestra alumna, HERNANDEZ ROSALES, Stephany; debe llevar acabo el desarrollo de su proyecto de investigación titulado EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE HIDROALCOHÓLICO DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE THEOBROMA CACAO SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212 . Así mismo para realizar el presente trabajo ha sido seleccionada su digna institución, por lo cual se solicita el permiso respectivo para que nuestra alumna pueda ejecutar con toda normalidad su proyecto de investigación en las instalaciones del local que dignamente usted dirige.

Es propicia la oportunidad, para reiterarle las muestras de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente


CD. JOSE ANTONIO VELÁSQUEZ
COORDINADOR DE CARRERA



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE
FILIAL TRUJILLO

CARRERA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

Trujillo, 29 de Abril del 2019

DRA. MARILÚ SOTO VÁSQUEZ
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Presente

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo muy cordialmente en mi condición de Coordinador de carrera de la Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote Filial Trujillo. Siendo el motivo de la presente manifestarle que, en el marco del cumplimiento curricular de la carrera profesional de odontología, en el curso de TALLER DE INVESTIGACIÓN III, nuestra alumna, HERNANDEZ ROSALES, Stephany; debe llevar a cabo el desarrollo de su proyecto de investigación titulado EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE HIDROALCOHÓLICO DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DE THEOBROMA CACAO SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212. Así mismo para realizar el presente trabajo ha sido seleccionada su digna institución, por lo cual se solicita el permiso respectivo para que nuestra alumna pueda ejecutar con toda normalidad su proyecto de investigación en las instalaciones del local que dignamente usted dirige.

Es propicia la oportunidad, para reiterarle las muestras de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente


CD. JOSÉ ANTONIO CÁNDIDO
COORDINADOR DE CARRERA ODONTOLÓGICA

Anexo 2

VERNIER DIGITAL marca MITUTOYO, Modelo 500-196-20 ABSOLUTE
Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad
17025



Anexo 3

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Extractos Concentración	Diámetro de los halos de Inhibición según Concentración del extracto hidroetanólico de cacao (mm)				Clorhexidina 0.12%	C -
	10%	25%	50%	75%		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Anexo 4

Certificado de buenas prácticas ecológicas del material vegetal de Theobroma cacao



INSTITUCIÓN EDUCATIVA
"JENARO ERNESTO HERRERA TORRES"
Creada: R.D. N° 0163-89, del 16 de Mayo de 1989 C.M. 0878082



"Año de Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad"

CONSTANCIA

EL DIRECTOR DE LA INSTITUCIÓN EDUCATIVA
"JENARO ERNESTO HERRERA TORRES", DEL CENTRO
POBLADO DE JERILLO, DISTRITO DE JEPELACIO,
PROVINCIA DE MOYOBAMBA, **CÓDIGO MODULAR N°
0878082**, QUE SUSCRIBE;

HACE CONSTAR;

Que, la institución educativa cuenta con 2 hectáreas de
CACAO ORGÁNICO que es cultivado de manera tradicional lo que
refiere a un producto 100% natural lo que garantiza un alimento de
alto valor nutricional y de alto índice de calidad.

Se expide la presente constancia a solicitud del
interesado, para los fines que estime convenientes.

Jerillo, 31 de mayo del 2019.



DIRECCION REGIONAL DE EDUCACION
JPEL - MOYOBAMBA
I.E. JENARO E. HERRERA TORRES
.....
Lic. Rolly Rojas Chávez
DIRECTOR
C.M. 1043930305

Anexo 5

Constancia de colaboración de MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ Dra. En farmacia y bioquímica en la ejecución del proyecto de investigación

CONSTANCIA


Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, Docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727.

Dejo constancia de haber colaborado en la preparación de la muestra vegetal y las concentraciones, de los extractos hidroetanólicos de la semilla de *Theobroma cacao*, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Trujillo, a la alumna **STEPHANY CAROLYNE HERNANDEZ ROSALES**, identificada con DNI 57376080, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, en la ejecución de la tesis titulada: **“EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE *Theobroma cacao* SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.**

Se expide esta constancia, a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinentes.

