

Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans in vitro*

María J Mariani, Grecia N Jaimes V, Rafael Fernandez-Da Silva
Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología.
marianizoppi@gmail.com; rfernandez2@uc.edu.ve

Recibido: 07/02/2010
Aceptado: 13/06/2010

Resumen

Uno de los retos de la odontología actual es el descubrimiento o síntesis de sustancias capaces de inhibir o disminuir la aparición, persistencia y recurrencia de bacterias patógenas con influencia negativa en los tejidos de la cavidad bucal. Diversos compuestos son empleados para el control de la caries dental, utilizando criterios tales como: actividad antimicrobial, actividad anti-glucosiltransferasa, inhibición enzimática y reemplazo de sacarosa por otros edulcorantes. El objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto bacteriostático del extracto de semillas de Cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el crecimiento *in vitro* de cepas puras de *Streptococcus mutans*. La investigación fue de tipo descriptiva con diseño experimental y grupo control. Se trató de un estudio *in vitro* destinado a la evaluación de presencia de inhibición y el tamaño del halo formado alrededor de las bacterias, las cuales fueron sometidas a la acción del cacao en concentraciones comprendidas entre 0% y 17,5%. Los resultados arrojaron que el mayor efecto inhibitorio se logró en concentraciones de 10% y 12,5%. Por lo tanto pudo concluirse que el extracto de semillas de Cacao inhibe significativamente el crecimiento y desarrollo de una de las principales bacterias cariogénicas, razón por la cual se sugiere profundizar estas investigaciones para continuar evaluando su efecto *in vitro* y aplicarlo posteriormente *in vivo*.

Palabras clave: Caries dental, *Streptococcus mutans*, agente anticariogénico, cacao.

Summary. Bacteriostatic effect of the cacao bean extract (*Theobroma cacao L.*) on the *in vitro* growth of *Streptococcus mutans*

One of challenges of the current dentistry is either the finding or synthesis of substances capable of either inhibit or diminish the appearance, persistence and recurrence of bacterial pathogens with negative influence in the different tissues of the mouth. Many agents are used in order to control dental decay, using a criteria based on its antimicrobial activity, anti-glucosiltransferasa activity, enzyme inhibition and substitution of sucrose for different swettenert. The main objective of this investigation was to determine the bacteriostatic effect of the extract of cacao seeds (*Theobroma cacao L.*) on the *in vitro* growth of *Streptococcus mutans*. The investigation was a descriptive and exploratory type, with an experimental design and a control group. It was about an *in vitro* study made evaluating the presence of inhibition and measures of halos formed around the bacterium, which were put under the action of the cacao in variable concentrations between 0% and 17, 5%. The results threw that the greater inhibiting effect was obtained between the 10% concentrations and 12, 5%. Therefore, it can be concluded that the extract of cacao seeds significantly inhibits the growth and development of one of the principal cariogenic bacterium, reason for which it is suggested to deepen these investigations, it effect *in vitro* and to apply it later *in vivo*.

Key words: Dental decay, *Streptococcus mutans*, anticariogenic agent, cacao.

Introducción

En la actualidad las patologías bucodentales se encuentran ampliamente distribuidas, siendo la caries, uno de los principales problemas de salud bucal que padece gran parte de la población mundial, ya que más del 80% de la misma, está afectada por dicha enfermedad (1). Debido a su gran incidencia y a los altos costos que implica su tratamiento, la salud bucodental en América representa un aspecto crítico en cuanto a salud pública (2). Por estos motivos, ha sido muy difícil para los sistemas de salud lograr planes estratégicos que erradiquen la enfermedad, razón por la cual es necesaria la búsqueda de alternativas que contribuyan con la disminución de la incidencia y consecuencias que ese padecimiento acarrea.