Trujillo 04 de julio del 2019




Dra. MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

Anexo 6

Constancia de colaboración de MANUELA NATIVIDAD LUJAN VELÁSQUEZ,
Biólogo – Microbióloga en la ejecución del proyecto de investigación.

CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez. Biólogo – Microbiólogo docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna HERNANDEZ ROSALES, STEPHANY CAROLYNE estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Los Ángeles de Chimbote, identificado con DNI 75376080, en la ejecución de la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado: “Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212”



Manuela Natividad Luján Velásquez
Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología
Universidad Nacional de Trujillo
Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez
CATEDRA DE INMUNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Anexo 7

Constancia de colaboración de AGUSTO CHAFLOQUE CHAFLOQUE, Ingeniero Estadístico en la ejecución del informe final de investigación.

CONSTANCIA

Yo, AGUSTO CHAFLOQUE CHAFLOQUE, dejo constancia de haber colaborado con la alumna STEPHANY CAROLYNE HERNANDEZ ROSALES, identificada con DNI 75376080, con domicilio legal en la calle 8 de octubre n° 568, Florencia de Moratrujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote.

Se hace constar que se colaboró con el análisis estadístico de la tesis titulada EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE THEOBROMA CACAO SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212, TRUJILLO – 2019.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.



FIRMA

AGUSTO CHAFLOQUE CHAFLOQUE

12817304
Trujillo, 04 de julio 2019

Anexo 8

EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE THEOBROMA CACAO SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212

Extractos Concentración	Diámetro de los halos de Inhibición según Concentración del extracto hidroetanólico de cacao (mm)				Clorhexidina 0.12%	C -
	10%	25%	50%	75%		
Repeticiones						
1	6.7	11.9	16.2	18	23.8	7.1
2	7.3	11.4	15.5	18.5	24.5	7
3	7.6	12.1	15.3	18.6	24	7.1
4	7	12	15	19.5	24.8	7
5	7.2	12.3	16.4	19.5	24.8	6.8
6	7.3	12.2	15.9	20	24.7	7.1
7	7.5	11.8	15.2	19.9	23.6	7.4
8	6.8	12.6	16	20.3	25.2	7
9	7.7	12	16.1	20	24	7
10	8.1	12.2	15.8	19.4	24.5	7.2

C+= Clorhexidina al 0.12%

C- = etanol 70°

PRUEBA DE NORMALIDAD

Los datos fueron sometidos al tratamiento estadístico mediante el software IBM SPSS Statistics v.24, para verificar si las muestras provienen de una población con distribución normal o no normal, mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($n \leq 50$) e indicar inicialmente.

- **Criterio para determinar Normalidad:**
 - **P > 0,05 Acepta H_0** = Los datos provienen de una Distribución Normal.
 - **P < 0,05 Acepta H_i** = Los datos provienen de una Distribución No normal.

Tabla 8: Prueba de normalidad para Efecto inhibitorio del extracto hidroetanólico de la semilla de teobroma cacao (cacao) en las concentraciones de 10,25,50 y 75% frente a Enterococcus faecalis ATCC 29212, mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento.

Extractos Concentración	Diámetro de los halos de Inhibición según Concentración del extracto hidroetanólico de cacao (mm)				Clorhexidina 0.12%	C -
	10%	25%	50%	75%		
Repeticiones						
1	6.7	11.9	16.2	18	23.8	7.1
2	7.3	11.4	15.5	18.5	24.5	7
3	7.6	12.1	15.3	18.6	24	7.1
4	7	12	15	19.5	24.8	7
5	7.2	12.3	16.4	19.5	24.8	6.8
6	7.3	12.2	15.9	20	24.7	7.1
7	7.5	11.8	15.2	19.9	23.6	7.4
8	6.8	12.6	16	20.3	25.2	7
9	7.7	12	16.1	20	24	7
10	8.1	12.2	15.8	19.4	24.5	7.2
<i>Promedio</i>	7.32	12.05	15.74	19.37	24.39	7.07
<i>Prueba de Normalidad Shapiro Wilks</i>	P = 0.100	P = 0.100	P = 0.100	P = 0.100	P = 0.100	P = 0.100

Al tener menos de 50 datos por cada extracto y controles, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la normalidad de los mismos, donde se observa una distribución normal de datos para todos los grupos evaluados.