La caries es considerada una patología de etiología multifactorial, para que se produzca debe haber una relación entre los microorganismos y el huésped, con un sustrato adecuado durante un período de tiempo suficiente (3-5). A partir de la interacción de estas entidades, se explica la caries como consecuencia de los ácidos producidos por bacterias bucales presentes en la placa, siendo una de las más comunes el *Streptococcus mutans* (5-9), la cual ha sido relacionada con el inicio (5) y progresión de la caries, debido a su capacidad para producir ácido láctico partiendo de la sacarosa y glucanos, por medio de la acción de la enzima glucosiltransferasa (10), pudiendo metabolizar estos compuestos con más rapidez que cualquier otro microorganismo de la cavidad oral (11). Resulta de interés reconocer que diversos compuestos naturales han evidenciado actividad antimicrobial contra *Streptococcus mutans* (9, 12-14).

Históricamente y en la actualidad, se ha observado una tendencia hacia la investigación sobre el uso de sustancias de origen natural en diversas áreas de la odontología (5, 11, 16, 17), dirigidas a la inhibición de la glucosiltransferasa, la adhesión celular y el crecimiento celular, estrategias mediante las cuales los agentes antimicrobianos evitan la formación de placa y logran prevenir la caries y enfermedades periodontales (5, 8, 15, 18). Tal planteamiento, ha sido reafirmado estableciendo que el extracto de

cáscara de semillas de cacao disminuye la producción de ácidos y síntesis de glucanos por parte de *Streptococcus mutans* (19,20), por lo tanto puede inferirse que este producto posee cualidades bacteriostáticas sobre el crecimiento de bacterias cariogénicas.

Con el transcurso de los años, han sido estructuradas diversas investigaciones enfocadas al estudio de la acción del extracto de semillas y polvo de cacao sobre la placa dental (21,22), concluyéndose que la actividad inhibitoria de dichos elementos sobre la enzima glucosiltransferasa se atribuye a los polifenoles presentes en el cacao (23), que a su vez también se encuentran en otros productos, como el té (24).

Los polifenoles presentes en el cacao, son responsables del color en sus semillas (26,27) y pueden pertenecer a distintos tipos de moléculas: catequinas, epicatequinas, antocianidinas, proantocianidinas, ácidos fenólicos, taninos, otros flavonoides o algunos compuestos menores. Porcentualmente, las epicatequinas son el principal componente fenólico del cacao, ya que constituyen el 35% aproximadamente en las semillas del cacao Forastero (28). Las epicatequinas y catequinas, sirven como bloques para la construcción de formas poliméricas de procianidinas (21).

Diversas investigaciones, apoyan el hecho de que la propiedad bacteriostática del cacao viene dada por la presencia de dos sustancias cariostáticas en la cáscara del grano de cacao: una con actividad anti-glucosiltransferasa y otra con actividad antibacterial. Igualmente, los ensayos revelaron la existencia de ácidos grasos insaturados y compuestos polifenólicos de alto peso molecular químicamente activos y a través de los cuales se evidenció, que los polímeros de tipo epicatequinas son los responsables de la actividad anti-glucosiltransferasa (21).

Este trabajo tuvo como objetivo, determinar el efecto bacteriostático de un extracto de semillas de Cacao (*Theobroma cacao L.*) sobre el crecimiento *in vitro* de cepas puras de *Streptococcus mutans*

Materiales y Métodos

La investigación fue descriptiva, orientada hacia la evaluación del comportamiento del *Streptococcus mutans* bajo el efecto de un extracto de semillas de cacao. Para ello fue empleado un diseño experimental con postprueba y grupo control. A tales fines, se empleó una cepa pura liofilizada de *Streptococcus mutans* (ATCC25175), suministrada por el Centro Venezolano de colecciones de Microorganismos (CVCMO) del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

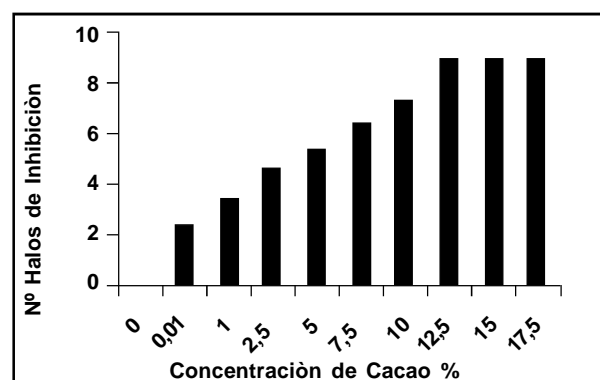
El extracto fue preparado a partir del polvo de cacao de la Casa Comercial Chocolates «El Rey» de amplia distribución a nivel nacional y fácil acceso. Con la ayuda de una pipeta se inocularon mediante hisopos estériles 50 µl de la cepa bacteriana en placas de Agar sangre y se frotó hasta formar una capa uniforme. Las bacterias fueron diluidas previamente de forma seriada en una concentración de 10^{-4} ; seguidamente se colocaron 10 discos estériles de papel de filtro (Whartman N° 1) de 5 mm por placa (3 por tratamiento), impregnados con el extracto de Cacao a diferentes concentraciones (0% o grupo control, 0.01, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 y 17.5%), el cual fue preparado a través de la dilución del polvo de cacao en agua destilada, respetando las proporciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas; en el caso de la concentración de 0%, o grupo control, a esta únicamente le fue agregada agua destilada. Posteriormente, se incubaron las placas en una estufa a 37° C, observándose a las 24 horas el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* en dos sentidos: primero, de orden cualitativo, en referencia a la aparición de halos de inhibición alrededor de los discos y en segundo lugar, el cuantitativo, en relación a la medición del diámetro de los halos. Los datos obtenidos se procesaron mediante estadística descriptiva.

Resultados

Se observó que en el grupo control de 0% (sin extracto de cacao), no se formaron halos de inhibición alrededor de los discos, a diferencia del grupo tratado

con el extracto a distintas concentraciones. En la concentración exponencial de 0,01% se evidencia la aparición los mismos, indicando que el extracto de cacao actúa incluso en concentraciones muy bajas e inferiores al 1%. Es notable el aumento progresivo en la cantidad de halos de inhibición, no presentándose variaciones en el promedio a partir de la concentración de 12,5% hasta la máxima concentración empleada (17,5%). Estos resultados confirmaron un importante efecto de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* por parte del extracto semillas de cacao tal como se muestra en la figura 1.

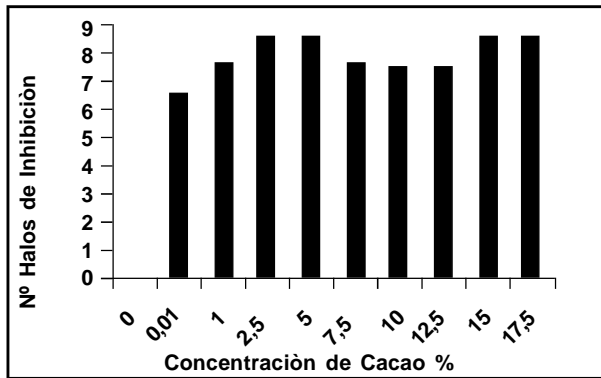
Figura 1. Número de discos inhibidos en medio Agar sangre en cultivos de *Streptococcus mutans* en diferentes concentraciones de cacao.



Chi² p > 0,05

Con respecto al diámetro de los halos de inhibición, se observó un promedio de 7 mm, oscilando entre 6 y 8 mm de grosor por halo, siendo menor (6 mm) en la concentración de 0.01% y mayor (8 mm) en las concentraciones de 2,5%, 5%, 15% y 17.5%. Al evaluar los datos obtenidos mediante ANOVA se confirmó que los promedios del diámetro del halo estaban estrechamente relacionados con la concentración de cacao empleada, tal como se observa en la figura 2.

Figura 2. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) formado en medio Agar sangre en cultivos de *Streptococcus mutans* en diferentes concentraciones de cacao.



ANOVA $p > 0,05$

Discusión

Los productos naturales tienen gran demanda en la actualidad debido a sus extensas propiedades biológicas, determinando así una fuente constante de numerosos tipos de compuestos bioactivos efectivos para distintas y complejas patologías (9).