Anexo 10

EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE THEOBROMA CACAO SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212.

SELECCIÓN, LAVADO Y DESINFECCIÓN



Se lavaron las mazorcas de Theobroma caca, y luego se secaron.



Cortando de manera vertical los frutos de cacao



Separando las semillas de cacao de la cáscara



Lavado de las semillas de cacao para separar el mucílago



Semillas de cacao sobre el papel craft para secado a temperatura ambiente por 24 horas.



Secado de semillas de cacao en la estufa de circulación de aire a una temperatura de 40° C.



Tostado de las semillas de cacao en una sartén , removiendo con la ayuda de una cuchara de palo; por 10 minutos a 140°C.



Cacao tostado enfriando por 10 minutos.



Pulverizando las semillas de cacao con ayuda de un molino.



Semillas de cacao pulverizadas



Polvo de semilla tamizado utilizando el tamiz 0.7 y almacenado en frasco de vidrio ámbar de boca ancha.

Preparación de extracto hidroetanólico de semilla de cacao



Se colocó el polvo de semilla de cacao en un envase color ámbar.



Realizando la mezcla etanol – agua (80:20)



Filtración del extracto hidroetanólico



Evaporación de la preparación hidroetanólica de la semilla del cacao, luego se preparo las concentraciones 10%,25%,50% y 75%

EVALUAR EL EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO DE LA SEMILLA DE THEOBROMA CACAO SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS ATCC 29212.

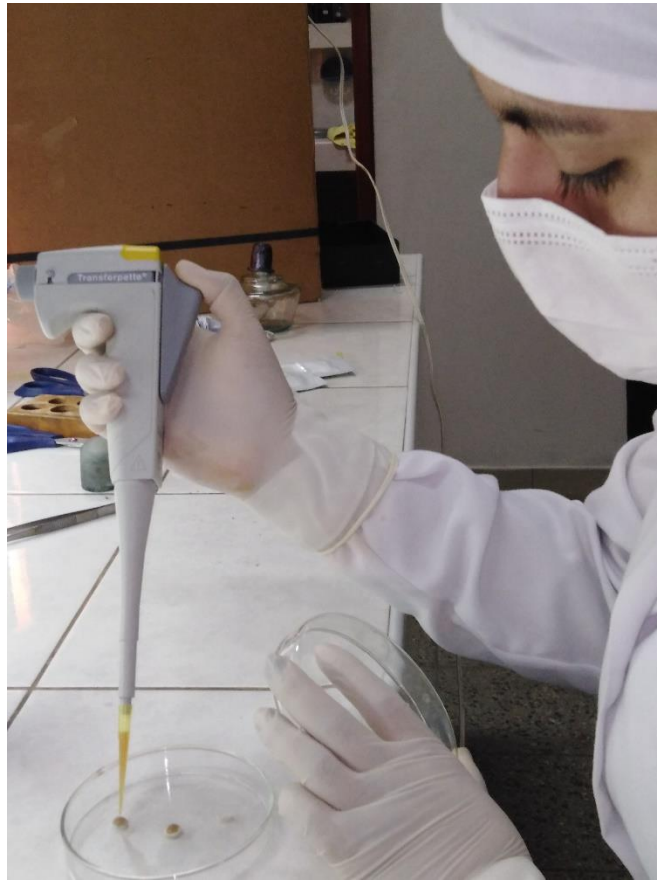


Inoculación de *Streptococcus mutans* en las placas, se tomó 100ul u se colocaron en cada una de las placas con Agar Mueller Hinton.