En este sentido, de acuerdo a varios estudios epidemiológicos, la presencia de altas cantidades de *Streptococcus mutans* en la saliva, se encuentra relacionada con una alta prevalencia de caries (29). Diversos compuestos son empleados para el control de la caries dental, utilizando criterios como: actividad antimicrobial, actividad anti-glucosiltransferasa, inhibición enzimática y reemplazo de sacarosa por otros edulcorantes. Las plantas son ricas en una extensa variedad de metabolitos secundarios como taninos, alcaloides y flavonoides, los cuales han mostrado tener propiedades antimicrobianas *in vitro*. Se han encontrado múltiples reportes sobre la actividad antimicrobial de plantas medicinales empleadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas (8,30). Numerosos polifenoles obtenidos de las plantas muestran actividad anti-glucosiltransferasa sobre el *Streptococcus mutans*. Sin embargo, un limitado grupo de compuestos naturales se encuentra disponible debido a problemas con su efectividad, estabilidad, toxicidad, olor, sabor y costo (5, 22, 30).

En este orden de ideas, se ha observado la reducción del índice de crecimiento de *Streptococcus mutans* al estar presente el extracto acuoso de hojas de *Piper betle L.*, siendo este dependiente de la concentración al alterar el crecimiento, la propiedad de adherencia, la superficie celular hidrofóbica y la actividad glucosiltransferasa de dicha bacteria. Al utilizar dicho extracto se observan significativas alteraciones celulares del *Streptococcus mutans*, que ocasionan una destrucción celular total o muerte a las mayores concentraciones empleadas (25). De igual manera, la literatura reporta que las cepas de bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas ante el efecto de varios extractos vegetales (31, 32, 33), por lo que se ha propuesto que el mecanismo del efecto antibacteriano comprende la inhibición de varios procesos celulares, seguida por un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática y finalmente el escurrimiento (escurrimiento o ruptura?) iónico de las células (30).

El principal hallazgo de este estudio demuestra que el extracto de semillas de cacao posee efecto bacteriostático sobre el crecimiento de la cepa pura de *Streptococcus mutans* cultivada *in vitro* utilizando un medio sólido. Dicha acción inhibitoria se evidenció mediante la presencia de halos de inhibición y la variación en sus diámetros bajo la influencia de distintas concentraciones de cacao. Del mismo modo, en un estudio realizado en ratas infectadas con *-Streptococcus sobrinus*, cuyo grupo control fue alimentado a base de chocolate blanco con 35% de sacarosa y el grupo tratado con extracto de polvo de cacao (EPC), se halló una reducción significativa en los índices de caries de este último grupo, debido a que el EPC inhibió la síntesis *in vitro* de glucanos insolubles en agua a través de su acción antiglucosiltransferasa sobre el *S. sobrinus* (33).

Con relación a la presencia de halos de inhibición, los datos obtenidos a través de la prueba Chi cuadrado afirmaron la hipótesis planteada que existe un importante efecto en la inhibición del crecimiento del *Streptococcus mutans* por parte del cacao. En cuanto a la presencia de halos de inhibición del

crecimiento bacteriano, la concentración más adecuada fue ubicada entre 10% y 12.5%, por encima de estas concentraciones el efecto bacteriostático del cacao permaneció constante. Por otra parte, también se afirma que las sustancias de la cáscara de la semilla de cacao que muestran fuerte actividad antiglicosiltransferasa son las epicatequinas, con enlaces intermoleculares C-4 y C-8 con peso molecular estimado de 4636 en su forma acetilada y la actividad bactericida está determinada por el ácido oléico y linoléico, sobre todo a una concentración de 30 µg/ml (34). En otro estudio, al realizar el análisis enantiomérico del cacao y sus derivados, se reveló que la presencia de (-)-catequinas se encuentra influenciada por las condiciones del procesamiento del cacao. El paso inicial del proceso para la formación de (-)-catequinas es el tostado, el análisis de granos de cacao no fermentados que sólo contenían (-)-epicatequinas, (+)-catequinas y niveles indetectables de (-)-catequinas, al estar sometidos a altas temperaturas, las (-)-epicatequinas se transformaron en (-)-catequinas, lo que indica una reacción de epimerización. Así mismo, se demostró que el polvo de cacao es el derivado del cacao que posee los mayores niveles de (-)-catequinas (35).

Adicionalmente, con respecto a la evaluación de la medida de los halos de inhibición formados, cuyos datos se analizaron por medio de la prueba ANOVA, se ratificó que las medidas guardan relación con la concentración de cacao empleada. En estudios similares realizados al evaluar la acción de los polifenoles provenientes de propóleos sobre *Staphylococcus aureus*, se determinó la existencia de una relación directa significativa y positiva entre las variables, es decir, a mayor contenido de polifenoles (flavonoides), mayor diámetro del halo de inhibición (36). En otro estudio, se concluyó que los polifenoles o los polímeros polifenólicos son los ingredientes anticariogénicos del extracto del cacao, el té verde y el extracto de té de Oolong (33).

A través de los resultados arrojados por el estudio presentado, se reafirman los hallazgos de otras investigaciones similares y relacionadas con la

determinación de extractos o compuestos puros antimicrobianos, así como sus concentraciones para la prevención de caries, disminución de la formación de placa bacteriana y de la instauración de enfermedades periodontales (16,17).

Conclusiones

En este estudio se demostró una significativa inhibición *in vitro* del crecimiento (presencia y diámetro del halo de inhibición) de la cepa pura de *Streptococcus mutans* en medio sólido, en relación a las soluciones de extracto de cacao a concentraciones de 10-12.5%. Por lo que puede considerarse la concentración de 12.5% como óptima para la inhibición en el crecimiento y formación de la bacteria *Streptococcus mutans*.

En concordancia con estos resultados es pertinente recomendar la profundización de este tipo de investigaciones en Venezuela, por ser nuestro país uno de los principales productores de cacao en Latinoamérica, en aras de desarrollar nuevas líneas de investigación, diversos productos y servicios terapéuticos que ofrezcan significativos beneficios para los pacientes odontológicos. Así mismo, se recomienda la realización de estudios empleando productos de desecho provenientes del cacao, el análisis químico del cacao venezolano y su efecto bacteriostático *in vivo*.

Basado en los resultados, puede concluirse que los extractos de plantas tienen gran potencial como compuestos antimicrobianos contra microorganismos y pueden ser usadas como una solución de amplio espectro en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos resistentes, al ser más económicas y producir menos efectos adversos. En vista de la necesidad constante de nuevos y efectivos agentes terapéuticos, las hierbas y productos de ellas deberían jugar un rol importante en el futuro de la higiene oral, así como participar en la incorporación de sus ingredientes en la goma de mascar para promover la higiene oral, tratar odontalgias, periodontitis y gingivitis (14, 15, 32, 37).

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo financiero otorgado por el Fondo de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo y a la colaboración prestada por el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACYT).

Referencias

1. OMS.int. [Internet]. Ginebra: Comunicado de prensa; (Feb 24, 2004). La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. [citado 2008 may 18]. [aprox. 1]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/print.html>.
2. Paho.org. [Internet]. Salud oral. En Capítulo 2: Condiciones de salud y sus tendencias. Salud en las Américas; 2007. [citado 2009 may 9]. N° I-Regional: [aprox. 7]. Disponible en: <http://www.paho.org/hia/archivosvol1/volregionalesp/SEA07%20Regional%20SPA%20Cap%202.pdf>.
3. Barrancos L. Operatoria dental. 4ta ed. Buenos Aires: Panamericana; 2006.
4. Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999.
5. Ccahuana R, Ferreira S, Koga C, Cardoso A. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res.* 2007; 21(1):46-50
6. Farías F. Compendio de microbiología oral. Venezuela: Tropikos; 1999.
7. Seif T. Cariología. Prevención, diagnóstico y tratamiento contemporáneo de la caries dental. Actualidades Médico Odontológicas de Latinoamérica. Caracas: América; 1997
8. Ghabanchi J, Bazargani A, Daghigh M, Balady S, Dad S. In vitro assessment of anti-*Streptococcus mutans* potential of honey. *IRCMJ.* 2010; 12(1):61-4
9. Nalina T, Rahim Z. The crude aqueous extract of piper betle L. and its antibacterial effect towards *streptococcus mutans*. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry.* 2007; 3 (1):10-5.
10. León G. Prevención de caries en niños. Odontología pediátrica. Conceptos básicos. Cátedra de Odontología Pediátrica Universidad Central de Venezuela. Caracas: Disinlimed; 1996
11. Liebana J. Microbiología oral. 2da ed. Madrid: McGrawHill, Interamericana de España; 2002
12. Biswas K, Chattopadhyay I, Barnerjee R, Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science.* 2002 Jun; 82 (11, 10):1336-45.
13. Bhuiyan M, Nishimura M, Matsumura S Shimono T. Antibacterial effects of the crude *azadirachta indica* neem bark extract on *streptococcus sobrinus*. *Pediatric Dental Journal* 2007; 7 (1):61-4.
14. Mesa A, Bueno J, Betancur L. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap,* Diciembre 2004; 17 (4):325-33.
15. Bone K. *Phytotherapy Review & Commentary.* 2005; townsend letter for Doctors & patients. June: 38-41.
16. Lee SS, Zhang W, Li Y. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices: results of an in vitro diffusion method study. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135(8):1133-41.
17. Platt C, Tosta E, Machado ME. Uso de los diferentes productos químicos para el control de la placa bacteriana como coadyuvante en la prevención de las enfermedades gingivales. *Odous científica.* 2004 Ene-jul. 5(1):14.
18. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Lee MJ Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr*

- Food Res. 2008 Jun; 52 Suppl 1:S139-51.
19. Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci*. 2006 Aug; 114(4):343-8.
 20. Matsumoto M, Tsuji M, Okuda J, Sasaki H, Nakano K, Osawa K et al. Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Oral Sci*. 2004 Jun; 112(3):249-52.
 21. Kyoung-Heon K, Ki L, Dong K, Hyung P, Ik K, Hyong L. Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Process Biochemistry*. 2004; 39(12):2043-6.
 22. Srikanth RK, Shashikiran ND, Subba Reddy VV. Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2008 Jun; 26(2):67-70.
 23. Lee KW, Hwang ES, Kang NJ, Kim KH, Lee HJ. Extraction and chromatographic separation of anticarcinogenic fractions from cacao bean husk. *Biofactors*. 2005; 23(3):141-50.
 24. Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51(1):116-34.
 25. Nalina T, Rahim Z. Effect of pitper betle L. Leaf extract on de virulence activity of streptococcus mutans-an *in vitro* study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2006; 9(8):1470-5.
 26. Arlorio M, Coisson J, Travaglia FI, Varsaldi F, Miglio G, Lombardi, G, et al. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*. 2005; 38(8):1009-14.
 27. Gotti R, Furlanetto S, Pinzauti S, Cavrini V. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*. 2006 Apr 21; 1112(1-2):345-52.
 28. Miller KB, Stuart DA, Smith NL, Lee CY, McHale NL, Flanagan JA et al. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J Agric Food Chem*. 2006 May 31; 54(11):4062-8.
 29. Ito K, Nakamura Y, Tokunaga T, Iijima D, Fukushima K. Anti-cariogenic properties of a water- soluble extract from cacao. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67(12):2567-73.
 30. Rosina K, Barira I, Mohd A, Shazi S, Anis Ahmad L, Manazir A. et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 2009; 14:586-97.
 31. Astal Z, Ashour A, Kerrit A. Antimicrobial activity of some medicinal Plant extracts in Palestine. *Pak J Med Sci*. 2005; 21 (2):187-93.
 32. Nair R, Chanda S. Antibacterial activities of some medicinal plants of the western region of India. *Turk J Biol*. 2007; (31):231-6.
 33. Ito K, Nakamura Y, Tokunaga T, Iijima D, Fukushima K. Anti-cariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003 Dec; 67(12):2567-73. ESTA REPETIDO ES EL 29
 34. Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res*. 2001; 80(11):2000-4.
 35. Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R. Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. *Molecules*. 2007; 12:1274-88.

36. Chaillou L, Herrera H, Maidana J. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos. Centro de investigaciones avícolas. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. [citado 2007 Mar 14]. Disponible en <http://www.unse.edu.ar/cyt/SECCION-A-POSTER-4tasJornadasCyT.pdf>. 2004
37. Vaghasiya Y, Nair R, Chanda S. Antibacterial evaluation of sapindus emarginatus Vahl leaf in in vitro conditions. *International Journal of Green Pharmacy*. 2009; 3:165-6.