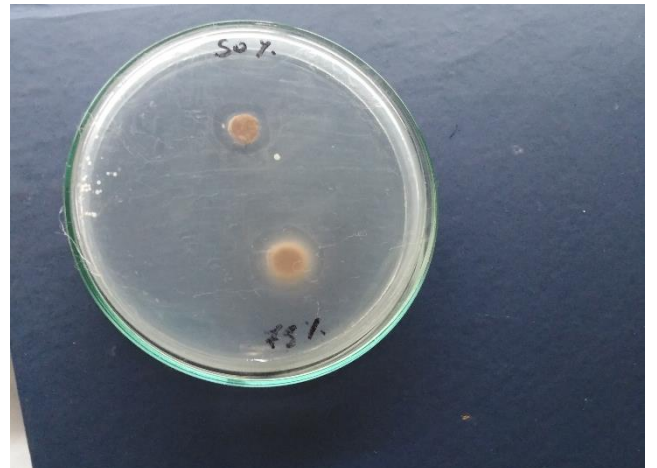
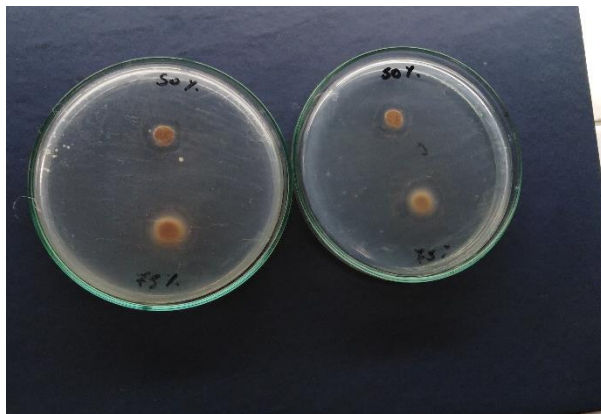
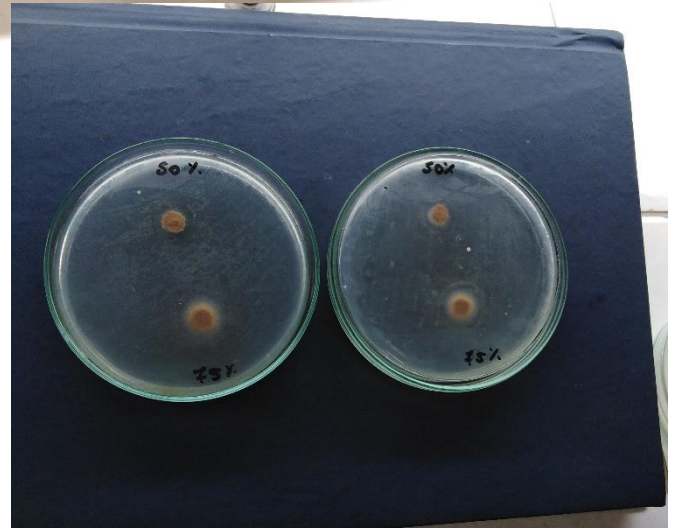
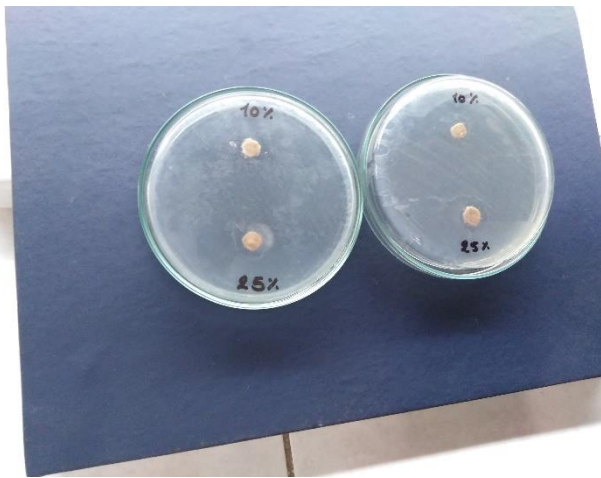


Con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuirá la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa.

Se prepararan discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales serán embebidos con 30 uL de cada una de las concentraciones de 10, 25, 50 y 75% del extracto hidroetanolico.



Se empleó como control positivo el Gluconato de clorhexidina al 0.12% y como control negativo al etanol al 70%.



Después del tiempo de incubación 24 a 48 horas se examinará cada placa y se medirán los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco para lo cual se utilizará regla milimetrada, abarcando el diámetro del halo.

Se realizarán 10 repeticiones de cada concentración.



ANEXO 11

CONSTRATACIÓN DE HIPOTESIS

Anexo 11: Luego de realizar la Prueba de Normalidad y corroborar que los datos se distribuyen de manera normal o simétrica, se aplicó la prueba estadística Paramétrica ANOVA.

1. Planteamiento de hipótesis

- H_1 : “Existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.”
- H_0 : “No existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.”

2. Nivel de confianza

Nivel de confianza = **0,95 (95%)**

Nivel de significancia: **$p = 0,05$ (5%)**

La significancia es el valor estándar y en base a ello se determinó si se acepta o se

rechaza la hipótesis de investigación.

3. Establecimiento de los criterios de decisión

La prueba estadística se realiza en base a la hipótesis nula.

- Si “el valor de significancia **$p > 0,05$** se acepta H_0 se rechaza H_1 ”.
- Si “el valor de significancia **$p < 0,05$** se rechaza H_0 ; se acepta H_1 ”.

4. Cálculos

El software SPSS, proyecta los siguientes datos:

- **Hi:** Si existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.
- **HA:** Existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.

Tabla 1.- ANOVA: Efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Entre grupos</i>	2356.39	5	471.28	2062.99	0.0000
<i>Dentro de grupos</i>	12.34	54	0.23		
<i>Total</i>	2368.73	59			

Fuente: Análisis ANOVA- SPSS.

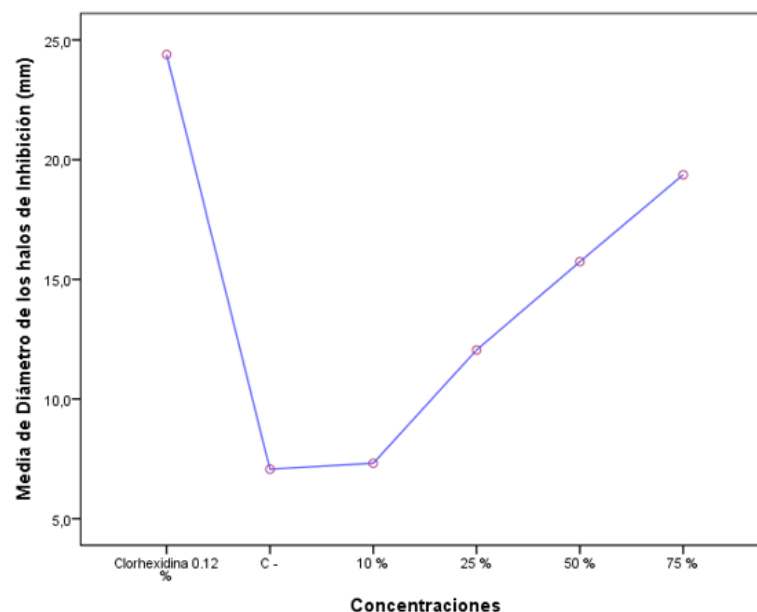
5. Decisión

La prueba ANOVA, arroja una significancia $p = 0,000 < 0,05$.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis de investigación”.

- **H0:** Existe efecto inhibitorio del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis* atcc 29212, Trujillo – 2019.

Gráfico 1: Comparación de las medias de halos de inhibición del extracto Hidroetanólico de la semilla de *Theobroma cacao* sobre *Enterococcus faecalis*



HRS

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%	12%	0%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	10%
2	repositorio.uladech.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
4	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1%
5	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo